

Thèse de Doctorat

Vincent HIVERNAUD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Science de la Vie et de la Santé*

Spécialité : *Recherche clinique,
Innovation Technologique, Santé Publique*

Unité de recherche : *INSERM U791*

Soutenu le *7 avril 2016*

Thèse N°: **11**

Chirurgie reconstructrice et médecine régénératrice osseuse :

Utilisation du tissu adipeux et de ses dérivés

JURY

Rapporteurs :	Guy MAGALON , Professeur d'université, Etablissement Hervé PETITE , Directeur de recherche INSERM, Université de Paris
Examineurs :	Arnaud SCHERBERICH , Privat-docent, University Hospital Basel Jérôme GUICHEUX , Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes
Invité(s) :	Bruno LEFOURN , Chirurgien plasticien, Clinique Bretéché Pierre CORRE , Chirurgien maxillo-facial, CHU de Nantes
Directeur de Thèse :	Pierre WEISS , Professeur d'université/Praticien hospitalier, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Régis ROCHE , Directeur de STEM CIS SAS

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE

École Doctorale Biologie-Santé
Année 2016

Chirurgie reconstructrice et médecine régénératrice osseuse :
utilisation du tissu adipeux et de ses dérivés

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Recherche clinique, Innovation Technologique, Santé Publique

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent HIVERNAUD

Le 7 Avril 2016, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M. Guy MAGALON, Professeur Emérite, Université d'Aix-Marseille

M. Hervé PETITE, Directeur de Recherche, Université Paris Diderot

Directeur de thèse/ Co-directeur de thèse

M. Pierre WEISS, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Nantes

M. Régis ROCHE, Directeur de la société STEM CIS

Examineurs

M. Arnaud SCHERBERICH, Privat Dozent, University Hospital Basel

M. Jérôme GUICHEUX, Directeur de Recherche, Université de Nantes

Membres invités

M. Pierre CORRE, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Remerciements

Au professeur **Pierre Weiss** pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, pour avoir dirigé cette thèse avec optimisme et bonne humeur, pour avoir passé quelques après-midi avec moi à l'animalerie malgré son emploi du temps très chargé et pour avoir partagé mon enthousiasme lors de nos réunions.

Au docteur **Régis Roche** pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ces projets, d'avoir toujours su répondre à mes questions malgré la distance. Tu as gardé patience quand j'étais sûr d'avoir raison et tu m'as donné envie de continuer dans cette voie de recherche et développement.

Au docteur **Jérôme Guicheux**, qui m'a donné l'opportunité de réaliser mon M2, qui m'a fait assez confiance pour me recommander pour une thèse, qui a donné beaucoup de son temps libre pour cette thèse et a énormément participé à ma maturation scientifique. Toujours présent pour répondre à mes questions.

Au professeur **Guy Magalon** et au docteur **Hervé Petite** pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Au docteur **Arnaud Scherberich**, pour m'avoir suivi toute au long de cette thèse dans la bonne humeur et pour avoir accepté de venir observer la conclusion de ce travail.

Aux docteurs **Bruno Lefourn** et **Pierre Corre**, sans qui ce travail n'aurait jamais été possible. Deux très bons chirurgiens, animés d'une passion à la fois pour leur pratique clinique mais aussi pour la recherche. Merci de m'avoir accordé votre temps, votre gentillesse et vos conseils.

Merci à *Fanny Grimaud* et *Guillaume Mouallem*, les chirurgiens maxillo, que j'ai eu la chance d'encadrer pour leur master 2. J'ai passé non seulement des manips mais aussi des moments très agréables avec vous.

Merci à *Sophie Portron* pour m'avoir formé encadré et soutenu durant mon master et l'écriture du projet CIFRE. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ta bonne humeur.

Merci à mes collègues de STEM CIS, notamment *Anne-Claire Girard* pour ton aide sur les manips, l'écriture des papiers et tes conseils avisés de thésarde CIFRE. Ainsi qu'à *Franck Festy* pour m'avoir aidé dans mes manips à plusieurs reprises.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de la clinique Bretéché, le docteur *Lefourn* mais aussi les docteurs *Florence Lejeune* et *Fabien Baraer* ainsi que toutes leurs équipes qui permettent ce travail sur le tissu adipeux.

Les différentes plateformes de la SFR François Bonany ont une place importante dans ce travail et je tiens à remercier *Guylène Hamery* et l'UTE de la Fac de Médecine, *Marie Liaboëuf* et l'UTE de l'IRS-UN, *Myriam Robard* et la plateforme MicroPICell, *Juliette Desfrancois* et la plateforme Cytocell. Merci aussi au personnel du CRIP de l'ENVN de Nantes (*Olivier, Marion, Pierre, Borhane, Nicolas et Stéphane*) pour leur participation à un certain nombre de manips préliminaires.

Merci à *Paul Pilet* pour ces longues discussions et son aide, sa patience et sa passion sur toutes les parties MEB, Microscanner et culture musicale de cette thèse.

Merci aussi à toutes les autres personnes qui m'ont aidé dans mes manips : *Pauline B, Joëlle, Sophie, Julie, Maëva et Amadou*.

Plan de thèse

Chirurgie reconstructrice et médecine régénératrice osseuse : utilisation du tissu adipeux et de ses dérivés.

Avant-Propos.....	4
Liste des communications	6
Liste des Figures et Tableaux.....	10
Liste des Abréviations	13
Liste des annexes.....	16
PARTIE I : Le tissu adipeux en clinique	18
A. Notions histologiques sur le tissu adipeux.....	18
1) Les tissus adipeux.....	18
2) Le tissu adipeux blanc	19
3) L'adipocyte.....	23
a. Structure.....	23
b. Origine.....	23
c. Rôle de lipogenèse et de lipolyse	25
d. Contrôle du métabolisme énergétique	28
4) Rôle endocrine	29
B. Le lipotransfert.....	34
1) Définition	34
a. Principe.....	34
b. Histoire	34
c. Indications.....	37
2) Utilisation actuelle et pratique clinique.....	38
3) Les limites du procédé	41
a. La limite majeure : la résorption du greffon	41
b. Les débats qui divisent la communauté.....	42
4) Le développement de nouvelles techniques	44
C. Revue : Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements (APS 2015)	46

D.	L'étude de comparaison des nouveaux procédés de lipotransfert	48
E.	Article : Autologous Fat Grafting: a comparison study of four current commercial protocols	
	50	
F.	Discussion sur les différents procédés	52
G.	L'enrichissement du greffon	63
1)	Avec le Plasma Riche en Plaquettes.....	63
2)	Avec la Fraction Stromale Vasculaire.....	72
3)	Du lipotransfert à l'ingénierie tissulaire adipeuse	79
PARTIE II : La Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux		81
A.	La Fraction Stromale Vasculaire du Tissu Adipeux.....	82
1)	Définition	82
2)	Les "cellules stromales adipeuses"	83
B.	Propriétés de la Fraction Stromale Vasculaire	86
C.	Le potentiel clinique de la Fraction Stromale Vasculaire	89
1)	Utilisation actuelle	89
2)	Les études cliniques	89
3)	La Fraction Stromale Vasculaire pour l'ingénierie tissulaire osseuse.....	91
a.	Le rationnel du concept.....	91
b.	Les différentes études	91
PARTIE III : Développement d'un procédé intra-opératoire de régénération osseuse avec la Fraction Stromale Vasculaire.....		97
A.	La Médecine Régénératrice Osseuse	97
1)	Généralités sur le tissu osseux.....	97
a.	Organisation de l'os.....	97
b.	Cellules du tissu osseux.....	99
c.	Le processus de cicatrisation osseuse	102
2)	Les atteintes cliniques du tissu osseux	105
a.	Le contexte clinique dans la région maxillo-faciale.....	105
b.	Le gold standard et ses limites	109
3)	L'ingénierie tissulaire osseuse	111
a.	Définition.....	111
b.	Les biomatériaux	112
c.	Les sources cellulaires	116
d.	Les adjuvants	120
e.	Les modèles d'étude d'ingénierie tissulaire osseuse	126

f.	La survie et le suivi des cellules	127
g.	L'engouement vasculo-ostéogénique	133
B.	Article: Comparing “intra operative” tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. A nude rat study	138
C.	Discussion sur l'étude de comparaison des stratégies intra-opératoire d'ingénierie tissulaire osseuse	140
D.	Article: Bone regenerating potential of adipose tissue stromal vascular fraction for intraoperative bone tissue engineering	150
E.	Discussion sur la mise au point d'un procédé d'ingénierie tissulaire osseuse avec la FSV humaine	152
1)	Le modèle de base : BCP+FSV	152
a.	Les résultats en site ectopique	152
b.	Les résultats en site osseux	153
c.	Conclusion	153
d.	La stimulation intra-opératoire de la Fraction Stromale Vasculaire	153
2)	Le modèle stimulé : BCP+FSV+BMP2 / BCP+FSV+PRP	156
a.	Les résultats en site ectopique	160
b.	Les résultats en site osseux	162
PARTIE IV :	Le futur du tissu adipeux et de ses dérivés en clinique humaine	169
A.	Parenthèse réglementaire	171
B.	Conclusion	172
	Références Bibliographiques	174
	ANNEXES	190

Avant-Propos

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre le laboratoire INSERM U791 « Laboratoire d'Ingénierie OstéoArticulaire et Dentaire » et la société STEM CIS.

Le LIOAD est spécialisé dans l'ingénierie tissulaire dans le cadre des traitements des atteintes du système squelettique.

La société STEM CIS est spécialisée dans le traitement du tissu adipeux pour son utilisation en clinique.

Ces deux partenaires se sont associés dans le but de développer les connaissances sur l'intérêt clinique du tissu adipeux :

- d'une part sur la technique du lipotransfert, utilisée en comblement des tissus mous
- d'autre part sur l'éventuelle utilisation de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour des procédures intra-opératoires de régénération osseuse

Ce travail de thèse, dirigé et encadré par Pierre Weiss (directeur du LIOAD) et Régis Roche (directeur de STEM CIS) vous est présenté dans ce manuscrit.

La société STEMCIS

STEMCIS est spécialisée dans la recherche fondamentale et appliquée sur le tissu adipeux, et développe des protocoles et des dispositifs médicaux innovants en médecine humaine et vétérinaire.

STEMCIS réalise une recherche très active pour des indications chez l'humain, en utilisant les cellules régénératives adipocytaires. Ces recherches portent principalement sur l'adaptation d'un produit pouvant soigner l'arthrose chez l'homme, ainsi que sur le développement de produits pour traiter notamment les insuffisances vasculaires.

- Adip'sculpt, filiale de STEMCIS, produit et commercialise des dispositifs médicaux à usage unique pour la restauration des volumes des tissus mous (ex : MICROFILL® et MACROFILL®). Ces produits sont principalement utilisés dans le cadre de chirurgies reconstructrices et esthétiques, en ophtalmologie et en chirurgie maxillo-faciale.

- SCIVET, filiale de STEMCIS, produit et commercialise des kits de purification cellulaire, adaptés pour l'isolation des cellules régénératives à partir du tissu adipeux de cheval et de chien, pour des réinjection autologues, dans le traitement des tendinites et de l'arthrose.

Liste des communications

Publications sur le sujet de thèse :

Revue :

Hivernaud Vincent, Lefourn Bruno, Guicheux Jérôme, Weiss Pierre, Festy Franck, Girard Anne-Claire, Roche Régis: *Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements*, Aesthetic Plastic Surgery 2015

Girard Anne-Claire, **Hivernaud Vincent**, Festy Franck, Roche Régis: *Soft preparation of fat for lipotransfer*, Journal für Ästhetische Chirurgie 2015

Articles :

Hivernaud Vincent, Lefourn Bruno, Robard Myriam, Guicheux Jérôme, Weiss Pierre: *Autologous Fat Grafting: a comparison study of four current commercial protocols*, soumis à Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery

Grimaud Fanny and **Hivernaud Vincent**, Guicheux Jérôme, Portron Sophie, Pace Richard, Pilet Paul, Sourice Sophie, Wuillème Soraya, Longis Julie, Roche Régis, Espitalier Florent, Weiss Pierre and Corre Pierre: *Comparing « intra-operative » tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. A nude rat study*, soumis à Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine

Hivernaud Vincent, Corre Pierre, Mouallem Guillaume, Vézier Joëlle, Sourice Sophie, Portron Sophie, Guicheux Jérôme, Roche Régis, Weiss Pierre: *Bone regenerating potential of adipose tissue stromal vascular fraction for intraoperative bone tissue engineering*, en cours d'écriture

Communications orales :

Hivernaud Vincent, Lefourn Bruno, Guicheux Jérôme, Girard Anne-Claire, Weiss Pierre, Roche Régis: *Comparison of current protocols for Autologous Fat Grafting*, International

Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) New Orleans (USA) Novembre 2015

Hivernaud Vincent, Lefourn Bruno, Guicheux Jérôme, Girard Anne-Claire, Weiss Pierre, Roche Régis: *Comparison of current protocols for Autologous Fat Grafting*, Association Française des Chirugiens de la Face (AFCF) Montpellier (France) Juin 2015

Grimaud Fanny, **Hivernaud Vincent**, Vignes-Colombeix Caroline, Pilet Paul, Sourice Sophie, Mercier Jacques-Marie, Guicheux Jérôme, Weiss Pierre, Corre Pierre: *Reconstruction osseuse en territoire hypotrophique par association de céramiques phosphocalciques à des cellules de moelle osseuse et de tissu adipeux*, Association Française des Chirugiens de la Face (AFCF) Paris (France) Mai 2014

Communications affichées :

Hivernaud Vincent, Grimaud Fanny, Corre Pierre, Portron Sophie, Sourice Sophie, Pilet Paul, Guicheux Jérôme, Roche Régis, Weiss Pierre: *Comparing different bone tissue engineering strategies for the reconstruction of cranial defects in nude rats*, Journées françaises de la biologie des tissus minéralisés (JFBTM) Limoges (France) Mai 2014

Dans le cadre de l'école doctorale :

Hivernaud Vincent, Grimaud Fanny, Corre Pierre, Portron Sophie, Sourice Sophie, Pilet Paul, Guicheux Jérôme, Roche Régis, Weiss Pierre: *Use of the adipose tissue stromal vascular fraction in bone tissue engineering: nude rat calvaria*; Journées de l'école doctorale biologie santé Nantes-Angers (EDBS) Nantes (France) Décembre 2013

Hivernaud Vincent, Lefourn Bruno, Guicheux Jérôme, Girard Anne-Claire, Weiss Pierre, Roche Régis: *Comparison of current clinical protocols for Autologous Fat Grafting*; Journées de l'école doctorale biologie santé Nantes-Angers (EDBS) Nantes (France) Novembre 2014

Travaux en collaboration

Revue :

Girard Anne-Claire, **Hivernaud Vincent**, Gauthier Julien, Festy Franck, Roche Régis: *Lipofilling: critical points for successful fat grafting*, Journal für Ästhetische Chirurgie 2014

Articles :

Portron Sophie, **Hivernaud Vincent**, Merceron Christophe, Lesoeur Julie, Masson Martial, Gauthier Olivier, Vinatier Claire, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension provides cues for stem cell-based cartilage tissue engineering*, Cellular Physiology and Biochemistry 2015

Girard Anne Claire, Mirbeau Sophie, Gence Lydie, **Hivernaud Vincent**, Delarue Pierre, Hulard Olivier, Festy Franck, Roche Régis: *Effect of washes and centrifugation on the efficacy of lipofilling in the presence or absence of local anesthetic*, Plastic and Reconstructive Surgery Global Open 2015

Communications :

Portron Sophie, **Hivernaud Vincent**, Merceron Christophe, Lesoeur Julie, Masson Martial, Gauthier Olivier, Vinatier Claire, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *Low oxygen tension prevents the terminal hypertrophic differentiation of chondrogenic cells*, Gordon Research Conference (GRC), Les Diablerets (Switzerland) Avril 2013

Portron Sophie, **Hivernaud Vincent**, Merceron Christophe, Lesoeur Julie, Masson Martial, Gauthier Olivier, Vinatier Claire, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *Oxygen tension-mediated regulation of chondrogenic differentiation: application to stem cells based osteochondral repair*, European Calcified Tissue Society (ECTS), Lisboa (Portugal) Mai 2013

Portron Sophie, Vinatier Claire, **Hivernaud Vincent**, Merceron Christophe, Lesoeur Julie, Masson Martial, Gauthier Olivier, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *La tension en oxygène*

régule de façon inverse les phases précoces et tardives de la différenciation chondrogénique,
Groupe de Recherche GRIMIT, Paris (France), Septembre 2013

Portron Sophie, **Hivernaud Vincent**, Vinatier Claire, Merceron Christophe, Lesoeur Julie,
Masson Martial, Gauthier Olivier, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *Oxygen tension inversely
regulates early and late chondrogenic differentiation*, Tissue Engineering and Regenerative
Medecine International Society (TERMIS), Genova (Italy) Juin 2014

Le Tilly Elodie, **Hivernaud Vincent**, Guicheux Jérôme, Beck Laurent: *Evaluation de
l'arthrose chez la souris vieillissante par une approche non-invasive et fonctionnelle par
radiologie et analyse de la marche*, Journées d'études Longévité Mobilité Autonomie (LMA)
Nantes (France) Juin 2015

Mével Elsa, Merceron Christophe, Vinatier Claire, Lesoeur Julie, Masson Martial, **Hivernaud
Vincent**, Gauthier Olivier, Abadie Jérôme, Krisa Stéphane, Richard Tristan, Urban Nelly,
Wittrant Yohann, Beck Laurent, Guicheux Jérôme: *Procyanidins and hydroxytyrosol mixture
exhibits anti-osteoarthritic effects: from in vitro to in vivo evidences in a rabbit post-
traumatic OA model*, OsteoArthritis Research Society International OARSI, Amsterdam
(Netherlands) Mars 2016

Liste des Figures et Tableaux

Figures

Figure 1: Représentation schématique du tissu adipeux	19
Figure 2: Répartition corporelle du tissu adipeux blanc	20
Figure 3: Histologie du tissu adipeux.....	23
Figure 4 : Etapes de la différenciation adipocytaire.....	25
Figure 5: Mécanisme de lipogenèse	26
Figure 6: Mécanisme de lipolyse	27
Figure 7: Historique de l'utilisation du tissu adipeux comme produit de comblement en chirurgie plastique	36
Figure 8: Injection de petits lobules de graisse pour améliorer la prise de greffe.....	42
Figure 9: Aspect de la graisse après culture dans du milieu pendant 48h.....	52
Figure 10 : Volume de tissu restant après 48h de culture	53
Figure 11: Formation d'huile après 48h de culture.....	54
Figure 12: Sécrétion de MCP1 par le tissu en culture pendant 48h	55
Figure 13: Sécrétion d'IL6 par le tissu en culture pendant 48h	55
Figure 14 : Poids des greffons après 1 mois d'implantation en sous-cutanée de souris SCID	57
Figure 15: Score histologique des greffons après 1 mois d'implantation en sous-cutanée de souris SCID	57
Figure 16: Différentes canules d'aspirations utilisées lors de l'étude de comparaison.....	60
Figure 17 Etapes de préparation des "Plasma Riche en Plaquettes"	63
Figure 18 : Schéma représentatif de la FSV.....	82
Figure 19 : Interactions des CSA avec les différents acteurs de la réponse immunitaire	87
Figure 20 : Structure du tissu osseux	98
Figure 21 : Les étapes de la différenciation ostéoblastique/cytaire	100
Figure 22: Mécanisme de résorption osseuse ostéoclastique	101
Figure 23: Processus de cicatrisation d'un défaut osseux non-critique	102
Figure 24 : Processus de remodelage osseux, dernière étape de la cicatrisation osseuse	104
Figure 25: Exemple de fente unilatérale du palais primaire et secondaire.....	106
Figure 26: Exemple de défaut osseux mandibulaire post-extraction tumorale	107
Figure 27: Exemple de traumatisme osseux crânien	108

Figure 28: Exemple de perte osseuse alvéolaire post-extraction dentaire	108
Figure 29 : Arbre phylogénétique de la famille des BMP.....	121
Figure 30: Microscanner des défauts de calvaria	144
Figure 31: Analyse des défauts de calvaria en microscopie électronique à balayage et quantification du comblement en tissu minéralisé	145
Figure 32: Analyse histologique des défauts de calvaria	146
Figure 33: Observation microscopique des cellules implantées marquées au CM-DIL,	147
Figure 34: Aspect du gel de PRP après 30min.....	158
Figure 35: Viabilité des cellules de la FSV.....	159
Figure 36: Sécrétion de VEGF par les cellules de la FSV en culture avec du PRP, des BCP ou un mélange des deux.	160
Figure 37: Figure 7 de l'article pré-ératum montrant la repousse osseuse en site ectopique avec l'ajout de la BMP2.....	161
Figure 38: Figure de l'article pré-ératum montrant la repousse osseuse en site osseux avec la BMP2	163
Figure 39: Activité mitochondriale des cellules de la FSV après 2h de contact avec l'EPPI. 165	
Figure 39: Aspect à J4 des cellules de la FSV mise en culture après contact de l'EPPI ou du milieu pendant 2 heures.....	165

Tableaux

Tableau 1: Liste non exhaustive des adipokines sécrétées par le tissu adipeux.....	32
Tableau 2: Paramètre des canules d'aspirations utilisées dans l'étude de comparaison des procédés de lipotransfert	59
Tableau 3 : Différent types de concentrés plaquettaires.....	64
Tableau 4: Facteurs de croissances sécrétés par le PRP et leurs fonctions principales.....	67
Tableau 5: Différentes études sur le Platelet Rich Lipotransfer.....	71
Tableau 6: Etudes cliniques sur l'enrichissement du greffon par des cellules stromales dans le cadre du lipotransfert.....	77
Tableau 7 : Populations cellulaires de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux humain.....	83
Tableau 8: Différences phénotypiques entre la Moelle Osseuse et le Tissu Adipeux humain	84
Tableau 9: Différenciation in vitro des CSA dans les 3 principales lignées cellulaires mésenchymateuses	85
Tableau 10 : Etudes cliniques actuelles sur l'utilisation de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux humain.....	90
Tableau 11: Etudes publiées sur l'utilisation de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux pour la reconstruction osseuse	93
Tableau 12 : Classification possible des différents biomatériaux de reconstruction osseuse	113
Tableau 13: Biomatériaux osseux utilisés en clinique humaine selon leur origine (autre classification possible)	114
Tableau 14: Caractéristiques de sources cellulaires utilisées en ingénierie tissulaire osseuse	119
Tableau 15: Principaux facteurs de croissances angiogéniques à l'étude pour la régénération osseuse.....	134
Tableau 16: Exemples de sources cellulaires envisagées pour la co-culture dans le contexte vasculo-ostéogénique	136
Tableau 17: Concentrations cellulaires utilisées dans les différentes études sur la FSV humaine en ingénierie tissulaire osseuse.....	141
Tableau 18: Utilisation de la rhBMP2 dans des modèles de défauts de calvaria et quantité de BMP2 utilisée.....	156
Tableau 19: Cadre réglementaire des Médicaments de Thérapie Innovante (ANSM)	172

Liste des Abréviations

AAM	Matrice Adipeuse Acellulaire
AAV	Virus Adéno-Associé
ADN	Acide Désocytiribonucléique
AFG	Autologous Fat Grafting
AGNE	Acides Gras Non Estérifiés
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Ang-1	Angiopoietin-1
ANGPTL4	Angiopoietin-Like 4
ARN	Acide Ribonucléique
ASAPS	American Society for Aesthetic Plastic Surgery
ATP	Adenosine Triphosphate
BCP	Phosphate de Calcium Biphase
BCR	Récepteur des Lymphocytes B
BCT	Breast Conserving Therapy
BMP	Protéines de la Morphogénèse Osseuse
BMU	Basic Multicellular Units
Ca/P	Calcium/Phosphate
CAL	Cell Assisted Lipoaspiration
cc	centimètre cube
CFU-F	Colony Forming Unit Fibroblast
CSA	Cellules Stromales Adipeuses
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM (CSMO)	Cellules Stromales Mésoenchymateuses (Cellules Stromales de la Moelle Osseuse)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DBM	Matrice Osseuse Déminéralisée
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ES	Cellules Souches Embryonnaires
FGF	Fibroblast Growth Factor
Foxn1	Forkhead box protein N1
FSV	Fraction Stromale Vasculaire
GAG	Glycosaminoglycane
GDF-5	Growth and Differentiation Factor 5
GFP	Green Fluorescent Protein
GLUT4	Glucose Transporter type 4
GMMA	Glycol Méthyl Méthacrylate
HA	Hydroxyapatite
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
HIS	Hybridation In Situ

HPS	Hémalun-Phloxine-Safran
HUVEC	Cellules Endothéliales de sang de cordon
IFATS	International Federation for Adipose Therapeutics and Science
IHC	Immunohisto Chimie
ILGF	Insuline Like Growth Factor
IL-X	Interleukine X
IP10	Interferong gamma-induced Protein 10
iPS	Cellules Pluripotentes induites
ISAPS	International Society of Aesthetic Plastic Surgery
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITO	Ingénierie Tissulaire Osseuse
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LPL	Lipoprotein Lipase
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MCP1 (CCL2)	Monocyte Chimoattractant Protein 1 (Chemokine Ligand 2)
MEM α	Minimum Essential Medium Eagle alpha
MOT	Moelle Osseuse Totale
Nell-1	Nel-like molecule 1
NIH	National Institutes of Health
NK	Natural Killer
OC/BGLAP	Osteocalcin/Bone GLA Protein
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAL	Power Assisted Lipoaspiration
PB-EPC	Progéniteurs Endothéliaux du sang périphérique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Poly-(ϵ -caprolactone)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PF-4	Platelet Factor-4
PFA	Paraformaldehyde
PGA	Acide Poly-Glycolique
PLA	Acide Poly-Lactique
PLGA	Poly-(lactide-co-glycolide)
PRF	Fibrine Riche en Plaquettes
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PTH	Parathyroïd Hormone
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B ligand
RBP4	Retinol Binding Protein 4
rhBMP2	recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SHH	Sonic Hedgehog
SVF	Serum de Veau Fétal
TCR	Récepteur des Lymphocytes T

TF	Tissue Factor/Platelet Tissue Factor
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TSG-6	Tumor Necrosis Factor-inducible Gene 6
UCP1	Uncoupling Protein 1 (Thermogenin)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WAL	Water Assisted Lipoaspiration
β -TCP	Phosphate β -Tricalcium

Liste des annexes

Annexe I : Matériels et Méthodes utilisés lors du travail de thèse

Annexe II : Dossier de saisine : Injection de graisse en sous-cutanée de souris SCID

Annexe III : Dossier de saisine : Implantation de biomatériaux en sous-cutanée de souris nude

Annexe IV : Dossier de saisine : Implantation de biomatériaux en calvaria de rat nude

Annexe V : Dossier de saisine : Implantation de biomatériaux en calvaria de rat Wistar

PARTIE I :
Le Tissu Adipeux
en Clinique

PARTIE I : Le tissu adipeux en clinique

A. Notions histologiques sur le tissu adipeux

1) Les tissus adipeux

Il existe différents types de tissus adipeux, ayant pour point commun la présence de cellules nommées adipocytes. Ces adipocytes sont des cellules qui ont pour principale caractéristique de stocker des lipides au sein de leur cytoplasme. Les différents tissus adipeux sont les suivants :

- Le tissu adipeux blanc, le plus répandu dans l'organisme présent au niveau sous-cutané ou viscéral. Les adipocytes qui le composent stockent des lipides pour former une réserve d'énergie disponible à tout l'organisme en cas d'effort.

- Le tissu adipeux brun a un rôle de thermorégulation. L'adipocyte brun est riche en cytochromes et mitochondries et oxyde les acides gras sans induire de synthèse d'adénosine tri-phosphate (ATP), ceci grâce à l'expression de l'Uncoupling Protein I (UCPI). Ce phénomène permet ainsi la dispersion de l'énergie sous forme de chaleur. Cette graisse brune est présente chez l'adulte au niveau du rachis et en zone supra-claviculaire (Cohen and Spiegelman 2015).

- Le tissu adipeux beige, découvert récemment, possède des adipocytes semblables à ceux du tissu brun (exprimant UCP1). A la différence du tissu adipeux brun, la graisse beige serait induite par des stimuli thermiques ou hormonaux et constituerait ainsi un mécanisme de thermogénèse adaptative. Elle apparaît au sein du tissu adipeux blanc sous-cutané (Cohen and Spiegelman 2015).

- Le tissu adipeux médullaire est présent au sein de la moelle osseuse, elle-même présente dans les os longs. Il apparaît lors de la croissance des os long pour combler l'augmentation de volume des cavités osseuses. Ce tissu adipeux médullaire gagne en volume avec l'âge au dépend de la moelle osseuse (la moelle « jaune » prenant ainsi le pas sur la « moelle rouge »). Les adipocytes du tissu adipeux médullaire semblent posséder des caractéristiques phénotypiques de leurs homologues du tissu adipeux brun et blanc (Krings, Rahman et al. 2011). Le rôle de ce tissu est peu connu mais il semble avoir des propriétés endocrines importantes notamment par la sécrétion d'adiponectine (Cawthorn, Scheller et al. 2014).

2) Le tissu adipeux blanc

Toutefois lorsqu'il est mention du tissu adipeux en clinique, il est souvent fait référence au tissu adipeux blanc communément appelé « graisse » ou « gras ». Il représente plus de 20% de la masse de l'organisme (Peterson, Czerwinski et al. 2003) (dépendant du sexe, de l'âge et des individus).

Le rôle principal de ce tissu adipeux est d'assurer le stockage d'énergie au sein de l'organisme (sous forme de triglycéride) pour permettre la formation d'adénosine tri-phosphate (ATP).

Le tissu adipeux blanc possède deux phases cellulaires :

- la phase adipocytaire qui est constituée des adipocytes regroupés sous la forme de lobules adipeux séparés par des travées conjonctives et élastiques. Cette phase adipocytaire représente la majorité du volume du tissu. On estime à environ 4 à 5 millions le nombre d'adipocytes par cm^3 de tissu adipeux (nombre variant selon la taille des adipocytes, dépendante du stockage de lipides) (Doi, Tanaka et al. 2013).

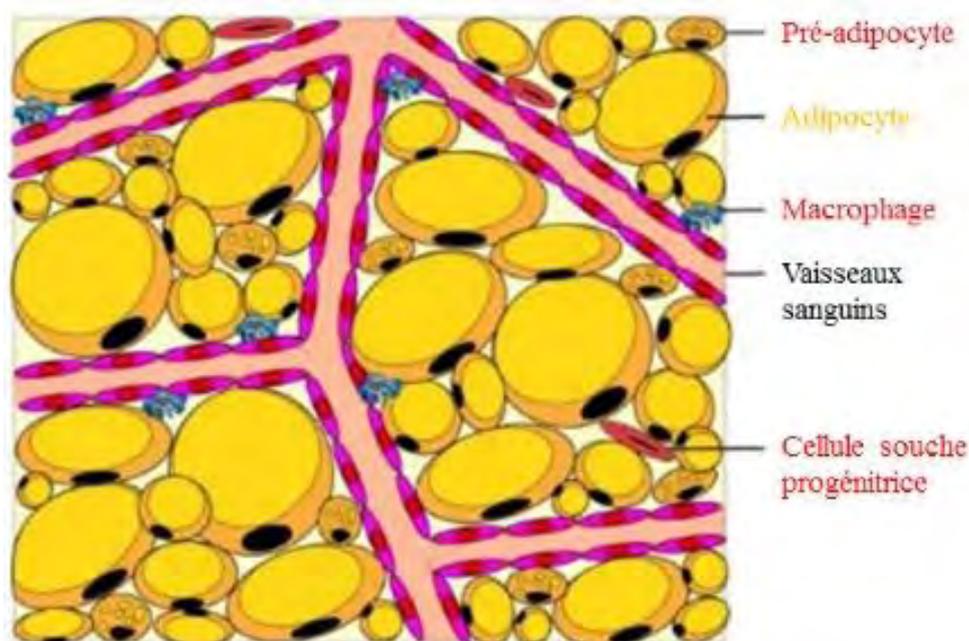


Figure 1: Représentation schématique du tissu adipeux
(site biologiedelapeau.fr)

- la fraction stromale vasculaire (FSV) correspond à la deuxième phase cellulaire du tissu adipeux. Elle est constituée de toutes les cellules qui ne sont pas des adipocytes et se situent

au niveau du stroma du tissu adipeux comme leur nom l'indique. Leur nombre est plus difficile à évaluer mais l'on peut considérer qu'il se trouve environ 1 million de cellules par cm^3 . Cette valeur varie selon les individus (avec l'hypertrophie adipocytaire par exemple) et les protocoles de digestion du tissu utilisés pour isoler cette FSV. La littérature rapporte des valeurs allant de 40 000 à 1,3 millions de cellules par gramme de tissu adipeux (Doi, Tanaka et al. 2013).

Le tissu adipeux blanc est réparti dans tout le corps au niveau sous-cutané ainsi qu'au niveau viscéral. Sa répartition (figure 2) (Wronska and Kmiec 2012) va dépendre de l'âge, du sexe et de la morphologie des individus.



Figure 2: Répartition corporelle du tissu adipeux blanc
(d'après Wronska et al. *Acta Physiologica* 2012)

Concernant les dépôts graisseux viscéraux, des différences de taille cellulaire ainsi que d'expression de gènes existent selon la localisation du dépôt. La distribution du tissu adipeux dans les différents tissus présentés figure 2 va dépendre de l'âge, du genre, des individus et des facteurs environnementaux.

Concernant plus particulièrement le tissu adipeux sous-cutané, celui-ci est présent dans tout le corps entre le derme et le fascia superficialis : il s'agit de la graisse *superficielle*. Dans certaines zones, il existe du tissu adipeux sous-cutané situé entre le fascia superficialis et le muscle. Cette graisse sous-cutanée dite *profonde* est généralement localisée au niveau des crêtes iliaques (hanches) et des trochanters (« culotte de cheval ») chez la femme, et dans la région sous-ombilicale de l'abdomen chez l'homme.

Cette répartition de la graisse aussi bien sous-cutanée que viscérale selon le genre des individus est à l'origine de la distinction entre l'obésité androïde (dans le haut du corps dite « en pomme »), souvent associée à une hypertrophie des adipocytes viscéraux et l'obésité gynoïde (dans le bas du corps dite « en poire »), souvent associée à une hyperplasie des adipocytes sous-cutanée (Laforest, Labrecque et al. 2015).

Le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral, appartiennent tous deux au tissu adipeux blanc mais possèdent certaines différences l'un par rapport à l'autre.

De manière générale, le tissu adipeux sous-cutané contient des adipocytes plus grands et donc moins nombreux (sur une surface donnée) que son homologue viscéral (Laforest, Labrecque et al. 2015).

3) L'adipocyte

a. Structure

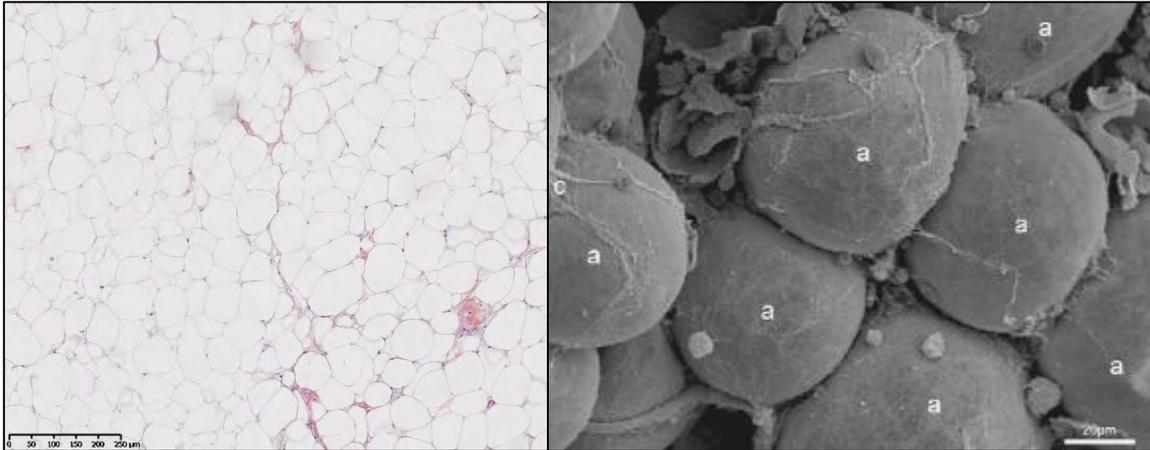


Figure 3: Histologie du tissu adipeux: Coloration HPS à gauche (barre=250µm) et Observation au microscope électronique à balayage à droite (barre=20µm)
a=adipocyte et c=fibre de collagène (d'après : observation personnelle et Panattiere et al. E J Histochemistry)

La majorité du volume du tissu adipeux est dû aux adipocytes dont la taille varie selon la quantité de lipides stockés dans leur vacuole. La cohésion des adipocytes est assurée par une fine matrice collagénique. Au contact de cette matrice se trouvent des cellules de plus petite taille qui sont les cellules de la fraction stromale vasculaire (FSV) (Panattiere, Accorsi et al. 2011).

b. Origine

Les adipocytes sont des cellules qui dérivent de progéniteurs adipeux/ pré-adipocytes eux-mêmes issus de cellules souches mésenchymateuses. Ce sont ces progéniteurs qui sont responsables du renouvellement du pool de cellules adipocytaires (les adipocytes ne se divisant pas). Dans certains cas d'augmentation de la masse adipeuse (comme l'obésité), une augmentation du nombre de cellules adipeuses (hyperplasie) va s'opérer, rendue possible par ces progéniteurs adipeux.

L'étude *in vitro* de différents modèles de différenciation adipocytaire a permis de discerner 2 phases dans ce phénomène (figure 4) :

- La première est l'étape de « **Détermination** » qui voit l'engagement des cellules souches mésenchymateuses dans la voie adipocytaire. Elles deviennent alors des adipoblastes. Durant cette phase la cellule gagne en volume tout en remaniant son cytosquelette pour permettre sa croissance. C'est sous l'influence de différents signaux environnementaux dont la plupart sont hormonaux que l'adipoblaste s'engage définitivement dans la voie adipocytaire et devient un pré-adipocyte.

- La deuxième étape est celle de « **Différenciation adipocytaire** » proprement dite où les pré-adipocytes acquièrent leurs propriétés de stockage des lipides, lipolytiques, de nouvelles sensibilités aux hormones et leur capacité sécrétoire endocrine pour devenir des adipocytes matures. Il est possible de distinguer les événements de différenciation dits précoces de ceux plus tardifs. De manière précoce le pré-adipocyte se divise de manière limitée pour donner un pool de cellules pré-adipocytaires : c'est l'expansion clonale. Puis lors de la phase terminale, les cellules présentent un fort potentiel de lipogenèse (synthèse d'acides gras grâce notamment au transporteur de glucose GLUT4). De manière concomitante, l'adipocyte stocke des acides gras apportés par la circulation (notamment par les very low density lipoprotein – VLDL). Ces lipides sont stockés dans plusieurs vacuoles qui augmentent d'abord en volume puis finissent par fusionner en une vacuole unique. Parallèlement, le potentiel de lipolyse de ces cellules se développe (notamment grâce à la lipase hormono-sensible). Enfin la cellule devient capable de synthétiser de nombreuses molécules (adipokines) lui permettant d'assurer son rôle endocrine.

Cette différenciation fait intervenir de nombreux facteurs de croissance dont l'implication est très bien décrite dans la revue Fève *et al.* en 2007 (Fève and Mercier 0100).

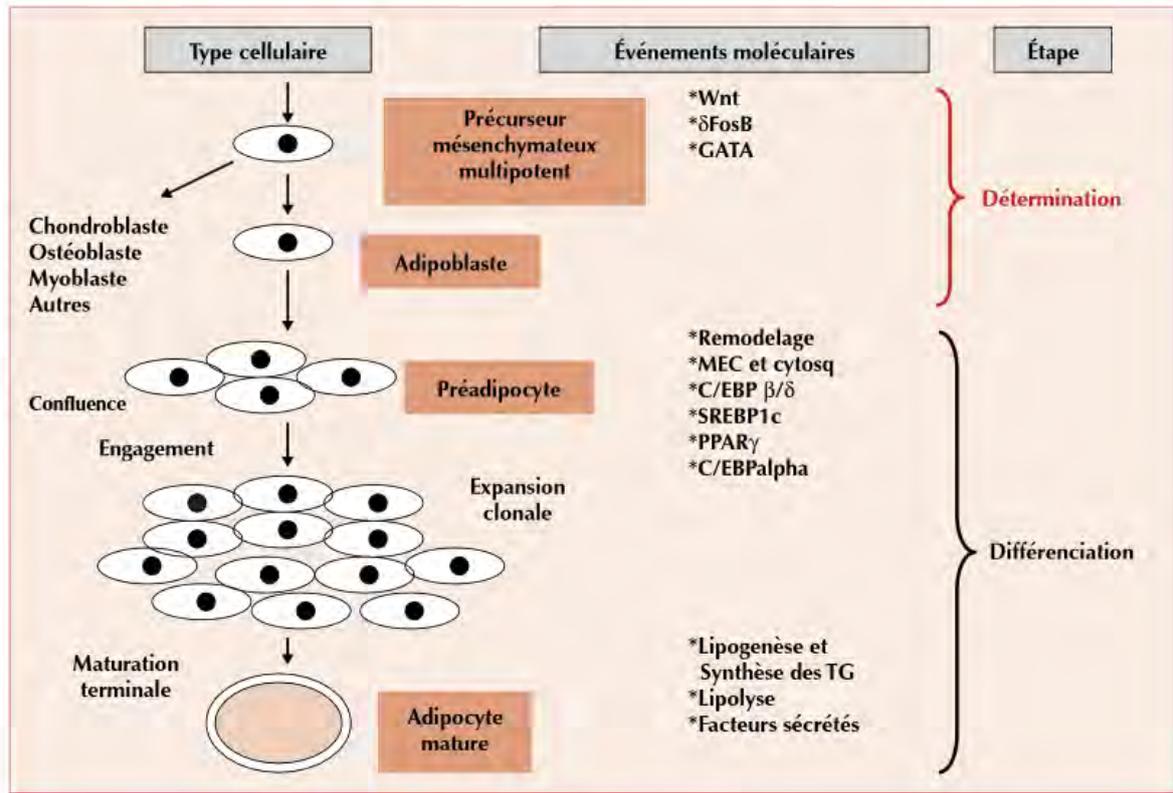


Figure 4 : Etapes de la différenciation adipocytaire (Fève et al. mtc 2007)

c. Rôle de lipogenèse et de lipolyse

Les gouttelettes lipidiques contenues dans les adipocytes sont présentes dans le cytoplasme et contiennent 95% de triglycérides. Les triglycérides sont composés de glycérol et de trois chaînes d'acide gras.

Lipogenèse : Les triglycérides sont issus de l'alimentation et sont absorbés dans l'organisme au sein des cellules épithéliales de l'intestin (sous formes d'acides gras libres et de monoglycérides). Ceux-ci passent ensuite dans la circulation lymphatique (sous forme de triglycérides principalement) puis dans la circulation sanguine avant d'être absorbés par les adipocytes (sous forme glycérol et d'acides gras libres) qui vont re-synthétiser des triglycérides pour les stocker dans leurs gouttelettes lipidiques.

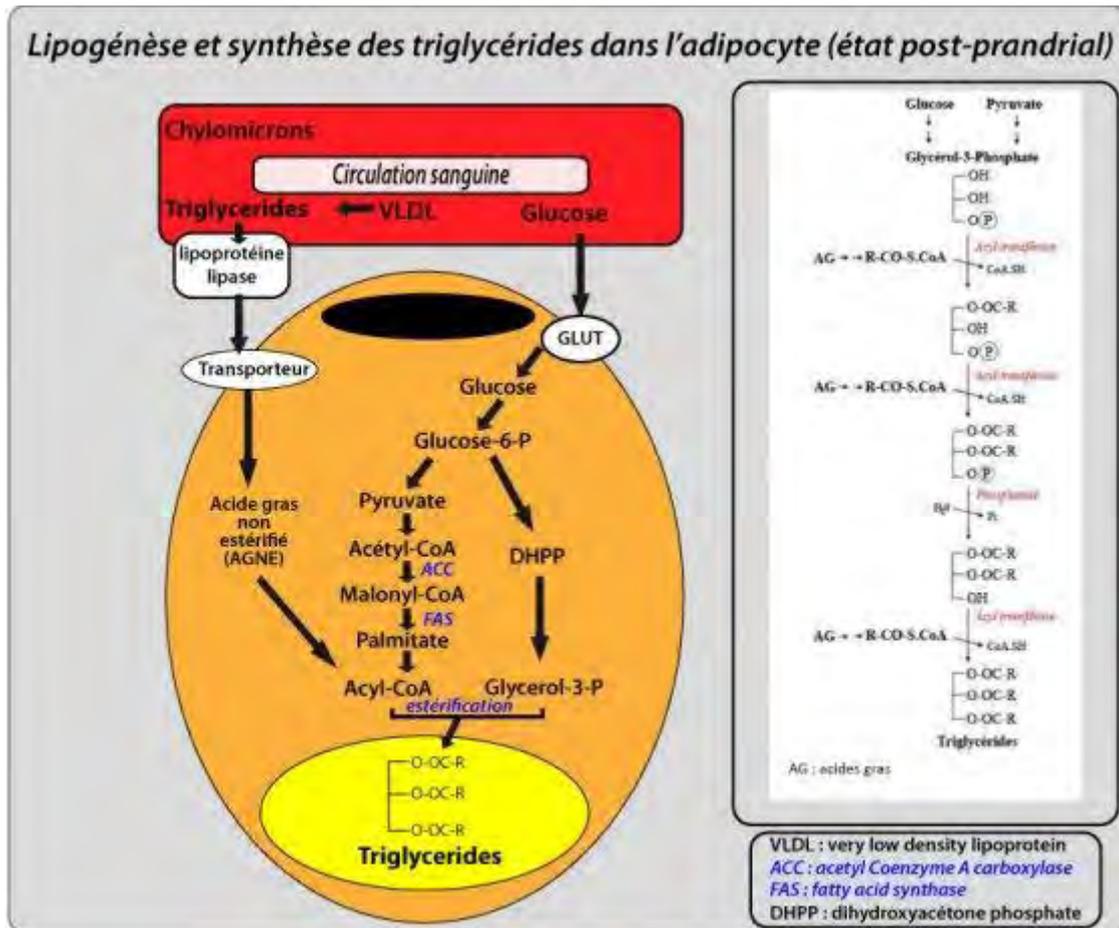


Figure 5: Mécanisme de lipogenèse (schéma de biologiedelapeau.fr)

Lipolyse : Ces lipides stockés par les adipocytes peuvent être mobilisés pour permettre la création d'énergie sous forme d'ATP (adénosine tri-phosphate) en cas d'effort (les liaisons reliant l'adénosine aux groupements phosphates sont des liaisons de forte énergie, énergie qui est libérée quand une de ces liaisons est rompue). Le glucose représente la source principale de production d'ATP par les mitochondries mais, en cas d'effort prolongé, si les réserves de glucoses ne sont pas suffisantes, les cellules musculaires peuvent utiliser les lipides, sous formes d'acides gras non estérifiés (AGNE) pour produire de l'ATP. Les adipocytes peuvent libérer ces AGNE dans la circulation par un phénomène de lipolyse qui correspond à l'hydrolyse des triglycérides stockés dans les vacuoles lipidiques. Cette activité de lipolyse est dépendante de différentes lipases cytoplasmiques qui interviennent de manière séquentielle (Dugail and Clément 0200).

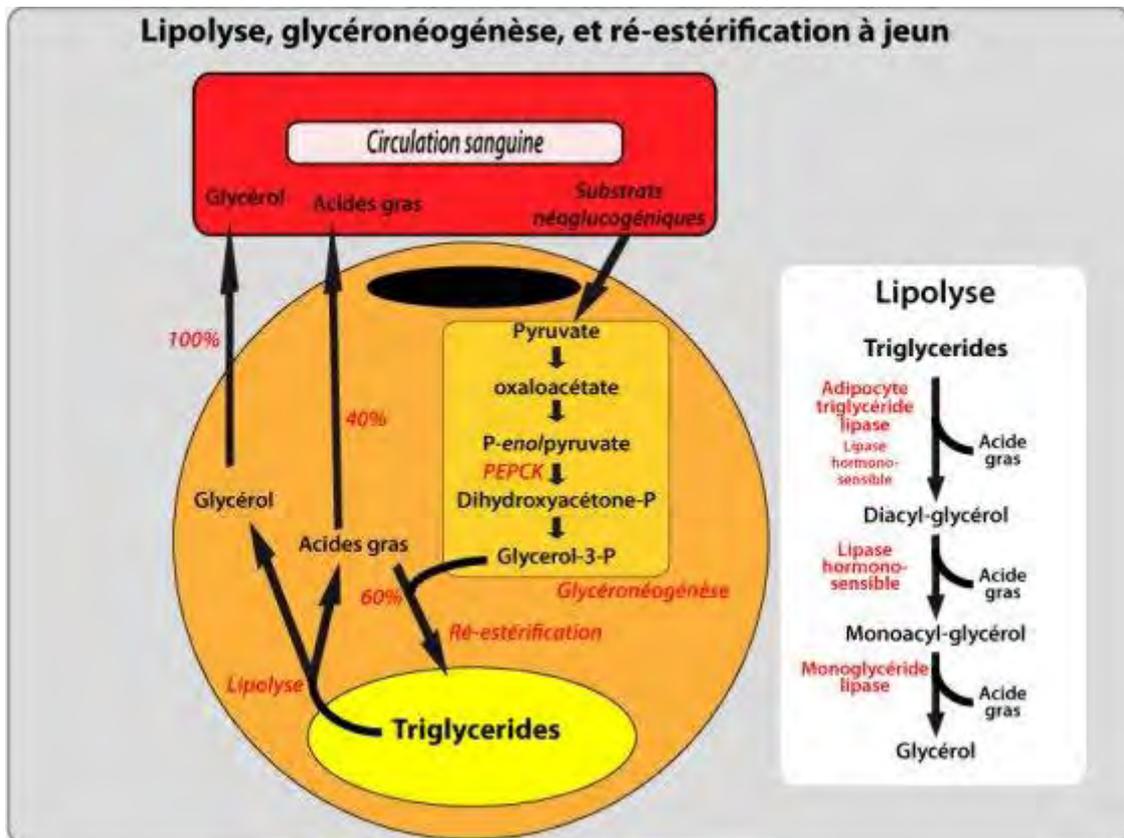


Figure 6: Mécanisme de lipolyse (schéma de biologiedelapeau.fr)

Parmi les lipases plasmatiques impliquées, la triglycéride lipase adipeuse permet cette conversion des triglycérides en AGNE. C'est une lipase dite hormono-sensible ainsi, le phénomène de lipolyse est donc sensible à différents facteurs endocrines (*i.e.* adrénaline, catécholamines, insuline, péptides natriurétiques...) produits lors de la prise alimentaire, de l'effort, du stress ou encore du jeûne.

En cas d'activité aérobie du muscle, les AGNE sont captés par les cellules musculaires et transformés en Acyl-CoA qui est ensuite oxydé lors du processus de β -oxydation. Ce dernier est couplé au cycle de Krebs et produit des protons de haute énergie qui servent à la production d'ATP grâce à la chaîne respiratoire des mitochondries.

d. Contrôle du métabolisme énergétique

L'adipocyte est une cellule insulino-sensible : en effet l'insuline augmente le stockage des lipides par les adipocytes alors que les catécholamines vont avoir tendance à diminuer celui-ci.

Par ailleurs, l'adipocyte sécrète différentes protéines/enzymes dont l'action est autocrine ou paracrine et qui ont un impact sur le stockage de lipides. Citons notamment la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse les triglycérides transportés par les « very low density lipoprotein » (VLDL) et les chylomicrons, cette action va libérer les acides gras qui seront captés par la cellule adipeuse (Ailhaud 1998, Kersten 2014). L'activité de la LPL augmente en période postprandiale et diminue au cours du jeûne. La LPL n'est qu'un exemple de protéine sécrétée par les adipocytes et régulant leur stockage de lipide.

4) Rôle endocrine

L'activité sécrétrice de l'adipocyte ne se limite pas à un rôle autocrine/paracrine mais concerne l'ensemble de l'organisme. L'exemple le plus connu est la sécrétion par les adipocytes matures de la leptine. La leptine est une hormone qui régule notamment la sensation de satiété. En cas d'augmentation des stocks de lipides dans le tissu adipeux, les adipocytes augmentent la sécrétion de leptine qui influe sur le système nerveux central (*e.g.* hypothalamus) pour réduire l'appétit. L'absence ou l'inactivité de la leptine que ce soit sur des modèles animaux ou dans le cadre de syndrome chez l'homme se traduit par une forte obésité et des désordres hormonaux sévères (Wabitsch, Funcke et al. 2015).

Une autre adipokine sécrétée exclusivement par les adipocytes est l'adiponectine qui promeut la sensibilité à l'insuline au niveau du foie et possède donc un rôle sur l'homéostasie du glucose (Anghel and Wahli 2007). Toutefois son action en tant qu'hormone affecte aussi le système immunitaire (Esmaili, Xu et al. 2014) et régule ainsi l'inflammation dans différents contextes physiologiques.

La liste des molécules (peptidiques ou non) sécrétées par les adipocytes est encore longue. De manière générale, le tissu adipeux représente sans doute le plus large organe endocrine humain. Les cellules adipeuses sont en effets capables de sécréter de nombreuses hormones, facteurs de croissance, cytokines mais aussi les récepteurs de certaines de ces molécules. Ce protéome complexe l'implique dans la régulation de la prise alimentaire mais aussi dans l'homéostasie énergétique, dans l'immunité ou encore dans la régulation de la pression sanguine (Coelho, Oliveira et al. 2013).

Le tableau ci-dessus résume une partie de ces molécules sécrétées par le tissu adipeux (adipocytes et fraction stromale vasculaire) (Anghel and Wahli 2007, Rodríguez, Ezquerro et al. 2015).

Protéines	Type(s) cellulaire(s) l'exprimant	Effets
<i>Adipokines impliquées dans le métabolisme énergétique</i>		
Adiponectine	Adipocytes	Augmente l'oxydation des acides gras, diminue les niveaux de glucose plasmatique, augmente la sensibilité à l'insuline, anti-inflammatoire, antiathérogène
Adipsine	Adipocytes	Stimule le stockage des Triglycérides, Inhibe la lipolyse
ANGPTL4/FIAF	Adipocytes	Inhibe la LPL, augmente la tolérance au glucose, induit la stéatose hépatique et la lipolyse
Apeline	Tissu adipeux	Inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose
ASP		Régule le métabolisme du glucose et des lipides
Cathepsine S, L, K		Promeut l'adipogenèse et le remodelage de la matrice extra-cellulaire
FGF-21		Stimule l'absorption de glucose par les adipocytes, augmente la thermogenèse et la dépense d'énergie
FNDC5/Irisine		Adipokine impliquée dans la myogenèse et la genèse de graisse brune
HMGB1		Alarmine impliquée dans la sécrétion d'insuline et la réparation d'ADN
IGF-1		Stimule la prolifération et la différenciation des adipocytes
Leptine	Adipocytes	Signal de satiété à l'hypothalamus, stimule la lipolyse, inhibe la lipogenèse, améliore la sensibilité à l'insuline, augmente le métabolisme du glucose, stimule l'oxydation des acides gras
MMP2 et 9		Protéines impliquées dans l'adipogenèse
Omentine	Cellules de la FSV	Améliore le transport de glucose stimulé par l'insuline, module l'action de l'insuline
Pref-1	Pré-adipocytes	Inhibe l'adipogenèse
RBP4	Adipocytes	Promeut la résistance à l'insuline
Resistine	Adipocytes	Augmente la résistance à l'insuline et la production de glucose chez les rongeurs
TIMP-1		Diminue l'adipogenèse

Vaspinine	Adipocytes	Améliore la sensibilité à l'insuline, supprime la production de résistine, de leptine et de TNF- α
Visfatine/NAMPT	Adipocytes	Effets insulino-mimétiques, augmente la prise de glucose, améliore la sensibilité à l'insuline, action pro-adipogénique et lipogénique
Zinc α 2-glicoprotéine		Effets lipolytiques
<i>Adipokines pro-inflammatoires</i>		
Calprotectine		Facteur pro-inflammatoire, impliqué dans l'adhésion cellulaire, le chimiotactisme et l'activité anti-microbienne
CRP		Inflammation
Fetuline A		Associé à l'inflammation induite par les lipides
Hepcidine		Cytokine pro-inflammatoire qui active MMP9
IL-1	Macrophages	Expression augmentée en cas d'obésité
IL-6	Adipocytes	Diminue la signalisation de l'insuline et de la leptine
NUCB2/Nefasine-1		Impliqué dans la réponse inflammatoire
Progranuline		Chimioattractant et impliqué dans l'inflammation du tissu adipeux
SAA		Produit en réponse à l'infection, l'inflammation et les dégâts tissulaires
TNF- α	Adipocytes/Macrophages	Induit la résistance à l'insuline et augmente la lipolyse, diminue l'expression d'adiponectine et augmente l'expression d'IL-6
TWEAK		Cytokine pro-inflammatoire
WNT5a		Anti-adipogénique et pro-inflammatoire
YKL-40		Pro-inflammatoire qui stimule la réponse immunitaire, le remodelage de la matrice extra-cellulaire et l'angiogenèse
<i>Adipokines anti-inflammatoires</i>		
HGF		Anti-inflammatoire et adipogénique
IL-10	Adipocytes/Macrophages	Niveaux circulants augmentés en cas d'obésité
IL-1Ra	-	Produit en réponse au stress
PEDF		Glycoprotéine aux effets anti-angiogénique, anti-oxydant, anti-inflammatoire et lipolytique

PGI2 et PGF2		Régule l'inflammatoire et la coagulation
SRFP5		Propriétés anti-inflammatoires
STAMP2		Réduit le recrutement des macrophages et induit une polarisation vers le phénotype M1
TGF- β	Adipocytes/Macrophages	Niveaux circulants augmentés en cas d'obésité
WISP1		Régule l'adipogenèse et l'inflammation du tissu adipeux
<i>Chemokines</i>		
Chemerine		Chemoattractant impliqué dans l'adipogenèse et la réponse immunitaire
Haptoglobine		Chimiotactique et pro-angiogénique
Hsp72		Recrutement de neutrophiles et de cellules natural killer
IL8/CXCL8	Cellules de la FSV	Expression augmentée en cas d'obésité
IP10/CXCL10	Adipocytes/Macrophages	Niveaux plasmatiques augmentés dans les premiers stades du diabète
MCP1 (CCL2)	Adipocytes/Macrophages	Augmente la lipolyse et la sécrétion de leptine, diminue la prise de glucose stimulée par l'insuline
RANTES	Lymphocytes T	Expression augmentée en cas de diabète de type II
<i>Protéines vasculaires</i>		
Angiotensine II	Adipocytes	Lié à l'inflammation vasculaire, effet vasoconstricteur
Cardiotrophine-I		Impliquée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes
Clusterine		Lipoprotéine pro-angiogénique
Ghreline		Diminue la pression sanguine
PAI1	Adipocytes	Niveaux circulants augmentés en cas d'obésité, lié à la résistance à l'insuline
TF	-	Expression augmentée en cas d'obésité
VEGF		Stimule l'angiogenèse

Tableau 1: Liste non exhaustive des adipokines sécrétées par le tissu adipeux
(d'après Anghel et al. Cell Research 2007 et Rodríguez et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2015)

Toutefois même si le rôle physiologique du tissu adipeux dans la régulation du métabolisme énergétique est passionnant, complexe, et loin d'être entièrement décrypté, c'est l'utilisation clinique de ce tissu dont nous allons discuter dans ce manuscrit, et dans un premier temps le concept de lipotransfert appliqué à la chirurgie plastique et reconstructrice. Cependant, la compréhension de la physiologie de ce tissu permet d'ores et déjà de saisir que son utilisation pour la chirurgie plastique ne se limitera pas à un rôle purement volumateur, mais également à un rôle réellement réparateur dans certaines indications.

B. Le lipotransfert

Bien longtemps avant de connaître les propriétés précédemment énoncées, le tissu adipeux sous-cutané a intéressé les cliniciens pour sa facilité de prélèvement et le volume tissulaire qu'il représente. Et ce n'est finalement qu'un siècle plus tard que la biologie s'est intéressée à ses composantes cellulaires.

1) Définition

a. Principe

Le principe du lipotransfert est simple : combler un déficit de tissu mou par l'apport du tissu adipeux prélevé sur un autre site. Autrement dit, transférer la graisse là où l'on en a besoin.

Plusieurs dénominations existent pour décrire ce procédé : le transfert de graisse autologue, la greffe grasseuse, le lipotransfert, le lipomodelage, la liposculpture ou encore la lipostructure® (terme employé pour parler de la méthode décrite par le docteur Sydney Coleman) (Coleman and Saboeiro 2007). L'histoire et les détails techniques de l'utilisation du lipotransfert seront discutés dans les paragraphes suivants.

b. Histoire

L'histoire du lipotransfert a déjà été très bien détaillée par Mojallal (Mojallal and Foyatier 2004), et peut se décrire de manière succincte en 3 périodes.

➤ 1890-1970

La première d'entre elle se situe entre les années 1890 et les années 1970 et concerne les premières utilisations reportées de la technique de transfert de graisse. En effet de nombreux auteurs s'accordent pour attribuer la première opération rapportée de lipotransfert à Neuber, chirurgien allemand, qui décrit en 1893 le traitement d'un défaut facial à l'aide de tissu grasseux prélevé sur le patient par excision. Le greffon est prélevé sur l'avant-bras pour combler une cicatrice faciale.

Dans les décennies qui ont suivi, d'autres chirurgiens se sont essayés à cette technique pour diverses applications nécessitant l'apport d'un volume dans un tissu mou. Lexer en 1910 rapporte une utilisation esthétique avec des greffes adipeuses pour lutter contre les effets du vieillissement. Dès cette époque se pose le problème de la résorption du greffon (50% à 1 an) majoritairement imputées à la nécrose des cellules du centre du greffon, due au délai de revascularisation post-implantation.

➤ 1970-1990

La plus grande avancée dans ce domaine est technologique et correspond à l'apparition de la lipoaspiration vers 1974 mise au point par les docteurs Fischer. Cette avancée est mise à profit pour le lipotransfert. Elle est exportée dans différents pays par le Dr Illouz notamment et permet le prélèvement du tissu à greffer de manière moins traumatique et avec moins de risque de contamination que par excision. C'est dans les 2 décennies qui suivront que la technique de lipotransfert va se généraliser en chirurgie plastique notamment.

➤ 1990-

Dans le début des années 1990 vient l'avènement d'une nouvelle ère pour le lipotransfert. Ceci sous l'impulsion du Dr Coleman qui propose un protocole standardisé de prélèvement, traitement et injection du tissu adipeux pour améliorer les résultats à long terme en étant le moins traumatique possible pour le greffon. De nos jours c'est encore ce protocole qui est majoritairement utilisé pour réaliser un transfert de graisse et qui porte le nom du Dr Coleman ou le nom commercial de Lipostructure®. Le prélèvement doit être fait avec une dépression minimum. La graisse ne doit ni être comprimée, lavée, filtrée, ni en contact avec l'air ou congelée. Enfin, l'injection doit être faite en petits volumes et avec une pression limitée.

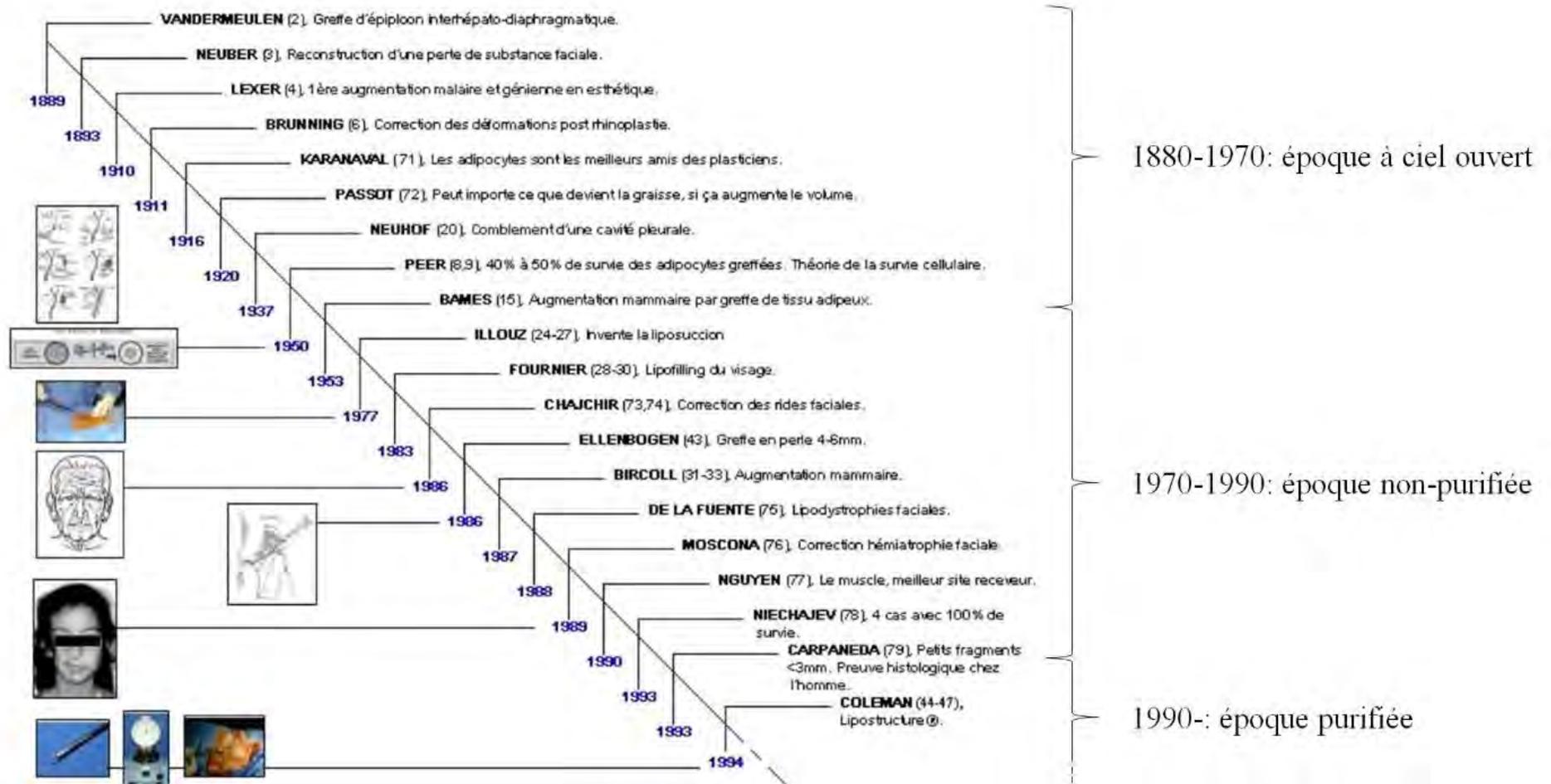


Figure 7: Historique de l'utilisation du tissu adipeux comme produit de comblement en chirurgie plastique (d'après Mojallal, Foyatier Ann de Chir Plast 2004)

c. Indications

Le transfert de graisse autologue a été développé pour les comblements de volumes des tissus mous. Ses indications dans le domaine sont maintenant très nombreuses et regroupent par exemple :

- les malformations (*i.e.* syndrome de Poland, syndrome de Romberg, pectus excavatum)
- les pertes de tissus dues aux résections de tumeurs au niveau de tissus mous
- les lipodystrophies dues à une tri-thérapie ou une radio-thérapie.
- les augmentations de volume esthétiques (par exemple dans les lèvres, les mollets ou encore aux niveaux mammaire et glutéal)
- pour le comblement de rides notamment au niveau de la face et des mains
- le comblement de fistules

Le lipotransfert est aussi, dans certains cas, couplé à d'autres techniques chirurgicales. En chirurgie plastique par exemple lors d'augmentations ou de reconstructions mammaires, certains chirurgiens choisiront de combiner une prothèse synthétique avec une injection de tissu adipeux afin d'obtenir un aspect plus naturel ou bien encore en comblement de lifting. En chirurgie maxillo-faciale, et dans le but d'améliorer les rendus post-opératoires, le lipotransfert est souvent associé à :

- des traitements de fentes labiales bilatérales
- des blépharoplasties (chirurgie des paupières)
- des rhinoplasties

De nombreux chirurgiens ont noté une amélioration de l'aspect et de l'élasticité de la peau après transfert de graisse, en faisant l'hypothèse d'un effet trophique sur les cellules des tissus environnant la greffe. Cette expérience clinique est à mettre en corrélation avec les fonctions sécrétoire du tissu, notamment paracrine, pour la synthèse de collagène et la structuration du tissu.

Son utilisation est donc étendue pour :

- le traitement de la sclérodémie (Granel, Daumas et al. 2015)
- le traitement de l'aspect de cicatrices
- les tissus brûlés

Ce ne sont là que les utilisations les plus communes du transfert de graisse, son utilisation n'étant pas codifiée et de nouvelles applications possibles sont régulièrement discutées comme par exemple le traitement d'insuffisances vélopharyngée chez l'enfant en clinique maxillo-faciale ou encore au niveau des cordes vocales (ou plis vocaux) chez l'adulte.

2) Utilisation actuelle et pratique clinique

Selon l'ISAPS (International Society of Aesthetic Plastic Surgery), le transfert de graisse représentait en 2014 pas moins de 965 000 procédures soit 10% des chirurgies plastiques dans le monde, en 4^{ème} position après les augmentations mammaires par prothèse, la liposuction et la blépharoplastie.

La technique de lipotransfert actuellement utilisée en clinique peut se subdiviser en 4 étapes (Hivernaud, Lefourn et al. 2015). Elle peut se pratiquer sous anesthésie locale pour de petits volumes transférés (au niveau des mains ou de la face le plus souvent) ou sous anesthésie générale pour des volumes plus importants (reconstruction mammaire par exemple).

De nombreuses études ont été menées pour connaître l'influence du site donneur sur les résultats obtenus sans mettre en évidence de différences significatives (Rohrich, Sorokin et al. 2004, Li, Gao et al. 2012, Small, Choi et al. 2014). Le plus souvent c'est l'abdomen qui est choisi comme site donneur pour sa facilité d'accès et la quantité de tissu qui peut être prélevée. Toutefois d'autres sites peuvent être choisis (face interne des genoux, région glutéale) selon la morphologie des patients.

➤ Infiltration

La première étape consiste à infiltrer le tissu donneur avec une solution physiologique et grâce à une canule d'infiltration généralement fine et multi-trous. Le liquide d'infiltration varie selon les pratiques (sérum physiologique ou Ringer Lactate le plus souvent) et est très souvent additionné d'adrénaline 2%. En plus de l'adrénaline, certains chirurgiens utilisent des anesthésiques locaux (tels que la lidocaïne ou la ropivacaïne) pour diminuer les douleurs péri ou post-opératoire en utilisant le milieu de Klein par exemple. La lidocaïne est recommandée car elle présente moins de risque péri-opératoire (Pace, Chatterjee et al. 2013).

Cette étape d'infiltration a pour but :

- L'anesthésie de la zone dans le cas d'une anesthésie locale
- L'expansion du tissu adipeux pour faciliter le prélèvement ultérieur
- Une diminution des saignements liés aux traumatismes des vaisseaux lors de la lipoaspiration, grâce à l'utilisation d'adrénaline (vasoconstriction).

De manière générale, l'infiltration est effectuée avec un ratio de 1 pour 1. C'est-à-dire un volume de liquide infiltré en prévision d'un volume de graisse aspirée. Toutefois ce ratio est à l'appréciation du chirurgien et peut être augmenté pour des aspirations au niveau de zones plus fibreuses par exemple.

➤ Aspiration

Après avoir laissé agir l'infiltration quelques minutes vient l'étape d'aspiration. C'est au cours de cette étape que le tissu adipeux sous-cutané est aspiré à l'aide d'une canule d'aspiration (de différente longueur, diamètre, nombre et diamètre d'orifice selon les zones et les techniques). Le tissu est aspiré par l'action de « va et vient » successif de la canule au niveau de la zone donneuse couplé à l'application d'une dépression.

Plus de 50% des chirurgiens utilisent une aspiration manuelle (Kling, Mehrara et al. 2013) (la canule est attachée à une seringue dont le piston est tiré manuellement), cependant il existe des appareillages permettant une aspiration automatisée (voir plus loin).

➤ Purification

Le lipoaspirat, qu'il soit récolté en seringue ou dans des récipients plus larges lors d'aspirations automatisées est ensuite traité dans la phase de purification. En effet, le lipoaspirat brut est un tissu adipeux dilué en grande partie dans le liquide d'infiltration et qui contient à la fois du sang et des débris cellulaires mais aussi de l'huile libérée à la mort des adipocytes. Ainsi avant réinjection ce tissu est traité de manière à avoir un greffon composé majoritairement de tissu adipeux et d'adipocytes qui formeront le volume désiré et avec le minimum de contaminants.

La purification majoritairement utilisée à l'heure actuelle fait intervenir une centrifugation du tissu à une vitesse d'environ 900-1200g pendant 3 minutes, proposée par le Dr Coleman dans sa Lipostructure®. Les vitesses et les temps varient toutefois selon les écoles et les

centrifugeuses utilisées. Cette centrifugation va permettre de séparer le lipoaspirat en 3 phases. La phase supérieure la moins dense correspond à l'huile, la phase intermédiaire correspond au tissu adipeux et la phase inférieure aqueuse est un mélange de liquide d'infiltration, de sang et de débris cellulaires. Seule la phase intermédiaire est conservée pour réinjection. La phase inférieure est éliminée par pression sur le piston (avec ou sans un robinet 3 voies) si c'est une seringue ou à l'aide d'une canule si c'est un autre récipient. La phase huileuse est elle aussi éliminée soit par renversement soit à l'aide d'un robinet 3 voies ou encore à l'aide d'une canule de transfert. Dans la pratique, la première solution qui consiste à enlever le piston pour centrifuger et enlever l'huile est celle qui est majoritairement effectuée.

Historiquement, c'est la décantation qui a été utilisée après lipoaspiration pour séparer la graisse du liquide. Aujourd'hui encore il existe des procédés utilisant ce principe. C'est le cas notamment des « fat trap » ou piège à graisse qui sont des récipients avec un tamis qui bloque les plus gros amas de tissu fibreux et laisse les lobules de petite ou moyenne taille décanter pendant et après la phase d'aspiration. La décantation permet aussi de séparer le lipoaspirat en trois phases mentionnées plus haut. La force gravitationnelle étant moins forte que dans une centrifugation il se forme généralement une phase huileuse et une phase aqueuse moins importante et un greffon moins dense avec une plus grande partie aqueuse.

➤ Réinjection

La dernière phase du lipotransfert correspond à la greffe adipocytaire proprement dite qui se fait à l'aide d'une seringue et d'une canule. Les canules et seringues utilisées vont dépendre de la zone et de la quantité à injecter mais elles sont plus fines et plus petites que les canules et seringues d'aspiration. La graisse est injectée en tunnel par des « va et vient » successifs en 3 dimensions pour remplir un maximum d'espace. Les dépôts de graisse doivent être d'une taille réduite car l'idéal est que tous les adipocytes et autres cellules se trouvent à moins de 2 millimètres (Khouri, Rigotti et al. 2014) d'un vaisseau existant pour assurer leur survie avant la revascularisation du greffon.

La graisse peut être injectée en zone sous-dermique ou même dans le muscle sous-jacent.

➤ Les complications possibles

Ce type d'intervention peut entraîner une hémorragie ou une infection du site opératoire mais ces cas restent anecdotiques. D'autre part il est possible de voir l'apparition de cicatrices, parfois chéloïdes selon le type de peau des patients.

De manière plus spécifique à la technique et plus fréquente, il est possible que l'intervention donne lieu à une hyper-correction (si un surplus de tissu a été injecté) ou une hypo-correction (si le tissu injecté s'est résorbé). Dans ce cas, le résultat esthétique ou fonctionnel n'est pas atteint et il est souvent nécessaire de réitérer l'opération (lipoaspiration en cas de sur-correction et deuxième séance de lipotransfert en cas de sous-correction).

En 2013, 2 revues ont été publiées, récapitulant les complications rencontrées lors de lipotransfert dans la poitrine (Largo, Tchang et al. 2014, Leopardi, Thavaneswaran et al. 2014). Enfin, il est possible dans certains cas d'observer une nécrose de la graisse injectée.

L'analyse de ces kystes nécrotiques met en évidence un tissu fibreux entourant une zone adipo-cytaire dégénérée centrale où les adipocytes meurent puis la matrice collagénique devient fibreuse et finit par calcifier (Mineda et al. PRS 2014).

3) Les limites du procédé

a. La limite majeure : la résorption du greffon

Dans tous les cas, il y a, à court, moyen et long terme (de 1 mois à 1 an), une résorption du tissu greffé réduisant ainsi l'efficacité de la technique en termes d'apport de volume. Cette résorption varie entre 25 et 80% du volume injecté selon la quantité de tissu et le site receveur.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer cette résorption :

- La taille des lobules injectés et la façon dont ceux-ci sont injectés impactent la capacité de revascularisation du greffon. Plus les « spaghettis » injectés seront conséquents et/ou loin de la vascularisation du site receveur, plus le tissu injecté reste longtemps en ischémie et les cellules centrales du greffon vont mourir de manque d'oxygène et de nutriments et l'accumulation de déchets cellulaires.

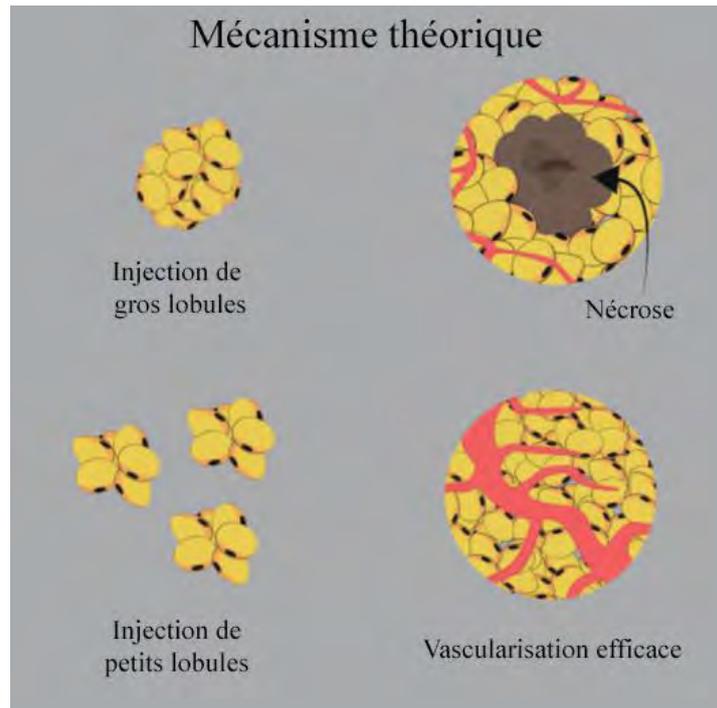


Figure 8: Injection de petits lobules de graisse pour améliorer la prise de greffe (d'après Hivernaud et al. APS2015)

- La présence prolongée de certaines substances au contact des cellules, comme les anesthésiques locaux parfois utilisés, diminue la viabilité des cellules du greffon (Girard, Mirbeau et al. 2015).
- Un stress mécanique trop élevé lors du prélèvement et de la purification peut induire une mort cellulaire plus importante lors de la greffe.

b. Les débats qui divisent la communauté

➤ L'impact sur l'imagerie médicale

Au début des années 2010, l'utilisation grandissante des lipotransferts au niveau mammaire à fait débat. En effet, cette technique, comme indiqué précédemment peut induire l'apparition de kystes huileux. Or le dépistage du cancer du sein passe par la détection d'anomalies mammographiques. Toutefois la communauté chirurgicale s'accorde maintenant pour dire que les kystes huileux sont discernables à l'imagerie d'éventuelles tumeurs mammaires sous réserve d'être analysés par un radiologue avec l'expérience nécessaire. En 2013, une étude de Rubin (Rubin, Coon et al. 2012) concluait sur le fait que le lipotransfert mammaire n'induit

pas plus de changements mammographiques qu'une autre opération chirurgicale du sein : la réduction mammaire, insistant ainsi dans tous les cas à la nécessité d'une bonne formation du personnel de radiologie avec une sensibilisation aux différents artefacts induit par ces opérations chirurgicales.

➤ L'interaction avec les cellules cancéreuses

Suite à plusieurs rapports de cas, faisant état d'une rechute cancéreuse après un lipotransfert (Petit, Botteri et al. 2012, Chaput, Foucras et al. 2013, Smit, Tielemans et al. 2014), plusieurs études se sont penchées sur l'éventuel effet pro-cancéreux de la technique (Zhang, Daquinag et al. 2009, Rigotti, Marchi et al. 2010, Petit, Rietjens et al. 2013, Agha, Fowler et al. 2014, Gale, Rakha et al. 2015), en écho à la découverte de cellules souches dans le tissu adipeux. Ces études sont majoritairement concentrées sur les cellules tumorales mammaires, ce type de cancer étant plus souvent retrouvé dans le cadre du lipotransfert.

Il existe plusieurs modèles d'études aussi bien *in vitro* que chez l'animal pour étudier les interactions cellules adipeuses/cellules tumorales. Le grand nombre de lignées cellulaires différentes étudiées et les ratios cellules stromales adipeuses/cellules tumorales supra-physiologiques étudiés rendent complexe l'établissement d'une conclusion sur le sujet.

Pour l'instant des études à larges échelles n'ont pas trouvé d'effet du traitement par lipotransfert dans le taux de rechute des patients atteint de cancer du sein (Gale, Rakha et al. 2015, Mestak, Hromadkova et al. 2015). D'autres études sont à réaliser pour déterminer si le lipotransfert peut avoir un effet dans d'autres types de cancer. Pour le moment, la « ASPS Fat Graft Task Force » de l'association américaine des chirurgiens plastique concluait en 2012 n'avoir trouvé aucun rapport indiquant une augmentation du risque tumoral associé au lipotransfert (Gutowski and Force 2009).

En France, un rapport de la HAS de 2015 (Has 0100) conclut sur le même ordre d'idée, indiquant qu'en respectant des précautions quant à la guérison de la tumeur, « l'autogreffe de tissu adipeux constitue une modalité chirurgicale possible dans la chirurgie réparatrice, reconstructrice et esthétique du sein, en dehors de la symétrisation du sein controlatérale au décours d'une chirurgie carcinologique mammaire ».

4) Le développement de nouvelles techniques

Il est maintenant possible de rajouter une 4^{ème} période à l'histoire du lipotransfert : en effet depuis une dizaine d'années maintenant, nous assistons à un fleurissement du nombre de procédés qui sont proposés aux chirurgiens. Cet avènement fait suite à la limite persistante de résorption du greffon à moyen terme. De nombreuses équipes ont montré qu'il était possible d'influer sur cette résorption en apportant des modifications au protocole au niveau de ces différentes étapes (prélèvement, traitement, réinjection).

Un exemple est l'apparition de nouvelles techniques de prélèvement. En plus de l'aspiration manuelle à la seringue des procédés ont été développés pour permettre une lipoaspiration automatisée.

Ainsi le système PAL (pour Power Assisted Lipoaspiration) utilise un moteur permettant de faire à la fois vibrer la canule et aspirer le tissu pour faciliter cette étape (Keck, Kober et al. 2014).

Le système WAL (pour Water Assisted Lipoaspiration) utilise lui aussi une aspiration automatisée. La canule ne vibre pas mais le principal atout de ce système est l'infiltration continue. En effet l'aspiration est effectuée avec une canule qui permet simultanément d'infiltrer le tissu avec la solution d'infiltration adrénalinée (Ueberreiter, von Finckenstein et al. 2010, Peltoniemi, Salmi et al. 2013). Là encore le but est de faciliter l'aspiration et d'avoir un lipoaspirat avec le moins de sang possible.

Ce sont ces 2 procédés qui sont le plus souvent utilisés en clinique à l'heure actuelle même s'il est aussi possible de trouver des aspirations utilisant les ultrasons mais ceux-ci se placent plutôt dans les procédés de lipolyse et ne sont pas adaptés à un transfert de graisse.

Cette thématique de développement de nouveaux procédés/protocoles appliqués au lipotransfert a fait l'objet d'une revue publiée dans *Aesthetic Plastic Surgery* et plus précisément centrée sur la thématique de la chirurgie mammaire (Hivernaud, Lefourn et al. 2015).

Cette thématique de transfert de graisse autologue au niveau mammaire est en effet très étudiée à l'heure actuelle.

- D'une part c'est une zone receveuse où la quantité de tissu injectée atteint souvent plusieurs centaines de centimètres cube. Ceci en fait une zone d'intérêt pour la thématique

particulière des "Megavolume fat transfer". De plus l'environnement post-irradiation qui apparaît à la suite d'un traitement de cancer du sein en fait très souvent une zone hypotrophique. Pour ces deux raisons (quantité de graisse et zone hypotrophique), la zone mammaire est très impactée par la limite de résorption de la graisse.

- D'autre part, la caractérisation des cellules souches et de leur potentiel pro-angiogénique et immuno-modulateur à amené la communauté scientifique à se pencher sur l'éventuelle interaction que pourraient avoir ces cellules avec des cellules tumorales résiduelles dans le cadre de reconstruction mammaire.

Sur ce deuxième point, la communauté scientifique reste divisée. En effet, comme expliqué dans le paragraphe 3b, les nombreux modèles *vitro* et *vivo* disponibles pour étudier les interactions CSA-Cellules cancéreuses font état de résultats contradictoires et utilisent souvent des concentrations cellulaires loin de la réalité clinique. Ce débat est aussi abordé dans la revue.

C. Revue : Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements (APS 2015)

Abstract

Background: Breast augmentation or reconstruction is a major challenge in aesthetic and reconstructive surgery. While Autologous Fat Grafting (AFG) provides a natural filler and seems easy to harvest, AFG in breast surgery is still problematic especially due to the high resorption rate associated with megavolume transfer. Despite this pending issue, there is growing interest in this method, which is becoming more and more widespread, as can be seen by the recent increase in the number of clinical studies. This review aims to highlight recent knowledge in the technique of AFG to the breast and recent refined procedures to improve fat viability and long-term success of the graft.

Methods: Clinical publications and trials of AFG to the breast from the past 5 years were examined. Attention was focused on the different AFG steps and the clinical outcomes, in order to highlight the strengths and weaknesses of the available protocols.

Results: Recent studies have concentrated on new techniques to improve fat viability and graft intake. However, all of these studies use different protocols at each step of the procedure. Furthermore, results may vary depending on the technique used for fat harvesting and processing.

Conclusion: This review points out the recent advances in breast AFG techniques and their associated outcomes and complications. The bibliography has been carefully examined to reach a consensus so that recommendations could be made for each step of the technique with the aim of improving graft viability and long-term volume maintenance.

No level assigned: This journal requires that authors assign a level of evidence to each submission to which Evidence-Based Medicine rankings are applicable. This excludes Review Articles, Book Reviews, and manuscripts that concern Basic Science, Animal Studies, Cadaver Studies, and Experimental Studies. For a full description of these Evidence-Based Medicine ratings, please refer to the Table of Contents or the online Instructions to Authors <http://www.springer.com/00266>.

Keywords: Lipotransfer, Autologous Fat Grafting, Breast Surgery, Protocols Improvement

Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements

Vincent Hivernaud^{1,2,3} · Bruno Lefourn⁵ · Jérôme Guicheux^{2,3,4} · Pierre Weiss^{2,3,4} · Franck Festy¹ · Anne-Claire Girard¹ · Regis Roche¹



Received: 2 February 2015 / Accepted: 12 May 2015

© Springer Science+Business Media New York and International Society of Aesthetic Plastic Surgery 2015

Abstract

Background Breast augmentation or reconstruction is a major challenge in esthetic and reconstructive surgery. While autologous fat grafting (AFG) provides a natural filler and seems easy to harvest, AFG in breast surgery is still problematic especially due to the high resorption rate associated with megavolume transfer. Despite this pending issue, there is growing interest in this method, which is becoming more and more widespread, as can be seen by the recent increase in the number of clinical studies. This review aims to highlight recent knowledge in the technique of AFG to the breast and recent refined procedures to improve fat viability and long-term success of the graft.

Methods Clinical publications and trials of AFG to the breast from the past 5 years were examined. Attention was focused on the different AFG steps and the clinical outcomes, in order to highlight the strengths and weaknesses of the available protocols.

Results Recent studies have concentrated on new techniques to improve fat viability and graft intake. However, all of these studies use different protocols at each step of the procedure. Furthermore, results may vary depending on the technique used for fat harvesting and processing.

Conclusion This review points out the recent advances in breast AFG techniques and their associated outcomes and complications. The bibliography has been carefully examined to reach a consensus so that recommendations could be made for each step of the technique with the aim of improving graft viability and long-term volume maintenance.

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

Keywords Lipotransfer · Autologous fat grafting · Breast surgery · Protocols improvement

Anne-Claire Girard and Regis Roche have contributed equally.

✉ Vincent Hivernaud
vincent.hivernaud@hotmail.fr;
vincent.hivernaud@univ-nantes.fr

- ¹ STEMCIS, Plateforme CYROI, Sainte Clotilde, Ile de la Réunion, France
- ² Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
- ³ INSERM, UMRS 791, LIOAD, Nantes Cedex 1, France
- ⁴ CHU Nantes, Pole Hospitalo-universitaire 4 OTONN, Nantes Cedex 1, France
- ⁵ Département de Chirurgie Plastique et Reconstructive, Clinique Bretéché, Nantes Cedex 1, France

Introduction

According to the International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS) [1] breast augmentation and reconstruction represented around 20 % of plastic surgery procedures carried out in 2011. Surgical implants are predominantly used. However, prosthetic breast reconstruction is not without risk, since many cases of leakage or rupture, displacement, infection, and capsular contracture have been reviewed [2, 3]. Moreover, even if implants may last for many years, some of them need to be revised or replaced and they might present sometime complications such as capsular contracture.

An alternative is to use natural fillers for breast reconstruction. By utilizing natural fillers, surgeons use tissue from the patient, such as a flap taken from somewhere in the body and transferred to the breast. The flap can be musculocutaneous (dorsal, abdominal, or transversal) or adipo-cutaneous (DIEP). Finally, subcutaneous adipose tissue alone can be harvested via lipoaspiration and used as a natural filler in autologous fat grafting (AFG), alone or in combination with a flap.

AFG is a safe and easily adjustable technique that results in natural filling of the breast. Even if AFG use is rapidly expanding, the question about its legitimacy continues to be raised because of its main limits: the low rate of long-term graft maintenance [4] and the formation of oil cysts.

It is a fact that the results obtained with the AFG procedure are highly dependent upon the protocol and the experience of the surgeon [5], with these two parameters influencing cell death and resorption. Fortunately, an increasing number of studies and clinical trials are aiming to develop new techniques that limit graft resorption, leading to improvements in AFG efficiency.

The aim of this review is to discuss the pros and cons of AFG to the breast and to outline the different studies and procedures available, in order that recommendations can be made so that the procedures can be optimized to obtain long-lasting results.

Autologous Fat Grafting to the Breast: « The Pros and Cons »

Subcutaneous white adipose tissue is composed of two cell fractions: the adipocyte fraction providing fat volume [6] and the stromal vascular fraction (SVF) that contains numerous cell types (endothelial cells, pericytes, stromal cells, and hematopoietic cells) [7]. It is now widely accepted that these two fractions are critical for graft survival, with the efficacy of AFG being dependent upon their viability.

One of the major strengths of AFG to the breast compared to implant-based reconstruction is the natural aspect and palpation that it gives to the breast. AFG combined with liposuction can provide an esthetically pleasing result for the patient and is easy to perform by surgeons with minimal invasiveness. Another important point is that AFG to the breast gives an unlimited time effect, whereas a prosthesis usually needs to be replaced and does not age with the patient. Finally, the SVF of adipose tissue is a great source of mesenchymal stem cells (MSC), the reason for the increased interest in this tissue over the last decade. With advances in our knowledge of the SVF and cell-assisted lipotransfer, the trophic effect of stromal/stem cells on scars and irradiated zones, as well as the beneficial effects on angiogenesis and skin rejuvenation have been demonstrated. These effects can probably be linked to

growth factor secretion by adipose stromal cells (ASC) [8] as well as their ability to differentiate into multiple lineages [9].

Nevertheless, AFG to the breast is also associated with limits and complications. Complications will depend upon the experience of the surgeon and the AFG protocol that is used. In 2013 Leopardi et al. [4] and Largo et al. [10] reviewed previous studies on breast AFG, focusing on the complications that were encountered. With regard to fat injection, the possible complications are: fat necrosis, oil cyst formation, and calcification. These are frequently reported and are not dependent upon the protocol used. Liponecrosis is believed to be caused when an excess of fat is injected, inhibiting the complete vascularization of the graft and causing cell death due to ischemia and nutrient deprivation. Cyst formation is often minor and can be easily detected by palpation or imaging. Of the minor complications, inflammation, striae, bruising, or superficial infections can occur.

One limitation of AFG to the breast comes with the patient morphology. For some patients, large volumes of fat for grafting cannot be harvested (at least not in a single operation without risking deformities of the donor site) especially for Cell-Assisted Lipotransfer (see the dedicated paragraph).

In recent years, a major concern as far as AFG to the breast is concerned, was the possible mammographic interference with cancer diagnosis due to tissue calcification [11]. However, in the 2013 study by Rubin et al, mammographic changes after AFG were less important than those following breast reduction, a commonly accepted procedure [12]. Therefore, care should be taken when analyzing mammographic images following AFG, with a high level of experience required to discern benign calcification from oncological dangers.

The two main remaining issues concerning AFG to the breast are the questions of the possible pro-cancerous role of injected adipose tissue (discussed in the safety paragraph) and the high resorption rate in the months following injection.

The principal limit of this technique addressed in this review is the low maintenance volume due to the use of large volumes of fat [13–15]. The efficacy is estimated to be approximately 50 % with nearly all techniques (Table 1). Most of the resorption occurs in the 3–6 months following adipose tissue injection. Nevertheless, it should be noted that many protocols have been developed since Coleman's LipoStructure[®], enhancing our knowledge concerning fat processing prior to grafting.

To summarize, AFG to the breast is an extremely promising technique with few complications, but protocol improvements are still required in order to offer the best possible outcome with enhanced fat maintenance.

Table 1 Recent studies concerning Autologous Fat Grafting to the breast, showing the protocols used and the mid/long-term outcomes following surgery

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Camulla	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Yoshimura et al. [25]	Cell-assisted lipotransfer	40	-	Saline solution with epinephrine 0.001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Group A & B: wash + decantation Group C: 700 g 3 min Half of the collected tissue is used for SVF isolation	Group A&C: SVF is mixed with fat Group B: SVF is injected separately	Gradual resorption in the first 2 months More natural than implant	At 6 months 1 case in group B: fibrous breast tissue and fibrosis on the sternum At 24 months Cysts (2) Microcalcification (2)
Zocchi et al. [26]	Breast AFG protocol	181	BRAVA	Saline solution with adrenaline 2 mg/L	Teflon-coated 2 mm	60-cc syringe with controlled depression	Decantation on a vibration table	2-mm cannula Manual reshaping	Average persistent volume at 1 year: 55 %	At 8 years Less than 4 % of liponecrosis, microcyst and microcalcifications
Delay et al. [27]	Author's experience	880	3D morphological study in some cases	-	Blunt 4 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3200 rpm for 3 min	Overcorrection (140 %)	Gradual resorption in the first 3-4 months (30-40 %) Volume stable at least 5-6 years	Oily cysts 15 % 1 infection Fat necrosis in 3 %
Illouz et al. [28]	Author's experience	820	-	Saline solution with adrenaline 1:500 000	-	Syringe	Decantation	2.5-mm cannula	-	Echymosis (76) Striae (36) Hematomas (12) Infections (5)
Panettiere et al. [29]	AFG in irradiated reconstructed breast	61	-	Saline solution with lidocaine 0.5 % and epinephrine 1:200,000	1 hole bullet tip 3 mm	10-cc syringe	Wash with saline solution and decantation	14G needle and overcorrection (10-15 %) Multiple injection sessions	Best esthetic outcome with lipotransfer at 3 months Functional improvement after 3 months with lipotransfer	No complications at 3 months
Rigotti et al. [18]	Compare incidence of local and regional recurrence of breast cancer before and after AFG	137	-	Cold saline solution with epinephrine 1:400,000 and 0.02 % lidocaine	Coleman's instrumentation	-	Centrifugation at 3000 rpm	2-cc syringe	Statistically not more recurrence since the utilization of lipotransfer	-

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Ueberreiter et al. [30]	AFG protocol	85	–	Saline solution with lidocaine 0.05 %, adrenaline 1 mg/L and sodium bicarbonate 0.105 % Infiltration and aspiration are simultaneous	3.8 mm with 0.9 mm apertures	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Fat trap and decantation in injection syringe	10-cc syringe	Approximately 50 % of injected volume at 6 months	2 subcutaneous granuloma
Yoshimura et al. [31]	Cell-Assisted Lipotransfer	15	–	Saline solution with epinephrine 0.0001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Centrifugation 700 g for 3 min Half of the collected tissue is used for SVF isolation	10- or 20-cc syringe with 16 or 18G needle	Graft survival ranged from 40 to 80 %	At 1 year no cyst formation (> 5 mm) or microcalcifications were detected (n = 8)
Caviggioli et al. [32]	AFG in post-mastectomy pain syndrome (PMPS)	63 + 35	Skin expander and silicone prosthesis	Coleman's technique	–	–	Centrifugation 3000 rpm for 5 min	18G needle	Pain decrease in AFG group compared to control group	–
Del Vecchio et al. [33]	Use of BRAVA and breast AFG	25	BRAVA	–	–	–	Centrifugation from 20 to 40 g	BRAVA for 2–4 weeks	64 % tissue yield at 6-month for 12 patients	At 6 months no oil cysts, fat necrosis, or breast masses
Kamakura et al. [34]	Cell-Assisted Lipotransfer	20	–	Saline solution with 1 % lidocaine and epinephrine	3 mm three-hole blunt	–	Half of the collected tissue is washed and gravity filtered The other half is used for SVF isolation	Thumb-brush syringe adapter	Physician satisfaction (69 %) and patient satisfaction (75 %) at 9 months	At 9 months liponecrotic cyst (11 %)
Salgarello et al. [35]	AFG with Platelet-Rich Plasma	10 + 25	–	Saline solution with Xylocaine 2 % and epinephrine 1:500,000	Inner diameter 3 mm 2 holes blunt	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min 1- or 3-cc syringes with 2.7-cc fat/0.3-cc PRP 10 % in group A and with 0.9-cc fat/0.09-cc saline solution in group B	Injection with a 17G single-hole blunt cannula	No significant differences between the AFG with or without PRP in terms of outcomes, complications or session number	Fat necrosis (7 per group): Oil cyst (4 per group) Complex cystic images (4 per group)
Cigna et al. [36]	Secondary AFG after implant reconstruction	20	Breast implant	Anesthetic solution	3 mm	10-cc syringe	Centrifugation at 3000 rpm for 3 min	1 and 2.5-cc syringes overcorrection 20–25 %	Improvement of cosmetic outcomes	At 1-year Fat necrosis (1)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Gentile et al. [37]	AFG enhanced by stromal vascular fraction (CAL) and PRP	10 + 13 + 10	-	Cold saline solution with adrenaline 0.2 %	3 mm	60-cc syringe	Centrifugation at 3000 rpm Group PRP: 1-cc fat with 0.4-cc PRP Group eSVF: half of the collected tissue is used for SVF isolation Group control: Coleman's procedure	1-2-mm cannulas Specific microcannulas for eSVF group	Volume maintenance at 18 months: 65 % for PRP group, 61 % for SVF group and 30 % for control group	Small cystic formation and microcalcification (1)
Khoury et al. [38]	Use of BRAVA and breast AFG	81	BRAVA	-	2.7 mm 12 holes	Constant 300 mmHg syringe pulling	Centrifugation in bags 15 g for 3 min	2-5-cc syringe and 2.4 mm single-sidehole Wear of BRAVA after operation	90-78 % graft survival depending on the injected volume	At 1-year Calcifications (16 %)
Pérez-Cano et al. [39]	Cell-Assisted Lipotransfer	71	-	Tumescent solution	-	Syringe	Wash with saline solution and decantation Half of the collected tissue is used for SVF isolation	Thumb-controlled syringe adapter	Statistical improvement in the LENT-SOMA score	Injection site cysts (14.9 %) At 12-month Small cysts (46 patients)
Petit et al. [16]	Locoregional recurrence after AFG	321	-	Different protocols	-	-	-	-	No difference in locoregional recurrence between AFG and control except for patient with intraepithelial neoplasia	-
Rubin et al. [12]	Compare mammographic changes after AFG versus Breast reduction	27	-	Saline solution with epinephrine 0.001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Half of the collected tissue is used for SVF isolation	-	No difference in abnormality rates for cyst and calcification More scarring and masses requiring biopsy in the breast reduction group	At 12 months Oil cysts 55 (25.5 %) Scarring 38 (17.6 %) Calcifications, benign/fat necrosis 37 (17.1 %) Calcifications warranting biopsy 10 (4.6 %) Mass or distortion warranting biopsy 6 (2.8 %)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Auclair et al. [40]	Composite breast augmentation	197	Breast implant (LD) flap and/revision augmentation	Tumescent solution	1.5 mm for fat overlay 12 holes and 3.5–4 mm for submuscular primary augmentation and revision augmentation	Syringe for fat overlay and liposuction device for other	Centrifugation (Coleman for fat overlay or low G-Force)	14G side hole blunt cannula	Average volume maintenance of 57 % in 20 patients at 1 year	At 1-year cystic mass (2)
Bonomi et al. [41]	Immediate and delayed reconstructive surgery	31	Latissimus dorsi (LD) flap and/or implant-based reconstruction	Saline solution with marcaine 0.25 % and adrenaline 1:200,000	3 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	2-mm cannula 30 % overcorrection	Patient satisfaction (29 patients rated good or above)	Fat necrosis (2) oil cysts (1) cancer recurrence (1 at 4 years)
Costantini et al. [42]	Radiological evaluation of breast AFG	24	-	Saline solution with epinephrine 1:500,000	-	Syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	17G blunt cannula	AFG do not interfere with early diagnosis Ultrasounds are best for identification of oil cyst and MRI for fat necrosis	At 1 year, benign calcifications (3) Simple cysts (6) Oil cysts (23) Liponecrosis (8) Benign nodules (2) Cancer recurrence (1)
Fiaschetti et al. [43]	Imaging evaluation after AFG + PRP	15	-	Klein solution	-	-	Centrifugation 3000 rpm for 4 min Mix with PRP	Coleman microcannula	MRI allows a good volume estimate. At 6 months there is a 15.36 % or resorption and 28.23 % at 12 months	At 12 months by ultrasound: oil cyst (45.83 %) cytosteatonecrotic areas (12.5 %) by MRI: oil cyst (4.17 %) cytosteatonecrotic areas (16.67 %) by mammography: microcalcifications (20.83 %)
Hoppe et al. [44]	AFG protocol	28	-	Saline solution with lidocaine 0.05 %, adrenaline 1 mg/L and sodium bicarbonate 0.105 % Infiltration and aspiration are simultaneous	-	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Decantation in 50-cc syringes for 5–10 min	10-cc syringes	Generally 4–6 procedures, irradiated patients needed a higher amount of fat. 68 % good or excellent results.	At 6 months, liponecrosis (2.59 %), infection (0.74 %) and granuloma (0.74 %)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Peltoniemi et al. [45]	Comparison of CAL versus conventional AFG	10 + 8	-	Saline solution containing 1-cc epinephrine 1:1000, 12.5-cc sodium bicarbonate 8 mval and 500 mg lidocaine each 1000-cc saline 0.9 %	3.8 mm	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Decantation in fat trap. For CAL, half the harvested tissue is used for SVF isolation	10-cc syringes and controlled injector	54 % (AFG) and 50 % (AGF + CAL) volume survival measured by MRI. No significant volume benefit with CAL	At 6 months, no complications but late, oil cysts (1 in each group)
Petit et al. [17]	Safety of AFG in patients with intra epithelial neoplasia	59 + 118	-	Coleman's technique					A significant increase of local events after AFG in patients with intraepithelial neoplasia	At 5 years Local event incidence (18 % in AFG group and 3 % in control group)
Khoury et al. [46]	Use of BRAVA and breast AFG	476	BRAVA	-	12 holes, 2.7 mm	300 mmHg syringe	Centrifugation in bags 15 × g for 2 min	2.4 mm single-hole cannula	After 6 months or more, 79.8 % graft retention	Fat necrosis (19) Small palpable nodules (15 %) Minor infection (7) Pneumothorax (1)
Maione et al. [47]	AFG in post-mastectomy pain syndrome (PMPS)	57 + 35	Conservative breast surgery and radiotherapy	Coleman's technique			Centrifugation 3000 rpm for 5 min	18G angiography needle	AFG significantly decreased pain in patients with PMPS following lumpectomy and radiotherapy	-
Mestak et al. [82]	PureGraft vs Centrifugation for breast AFG	15 + 15	-	Saline solution with 1 % adrenaline	3-mm Mercedes cannula	60-cc syringe	Filtration in Puregraft with two washes in Ringer for one group Centrifugation 3000 rpm, 3 min for the other group	9 cm type III Coleman cannula	After 1 year, patient satisfaction is the same in the two groups	Infection (1) Solitary cysts (3)
Small et al. [48]	Investigate donor site for breast AFG	46 + 27	-	Tumescent solution with lidocaine 4:10 000 and epinephrine 1:1000000	3-4 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	3-cc syringes	45 % retention at 140 days and no difference between graft from abdomen or from thighs	-

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Spear et al. [15]	Breast AFG	10	-	-	3 mm	Liposuction device (500–600 mmHg)	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	blunt cannula	Volume retention at 1 year 36 % for the right breast and 39.2 % for the left breast	Fat necrosis
Uda et al. [49]	Use of BRAVA and breast AFG	14	BRAVA	Tumescent solution	3 mm	Liposuction aspirator (<350 mmHg)	Centrifugation 1200×g for 3 min	Blunt Coleman's cannula connected to 2.5-cc syringes Wear of BRAVA after operation	Better results in non-irradiated breasts	Fat lysis (1) Cellulitis (1) Cysts (5) Calcification (1)

Safety Concerns About AFG to the Breast

Even though breast autologous fat grafts are used worldwide, there is concern about the interaction between stem cells contained in the grafted adipose tissue and any possible residual cancerous cells from a mastectomy procedure. This debate on the role of stem cells in the fat transfer is of further concern when considering cell-assisted lipotransfer and the supra-physiological concentration of stem cells associated with this procedure.

There are numerous in vitro and in vivo models available to investigate the possible pro-cancerous role of fat injection; however, these models do not accurately simulate clinical results while often giving contradictory results [16–19]. There is currently a lack of large controlled studies with long-term follow-up to study this issue leaving the topic understudied. Several individual cases have been reported in which adipose tissue injection led to increased tumor growth and even cancer relapse [20, 21]. The mechanisms involved in these phenomena remain to be identified, but may be cancer dependent such as patients with intraepithelial neoplasia or other undetermined factors.

Despite these concerns, in 2012, the ASPS Fat Graft Task Force did not find “any reports suggesting an increased risk of malignancy associated with fat grafting” and so far, clinical reviews have not revealed any increased cancerous relapse when using AFG to the breast [18, 22, 23].

Recent Studies

AFG to the breast is of great interest in breast surgery with 12 clinical studies currently registered on the clinical-trial.gov website (research that contains the key words “fat graft”, “fat grafting”, “adipose tissue injection”) [24].

In addition to these clinical trials, Table 1 resumes clinical studies published on breast AFG in the last 5 years.

This table highlights the main issue with breast AFG, which is the high resorption rate of the graft in the months following injection: 15–40 and 20–55 % resorption at 3 and 6 months, respectively (Table 1).

The table also demonstrates that currently, several different protocols are being used by surgeons. This demonstrates the complexity that surrounds adipose tissue handling in AFG and makes it difficult to compare the outcomes.

Moreover, one of the most striking observations is that despite the deleterious effect of high-speed centrifugation being demonstrated, over the past years, 17 studies have used centrifugation steps equal or above 700×g. This underlines the importance of determining a clear protocol for the purification of fat prior to reinjection.

A further piece of information that is highlighted by this table is that it now seems to be commonly accepted that microinjection of small lipid aliquots is employed in order to enhance fat revascularization upon reinjection.

Finally, the most recent breast AFG studies highlight the growing interest in enhancing harvested fat with a graft supplement (with SVF or platelet-rich plasma: PRP).

Processing of Adipose Tissue

Lipotransfer can be divided into four steps: infiltration, lipoaspiration, fat processing, and injection. Although numerous protocols are currently used in clinics for all of these steps, several studies compared the different methods with the common aim of reducing fat resorption [52–57].

Infiltration

Lipoaspiration can be carried out while simultaneously or previously injecting a physiological solution (wet lipoaspiration). Dry lipoaspiration, without infiltration, is no longer used for AFG because of the amount of associated blood loss [50]. The standard ratio for infiltration is commonly 1-cc infiltrated for 1 cc of fat tissue removed, but a higher ratio can be used with tumescent lipoaspiration techniques. The infiltration solution can contain local anesthetic (to avoid peri- and post-operative pain) and vasoconstrictor drugs (adrenaline) to prevent bleeding. Although adrenaline has been proven harmless at low doses, the use of local anesthetic (e.g., lidocaine) is still an issue. Indeed, these drugs have a cytotoxic effect on ASC or can affect their metabolism. Therefore, these drugs must be used at an appropriate concentration to prevent any damage to the tissue [51, 52]. Their use increases the importance of tissue washing prior to reinjection in order to avoid any prolonged contact.

Lipoaspiration

Harvesting Site

As far as fat viability and graft outcome are concerned, several studies have been unable to demonstrate a significant difference between harvesting sites [48, 53, 54]. Furthermore, the most common source for the harvesting of fat grafts is the abdomen [11].

Cannulae

In 2009 Erdim et al. evaluated the influence of cannula size and showed that a cannula that is too small could damage the tissue [55]. The inner diameter of the cannula varies

between 2 and 4 mm, with the choice of cannula dependent upon the surgeon carrying out the technique (Table 1). Aside from the cannula size, the number and the size of the holes in the cannula is important. In fact a higher number of holes will enable faster fat harvesting with a concomitant reduction in depression pressure [56, 57]. The diameter of the holes will also affect the size of the harvested lobules, with smaller lobules supposedly being more viable, thus making revascularization easier [56].

Aspiration

The lipoaspiration cannula can either be connected to a syringe, so that aspiration can be carried out manually, or be power assisted. In all cases, the negative pressure caused by aspiration is a critical factor in graft survival [58]. Indeed, in 2001, Shiffman demonstrated that a depression of over 700 mmHg (by manual or by power-assisted liposuction) should not be used for lipotransfer [59]. Cheriyan obtained the same conclusion comparing –250 and –760 mmHg pressures [60]. A questionnaire was sent to the members of the American Society of Plastic Surgeons in 2013, with 55 % of the responders using manual suction instead of other techniques [11].

Pulling of the plunger should be carried out with caution because it will determine the negative pressure inflicted on the tissue [61]. With this in mind, special syringes with a controlled plunger can be used (e.g., Macrofill by Adip's-culpt). In any case, manual or power-assisted systems that enable the control of negative pressure (e.g., K-VAC Syringe by Lipocosm) are preferable.

A further factor that has given contradictory results is the effects of direct exposure to air [62]. Further data should be obtained to determine if non-closed systems should be avoided or not.

In addition to assisted aspiration, several other technological advances have been developed in an attempt to improve the quantity and the quality of harvested fat. Water-assisted lipoaspiration (WAL) uses continuous infiltration that enables “pre-dissection” of the tissue prior to its aspiration (e.g., BodyJet by human med) [30, 44] but this also results in a greater residual interstitial liquid phase.

Some devices also improve the speed of aspiration by making the cannula vibrate during the aspiration process (e.g., PAL by microaire). This technique allows easier and faster aspiration with less effort. However, even if it is possible to regulate the intensity of the cannula vibration, this technique might be more suited to performing high volume liposuction rather than lipotransfer due to the damage done to the harvested tissue with the vibrating cannula.

Purification

The purification step aims to remove the interstitial liquid whilst at the same time ensuring the viability of the graft cells. The two main purification protocols that are mostly used nowadays are decantation and centrifugation. In 2013, 45 % of surgeons used a decantation process and 34 % used centrifugation to purify the graft before AFG to the breast [11].

Decantation

The decantation process is easy to perform and does not necessarily require any additional devices. It can be performed directly in syringes or in a special device designed to trap the fat tissue and to isolate the liquid fraction (e.g., Lipocollector by human med; Tissu-Trans Filtron by Shippert Medical). Even if it is probably the cheapest and easiest to use for surgeons, the main limit of this process is that a significant fraction of liquid will still be trapped in the adipose fraction and will be the first to be reabsorbed after reinjection [30]. The remaining infiltration liquid can also be responsible for a higher concentration of pro-inflammatory cytokines secreted by the adipose tissue during aspiration. This may trigger inflammation at the recipient site, with recruitment of immune cells that can eventually lead to increased graft resorption [63].

Centrifugation

Due to this limitation in the decantation process, since the 1990s the lipoaspirate can also be centrifuged to remove the liquid fraction and improve graft uptake [11, 62, 64, 65]. Moreover, in 2010, Condé-Green found a greater concentration of ASC in the centrifuged fat than with the decantation method alone [61]. However, this step requires a centrifuge and probably more time to carry out than simple decantation. Since Coleman described the purification step with 3 min of centrifugation at 3000 rpm (rarely mentioned but corresponding to 900–1200 g, depending upon the rotor used), many studies have investigated the role of centrifugation (speed and time) on the viability and the maintenance of the reinjected tissue [61, 63, 65–67]. Caution must be taken with this centrifugation step to preserve the integrity of the adipose tissue. Indeed, the centrifugation speed is correlated with fat tissue compaction but also with the release of oil due to the death of adipocytes. A balance must then be found between interstitial liquid removal and adipose tissue damage. Tissue damage can lead to an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) or Interleukin 6 (IL6) [63]. Hoareau and Kurita have both shown a decrease in survival with

centrifugation forces higher than $400\times g$ for 1 min [63, 67]. However, there are some protocols at the moment that still use a centrifugation step of 3 min or more at 3000 rpm. On the other hand, some protocols use one or several low speed/time centrifugation(s) [66, 68]. There are some new protocols that use a similar approach to reduce or limit damage to the tissue through the use of manual centrifugation ($15\times g$). There is however little data in the literature to make conclusions regarding such a method.

Alternative Processes

The aim of the filtration method is the same as that of the decantation or centrifugation methods: removal of the liquid fraction to purify the fat before reinjection. It is accomplished by passing the lipoaspirate through a filter (e.g., PureGraft by Cytori or Lipivage by Genesis Biosystem) to remove particles below the chosen size. In 2013, Zhu found less oil and greater viability with this system compared to high-speed centrifugation [69].

Some protocols also integrate additional washing steps (e.g., Macrofill by Adip'sculpt; PureGraft by Cytori) that aim to remove the remaining infiltration solution [61, 69, 70], to get rid of most of the local anesthetic, vasoconstrictors, inflammatory molecules, and death factors (released during liposuction) that may damage the tissue and limit graft success [51, 63]. In 2013, only 28 % of surgeons were using a washing step with breast AFG [11].

Reinjection

The final step of AFG is the reinjection of the adipose tissue. This step usually requires the use of different sized syringes (from 1 cc to 50 cc) depending on the quantity of adipose tissue to graft. The injection is carried out with a retrograde movement that deposits a small amount of fat tissue in multiple directions via microtunneling at the recipient site. If the graft deposit is too large it will take longer for vascularization to reach the center of the graft, resulting in fat necrosis (Fig. 1).

Therefore, the injection of small aliquots of fat is now commonly accepted, with a cannula of 2 mm being preferred for fat reinjection (Table 1). Surgeons usually graft in all tissue planes (except glandular areas) [56]. No consensus is available however on whether a particular grafting zone is preferable even though muscular zones are more vascularized and could thus prove to be good recipients.

To protect the injected tissue from injection-related shear stress, automated devices have been developed. These devices aim to inject the fat with rigorous continuous pressure. Control of the injection (with an adipose tissue injector) was shown to improve in vivo fat retention in a

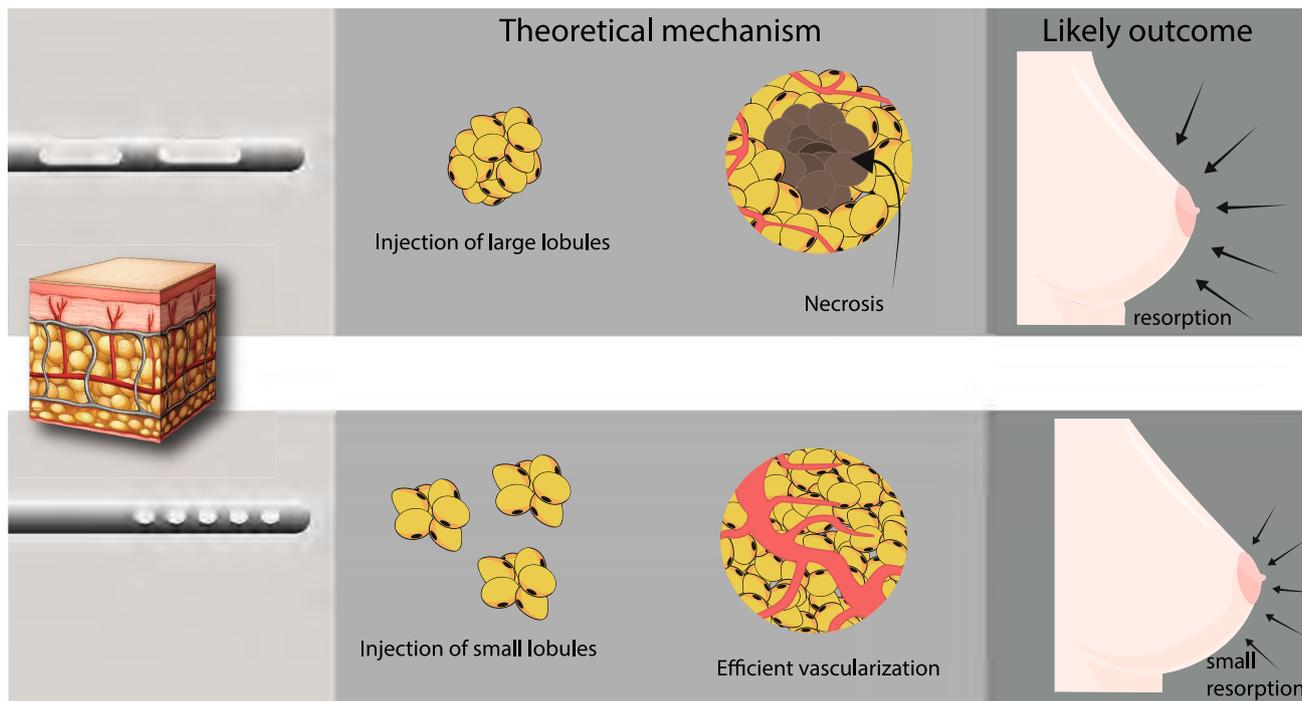


Fig. 1 Injection of small lobules of fat enhances revascularization of the graft and long-term survival

nude mouse model compared to a modified Coleman's method following simple decantation [71].

Finally, care must be taken not to overgraft in the breast. Faced with resorption, many surgeons try to overcome this limit by “overcorrection” of the recipient site. However, exceeding breast volume might lead to an inverse effect with increased graft pressure resulting in tissue damage [27, 56].

More Complex Protocols

In the last five years, a new approach has been developed to improve fat grafting through the addition of stem cells or growth factors [25, 31, 34, 35, 37, 39]. In all of these protocols, whether the addition of PRP, SVF, or ASC is implied, the supra-physiological concentrations of stem cells and growth factors is a sensitive issue in reconstructive breast surgery with a risk of cancer relapse [72].

PRP Enriched Grafts

In surgical fields, great interest has been demonstrated in platelet concentrates, notably in PRP, which is easy to use and only requires a blood sample. This blood derived formula contains a concentrated number of platelets that releases several growth factors (contained in the alpha-granules) such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGFβ), vascular

endothelial growth factor (VEGF), and epidermal growth factor (EGF). These growth factors are responsible for high angiogenesis and proliferation potential in vitro [73]. Because of its properties, the use of PRP in breast AFG has been considered. There are still limited and conflicting results in the literature. In 2011, Salgarello et al. showed no benefit of using PRP with Coleman AFG, whilst in 2012 Gentile et al. reported a 1-year graft survival of 69 % compared to 39 % for the Coleman technique alone [35, 37]. PRP clearly has a concentration-dependent effect, with standardization of PRP preparation still unavailable. These factors and the numerous available protocols [74] can explain the contradictory results that have been obtained. More studies with a higher number of patients will be required to reach a consensus on the use of PRP at a defined concentration.

Cell-Assisted Lipotransfer (CAL)

Over the past decade, studies have shown a great deal of interest in the SVF mainly because of its ASC content and its ability to secrete pro-angiogenic factors [75, 76]. Thus, new procedures have emerged, consisting of the injection of a stem cell enriched fat graft. The common name for this protocol is Cell-Assisted Lipotransfer (CAL) [25].

The goal of this approach is to inject more SVF cells to promote vascularization and survival of the graft thanks to the presence of more endothelial precursors and pro-

Table 2 Guidelines for the different steps of AFG to the breast (according to the literature new data)

Procedure step	Tips
Infiltration	Usually conducted with a 1/1 ratio. While adrenalin can be used without problem, local anesthetics should be avoided. If necessary, local anesthetics should be used with appropriate concentration (maximum 0.4 mg/mL), and the tissue should be washed
Harvesting	Use a low depression (less than 0.5 atm or 375 mmHg), and a small cannula (2–4 mm in diameter) with multiple holes to decrease the pressure in order to preserve the tissue and to harvest small fat lobules. Devices that accelerate fat tissue harvesting may damage the fat graft if they are not used with caution
Processing	Washing steps are important in order to remove infiltration drugs and inflammatory molecules. Low-speed centrifugation (less than 400 g) or equivalent should be used to remove the liquid part so that a sufficient fat density is maintained for reinjection
Reinjection	Neovascularization of the graft is critical for its survival. It is therefore important to inject small adipose aliquots in order to decrease hypoxic stress. Preferably use a small cannula (2 mm diameter or less) with small holes. Additional care of the recipient site (BRAVA) or enhanced lipotransfer (CAL) might be suited for low trophicity breast (e.g., after radiotherapy)

angiogenic factors like the vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by the SVF [8]. Moreover, the enriched grafts contain more ASC that may be able to differentiate in the adipocyte lineage in situ to overcome the death of adipocytes that occurs during AFG. Finally, the immunoregulatory potential of ASC [77] may decrease the inflammation that is responsible for a sub-optimal outcome, causing adipocyte death. In the CAL protocol, the SVF is isolated of half of the harvested fat and then combined with the other half to create a stromal cell enriched fat graft. Several devices are now used in clinical practice to isolate the adipose SVF. These devices often use enzymatic digestion to digest the tissue and allow the isolation of the SVF cells as a pellet following centrifugation of the digested tissue [78].

So far the results obtained with CAL do not allow us to reach any conclusion as far as the superiority of this technique is concerned when compared with conventional fat transfer [45]. There is still a lack of real comparative studies with an objective assessment of graft survival. Moreover, the higher cost and quantity of tissue required for CAL remain limiting factors. It is likely that the CAL technique may not be suited to every AFG application. However, SVF seems to improve scar healing and might be suitable for low trophicity recipient sites [79].

ASC Enriched Graft

Last year, Trojahn Kølle et al. published a study carried out with volunteers in which fat grafts were compared with fat grafts enriched with cultured ASC. Even if this study was conducted on bolus injections of fat, the improvement in fat survival at 121 days (80.9 vs. 16.3 %) has now raised interest in cultured ASC supplemented fat for AFG [80]. We can expect in future breast AFG studies with cultured ASC to assess safety and cost effectiveness of this concept. However, this protocol is not a one-step procedure, with additional costs, time and the possibility of contamination

related to the expansion of stromal cells. Furthermore, the intensive expansion of stromal cells increases the mutation risk in these cells (abnormal caryotype).

Breast Expansion System

Focusing on the recipient site, Khouri has developed the BRAVA system. The principle of this device is to extend the breast skin to make it a more favorable recipient for fat injection. The device applies a negative pressure (from 15 to 33 mmHg) to the breast area to (1) untighten the skin, increasing recipient volume, and (2) increasing blood supply via mechanotransduction effects [14]. Several studies and a clinical trial have supported the use of this technique and have demonstrated good results [26, 33, 38, 40, 49]. However, the BRAVA is quite expensive and its use is unwieldy for the patient. Considering its cost and its cumbersome nature it might be better suited for selected patients, for example with a “hostile” recipient breast (post-radiotherapy [49]) or those who want a large augmentation with limited procedures [81]. Nowadays, 8 % of American plastic surgeons are using this device prior to AFG [11].

Guidelines

In Table 2, we resume some tips that, according to the literature, can help to improve outcome for breast AFG. There is still no ideal protocol but we believe that the recent knowledge can be used to avoid deleterious procedures.

Conclusion

AFG to the breast is now a standard practice for breast reconstruction and augmentation procedures. However, there remain serious limitations as far as graft intake is

concerned. To improve outcome, many studies have focused on finding new approaches to treat the fat before reinjection. Here, we summarized current knowledge for each step of the AFG to the breast technique.

We believe it is possible to improve long-term outcomes by respecting both adipocyte and stromal fractions during the entire AFG to the breast process. Graft survival can be improved by controlled aspiration with low negative pressure (<700 mmHg) and with multi-small-holed canulae. Before reinjection the fat needs to be concentrated while care is taken to preserve cell survival (positive balance between liquid removal and fat damages).

In the past 10 years, many research groups have shown interest in “stem cell enriched” grafts, especially the CAL protocol with SVF. It is still not clear if this protocol is better than conventional fat grafting. It might be promising for hostile hypotrophic recipient sites (an irradiated breast for example) justifying the higher cost, the necessity to harvest more tissue (half of it is digested) and the supplementary operation time that is required (approximately 2 h more). For all other applications high graft maintenance can be achieved by carefully processing the fat with simple and low-cost techniques.

The future of AFG to the breast is yet to be written; but it is clear that since the advent of the optimized Coleman's liposuction, a great deal of fat grafting knowledge has been gathered and we now have more clues about how to handle fat in order to offer the best esthetic outcomes for patients.

Acknowledgments Vincent Hivernaud, Franck Festy, Anne-Claire Girard and Regis Roche are employed by STEMCIS.

References

- International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS) Global statistics for year 2011: <http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics>. Accessed 31 July 2014
- Oulharj S, Pauchot J, Tropet Y (2013) PIP breast implant removal: a study of 828 cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:302–307
- Cunningham B, McCue J (2009) Safety and effectiveness of Mentor's MemoryGel implants at 6 years. *Aesthet Plast Surg* 33:440–444
- Leopardi D, Thavaneswaran P, Mutimer KL, Olbourne NA, Maddern GJ (2013) Autologous fat transfer for breast augmentation: a systematic review. *ANZ J Surg* 84:225–230
- Gutowksi KA, Force AFGT (2009) Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg* 124:272–280
- Wronska A, Kmiec Z (2012) Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* 205:194–208
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641–648
- Baer PC, Geiger H (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295
- Largo RD, Tchang LA, Mele V, Scherberich A, Harder Y, Wettstein R, Schaefer DJ (2013) Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:437–448
- Kling RE, Mehrara BJ, Pusic AL, Young VL, Hume KM, Crotty CA, Rubin JP (2013) Trends in autologous fat grafting to the breast: a national survey of the American Society of Plastic Surgeons. *Plast Reconstr Surg* 132:35–46
- Rubin JP, Coon D, Zuley M, Toy J, Asano Y, Kurita M, Aoi N, Harii K, Yoshimura K (2012) Mammographic changes after fat transfer to the breast compared with changes after breast reduction: a blinded study. *Plast Reconstr Surg* 129:1029–1038
- Del Vecchio DA, Del Vecchio SJ (2014) The graft-to-capacity ratio: volumetric planning in large-volume fat transplantation. *Plast Reconstr Surg* 133:561–569
- Khoury RK, Rigotti G, Cardoso E, Khouri RK, Biggs TM (2014) Megavolume autologous fat transfer: part I. Theory and principles. *Plast Reconstr Surg* 133:550–557
- Spear SL, Pittman T (2014) A prospective study on lipoaugmentation of the breast. *Aesthet Surg J* 34:400–408
- Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, Rietjens M, De Lorenzi F, Garusi C, Rossetto F, Martella S, Manconi A, Bertolini F, Curigliano G, Veronesi P, Santillo B, Rotmensz N (2012) Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann Oncol* 23:582–588
- Petit JY, Rietjens M, Botteri E, Rotmensz N, Bertolini F, Curigliano G, Rey P, Garusi C, De Lorenzi F, Martella S, Manconi A, Barbieri B, Veronesi P, Intra M, Brambullo T, Gottardi A, Sommarino M, Lomeo G, Iera M, Giovino V, Lohsiriwat V (2013) Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* 24:1479–1484
- Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, Baroni G, Galiè M, Molino AM, Mercanti A, Micciolo R, Sbarbati A (2010) Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthet Plast Surg* 34:475–480
- Zhang Y, Daquinag A, Traktuev DO, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, March KL, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG (2009) White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res* 69:5259–5266
- Chaput B, Foucras L, Le Guellec S, Grolleau JL, Garrido I (2013) Recurrence of an invasive ductal breast carcinoma 4 months after autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 131:123–124
- Smit JM, Tielemans HJ, de Vries B, Tuinder SM (2014) Recurrence of invasive ductal breast carcinoma 10 months after autologous fat grafting. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:e127–e128
- Agha RF, Fowler AJ, Herlin C, Goodacre TE, Orgill DP (2014) Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 68:143–161
- Gale KL, Takha EA, Ball G, Tan VKM, McCulley SJ, Macmillan RD (2015) A case controlled study of the oncological safety of fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. Publish Ahead of Print
- Registered clinical trials. <http://www.clinicaltrials.gov>. Accessed 24 May 2014

25. 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. *Aesthet Plast Surg* 32:48–55
26. Zocchi ML, Zuliani F (2008) Bicompartmental breast lipotransferring. *Aesthet Plast Surg* 32:313–328
27. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R (2009) Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J* 29:360–376
28. Illouz YG, Sterodimas A (2009) Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience. *Aesthet Plast Surg* 33:706–715
29. Panettiere P, Marchetti L, Accorsi D (2009) The serial free fat transfer in irradiated prosthetic breast reconstructions. *Aesthet Plast Surg* 33:695–700
30. Ueberreiter K, von Finckenstein JG, Cromme F, Herold C, Tanzella U, Vogt PM (2010) BEAULI™—a new and easy method for large-volume fat grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 42:379–385
31. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K (2010) Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 16:169–175
32. Caviggioli F, Maione L, Forcellini D, Klinger F, Klinger M (2011) Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome. *Plast Reconstr Surg* 128:349–352
33. Del Vecchio DA, Bucky LP (2011) Breast augmentation using preexpansion and autologous fat transplantation: a clinical radiographic study. *Plast Reconstr Surg* 127:2441–2450
34. Kamakura T, Ito K (2011) Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthet Plast Surg* 35:1022–1030
35. Salgarello M, Visconti G, Rusciani A (2011) Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art. *Plast Reconstr Surg* 127:2176–2185
36. Cigna E, Ribuffo D, Sorvillo V, Atzeni M, Piperno A, Calò PG, Scuderi N (2012) Secondary lipofilling after breast reconstruction with implants. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:1729–1734
37. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, Floris M, Fiaschetti V, Floris R, 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 Transl Med* 1:341–351
38. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, Baker TJ (2012) Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg* 129:1173–1187
39. Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, Sassoon E, Delay E, Weiler-Mithoff EM (2012) Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol* 38:382–389
40. Auclair E, Blondeel P, Del Vecchio DA (2013) Composite breast augmentation: soft-tissue planning using implants and fat. *Plast Reconstr Surg* 132:558–568
41. Bonomi R, Betal D, Rapisarda IF, Kalra L, Sajid MS, Johri A (2013) Role of lipomodelling in improving aesthetic outcomes in patients undergoing immediate and delayed reconstructive breast surgery. *Eur J Surg Oncol* 39:1039–1045
42. Costantini M, Cipriani A, Belli P, Bufi E, Fubelli R, Visconti G, Salgarello M, Bonomo L (2013) Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation. *Clin Radiol* 68:27–33
43. Fiaschetti V, Pistolese CA, Fornari M, Liberto V, Cama V, Gentile P, Floris M, Floris R, Cervelli V, Simonetti G (2013) Magnetic resonance imaging and ultrasound evaluation after breast autologous fat grafting combined with platelet-rich plasma. *Plast Reconstr Surg* 132:498e–509e
44. Hoppe DL, Ueberreiter K, Surlemont Y, Peltoniemi H, Stabile M, Kauhanen S (2013) Breast reconstruction de novo by water-jet assisted autologous fat grafting—a retrospective study. *Ger Med Sci* 11:Doc17
45. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariemi K, Mikkonen R, Kuokkanen H, Herold C (2013) Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 66:1494–1503
46. Khouri RK, Khouri RK, Rigotti G, Marchi A, Cardoso E, Rotemberg SC, Biggs TM (2014) Aesthetic applications of brava-assisted megavolume fat grafting to the breasts: a 9-year, 476-patient, multicenter experience. *Plast Reconstr Surg* 133:796–807
47. Maione L, Vinci V, Caviggioli F, Klinger F, Banzatti B, Catania B, Lisa A, Klinger M (2014) Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome following breast conservative surgery and radiotherapy. *Aesthet Plast Surg* 38:528–532
48. Small K, Choi M, Petruolo O, Lee C, Karp N (2014) Is there an ideal donor site of fat for secondary breast reconstruction? *Aesthet Surg J* 34:545–550
49. Uda H, Sugawara Y, Sarukawa S, Sunaga A (2014) Brava and autologous fat grafting for breast reconstruction after cancer surgery. *Plast Reconstr Surg* 133:203–213
50. Heymans O, Castus P, Grandjean FX, Van Zele D (2006) Liposuction: review of the techniques, innovations and applications. *Acta Chir Belg* 106:647–653
51. Girard A-C, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran MK, Delarue P, Hulard O, Lefebvre-d'Helencourt C, Roche R, Hoareau L, Festy F (2013) New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthet Plast Surg* 37:144–152
52. Moore JH, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzowski Z, Noto PF, Caro JF (1995) Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthet Plast Surg* 19:335–339
53. Li K, Gao J, Zhang Z, Li J, Cha P, Liao Y, Wang G, Lu F (2013) Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthet Plast Surg* 37:153–158
54. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA (2004) In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 113:391–397
55. Erdim M, Tezel E, Numanoglu A, Sav A (2009) The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:1210–1214
56. Khouri RK, Rigotti G, Cardoso E, Khouri RKJ, Biggs TM (2014) Megavolume autologous fat transfer II. *Plast Reconstr Surg* 133:1369–1377
57. Del Vecchio D, Fichadia H (2012) Autologous fat transplantation—a paradigm shift in breast reconstruction, breast reconstruction—current techniques. In: Marzia Salgarello (ed) www.intechopen.com, p 217–236
58. Tambasco D, Arena V, Grusso F, Cervelli D (2013) Adipocyte damage in relation to different pressures generated during manual lipoaspiration with a syringe. *Plast Reconstr Surg* 131:645–646
59. Shiffman MA, Mirrafati S (2001) Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg* 27:819–826
60. Cheriyan T, Kai Kao H, Qiao X, Guo L (2014) Low harvest pressure enhances autologous fat graft viability. *Plast Reconstr Surg* 133:1365–1368
61. Condé-Green A, de Amorim NF, Pitanguy I (2010) Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and

- mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:1375–1381
62. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, Huang C, Gabbay J, Ghadjar K, Miller TA (2007) Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg* 119:323–331
 63. Hoareau L, Bencharif K, Girard A-C, Gence L, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R (2013) Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 66:712–719
 64. Coleman SR, Saboeiro AP (2007) Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 119:775–787
 65. Allen RJ, Canizares O, Scharf C, Nguyen PD, Thanik V, Saadeh PB, Coleman SR, Hazen A (2013) Grading lipoaspirate: is there an optimal density for fat grafting? *Plast Reconstr Surg* 131:38–45
 66. Ferraro GA, De Francesco F, Tirino V, Cataldo C, Rossano F, Nicoletti G, D'Andrea F (2011) Effects of a new centrifugation method on adipose cell viability for autologous fat grafting. *Aesthet Plast Surg* 35:341–348
 67. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K (2008) Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 121:1033–1042
 68. Delay E, Streit L, Toussoun G, La Marca S, Ho Quoc C (2013) Lipomodelling: an important advance in breast surgery. *Acta Chir Plast* 55:34–43
 69. Zhu M, Cohen SR, Hicok KC, Shanahan RK, Strem BM, Yu JC, Arm DM, Fraser JK (2013) Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system. *Plast Reconstr Surg* 131:873–880
 70. Dos-Anjos Vilaboa S, Llull R, Mendel TA (2013) Returning fat grafts to physiologic conditions using washing. *Plast Reconstr Surg* 132:323–326
 71. Chung MT, Paik KJ, Atashroo DA, Hyun JS, McArdle A, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Tevlin R, Duldulao C, Hu MS, Walmsley GG, Parisi-Amon A, Momeni A, Rimsa JR, Commons GW, Gurtner GC, Wan DC, Longaker MT (2014) Studies in fat grafting: part I. Effects of injection technique on in vitro fat viability and in vivo volume retention. *Plast Reconstr Surg* 134:29–38
 72. Spartalis ED, Tomos P, Konofaos P, Dimitroulis D, Kouraklis G (2014) Letter to Editor Breast reconstruction with autologous fat graft; does platelet-rich plasma affect patient's survival? *Int J Clin Exp Med* 7:329–330
 73. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Vento AMD, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24:3095–3100
 74. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, Kusumoto K (2014) Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs* 17:186–192
 75. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B (2011) Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 3:25–33
 76. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, Herbert BR (2012) Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* 10:172–188
 77. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118–129
 78. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228
 79. Tabit CJ, Slack GC, Fan K, Wan DC, Bradley JP (2012) Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes. *Aesthet Plast Surg* 36:704–713
 80. Stig-Frederik Trojahn K, Anne F-N, Anders Bruun M, Jens Jørgen E, Roberto SO, Peter VG, Jens K, Maria K, Bo Sonnich R, Maj-Lis Møller T, Carsten T, Ebbe D, Krzysztof Tadeusz D (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
 81. Del Vecchio D, Rohrich RJ (2012) A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions. *Plast Reconstr Surg* 130:511–522
 82. Mestak O, Sukop A, Hsueh YS, Molitor M, Mestak J, Matejovska J, Zarubova L (2014) Centrifugation versus PureGraft for fat-grafting to the breast after breast-conserving therapy. *World J Surg Oncol* 12:178–186

D. L'étude de comparaison des nouveaux procédés de lipotransfert

Comme nous pouvons le constater, les techniques de lipotransfert sont très diverses et ce sur chaque étapes de l'opération. Toutes ces techniques sont actuellement utilisées en clinique humaine pour les mêmes applications sans qu'aucune ne se soit clairement démarquée des autres. Ce contexte conduit à la multiplication des protocoles sans qu'il n'y ait de standardisation de la technique.

Or chaque façon de procéder influe sur les résultats à moyen/long terme.

Même si les étapes du lipotransfert ont été décortiquées et les effets de chaque paramètre documentés, il y a un réel manque d'étude comparative entre les protocoles proposés aux chirurgiens.

C'est pourquoi nous avons réalisé une étude comparant 5 techniques de lipotransfert telles qu'elles sont utilisées en clinique et se basant sur des procédés différents.

- La technique Coleman se basant sur une infiltration de ratio 1:1, une aspiration manuelle avec une seringue de 10cc, une centrifugation du tissu à 900g pendant 3min.
- La technique BodyJet, utilisant le principe du WAL avec une infiltration continue et une aspiration automatisée, puis une décantation dans un fat trap.
- La technique Macrofill, utilisant une infiltration de ratio 1:1, une aspiration manuelle avec une seringue à incrément 60cc, 3 centrifugations (100g, 100g et 400g pendant 1s, 1s et 1min) entrecoupées de lavages au Ringer Lactate.
- La technique Microfill, utilisant une infiltration de ratio 1:1, une aspiration manuelle avec une seringue de 10cc, 3 centrifugations (100g, 100g et 400g pendant 1s, 1s et 1min) entrecoupées de lavages au Ringer Lactate.
- La technique PAL couplée à la poche PureGraft, avec une infiltration de ratio 1:1, une aspiration automatisée et une vibration de la canule puis une filtration couplée à un lavage.

Critères de comparaison

Comme expliqué précédemment, la majeure limite du lipotransfert se situe dans son taux de prise de greffe variable avec des résorptions de greffon allant de 10 à 80% selon les zones et les techniques. Cette résorption a lieu à court et à moyen terme en clinique avec une stabilisation du volume vers 6 à 12 mois selon les applications.

Ce taux est dépendant de la survie des adipocytes. En effet, les adipocytes représentent plus de 80% du volume du tissu adipeux et leur mort conduit à la libération des lipides contenus dans les vacuoles de ces cellules.

C'est pourquoi dans notre étude comparative nous avons privilégié une comparaison de ce paramètre de résorption entre les différentes techniques.

Pour ce faire, 2 modèles d'étude du lipotransfert décrits dans la littérature ont été utilisés :

- Un modèle *in vitro* de culture du tissu adipeux total à court terme (période de 48 heures)
- Un modèle pré-clinique *in vivo* d'injection sous-cutanée du greffon de graisse chez des souris immunotolérantes, avec une étude à moyen terme (délai de 4 semaines).

Toute cette étude a été rendue possible grâce à la collaboration mise en place entre la clinique Bretéché et le laboratoire INSERM U791 représenté par le CHU de Nantes.

Les prélèvements à la clinique ont tous été effectués par l'équipe du Dr Lefourn et les tissus ont été transportés au laboratoire dans une période de 20min suivant le dernier prélèvement en prenant soin de conserver le prélèvement à une température allant de 18 à 22°C.

Les études animales sur souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) ont été réalisées au sein d'une animalerie agréée. Les règles d'éthiques et de bien-être animal ont été respectées et l'étude a fait l'objet du dépôt d'un « dossier de saisine » ou « formulaire d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques » comme demandé par l'arrêté du 1^{er} février 2013 de la directive européenne 2010/63/UE.

E. Article : Autologous Fat Grafting: a comparison study of four current commercial protocols

Abstract

Background: Autologous Fat Grafting is a widely used technique that gives natural results when treating soft tissue deficiencies. However, there is still no consensus on which is the best procedure to use, leading to unpredictable results due to fat graft resorption.

Objectives: This study compared 4 commercial lipotransfer devices by analyzing the behavior of processed adipose tissue and the outcome of the adipose graft in an *in vivo* model.

Methods: 4 different protocols that used manual, power or water assisted lipoaspiration and then decantation, centrifugation or filtration were used on each of 8 patients to process lipoaspirate. Harvested adipose tissue was assessed *in vitro* (tissue resorption, oil formation, cytokine secretion). Graft resorption rate was calculated and histological analyses were performed after subcutaneous injection in a murine model.

Results: All protocols resulted in very low oil formation and histologically healthy grafts. The tissue volume was significantly greater after 2 days in culture when using manual lipoaspiration and soft centrifugations/washing steps (Microfill[®]/Macrofill[®]) compared to Water-Assisted Lipoaspiration/Decantation (BodyJet[®]) and Power-Assisted Lipoaspiration/Filtration (PAL[®]+PureGraft[®]). These results were confirmed in mice one month after subcutaneous injection, with greater efficiency obtained with protocols that employed (A) manual aspiration, (B) soft centrifugations and (C) washing steps.

Conclusions: We have confirmed that the choice of technique used to process adipose tissue during lipotransfer surgery can highly influence fat grafting efficacy. In our study, the use of soft centrifugations lead to better graft efficiency and lower resorption compared to decantation or single filtration.

1 *Original article: Autologous Fat Grafting: a comparison study of four current*
2 **commercial protocols**

3

4 Vincent Hivernaud, M.S.^{1, 2, 3} Bruno Lefourn, M.D.⁵ Myriam Robard, B.S.⁶ Jérôme
5 Guicheux, Ph.D.^{1, 2, 3, 4} Pierre Weiss, D.D.S., Ph.D.^{1, 2, 3, 4}

6

7 ¹ INSERM, LIOAD, UMR-S 791, Nantes, France

8 ² Université de Nantes, UMR-S 791, LIOAD, UFR Odontologie, Nantes, France

9 ³ ONIRIS, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, France

⁴ CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France

10 ⁵ Clinique Bretéché, Département de Chirurgie Plastique et Reconstructive, Nantes, France

11 ⁶ Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell), Structure
12 Fédérative de Recherche François Bonamy, Université de Nantes, Nantes, France

13

14 *Abstract*

15

16 **Background:** Autologous Fat Grafting is a widely used technique that gives natural results
17 when treating soft tissue deficiencies. However, there is still no consensus on which is the
18 best procedure to use, leading to unpredictable results due to fat graft resorption.

19 **Objectives:** This study compared 4 commercial lipotransfer devices by analyzing the
20 behavior of processed adipose tissue and the outcome of the adipose graft in an *in vivo* model.

21 **Methods:** 4 different protocols that used manual, power or water assisted lipoaspiration and
22 then decantation, centrifugation or filtration were used on each of 8 patients to process
23 lipoaspirate. Harvested adipose tissue was assessed *in vitro* (tissue resorption, oil formation,
24 cytokine secretion). Graft resorption rate was calculated and histological analyses were
25 performed after subcutaneous injection in a murine model.

26 **Results:** All protocols resulted in very low oil formation and histologically healthy grafts.
27 The tissue volume was significantly greater after 2 days in culture when using manual
28 lipoaspiration and soft centrifugations/washing steps (Microfill[®]/Macrofill[®]) compared to
29 Water-Assisted Lipoaspiration/Decantation (BodyJet[®]) and Power-Assisted
30 Lipoaspiration/Filtration (PAL[®]+PureGraft[®]). These results were confirmed in mice one
31 month after subcutaneous injection, with greater efficiency obtained with protocols that
32 employed (A) manual aspiration, (B) soft centrifugations and (C) washing steps.

33 **Conclusions:** We have confirmed that the choice of technique used to process adipose tissue
34 during lipotransfer surgery can highly influence fat grafting efficacy. In our study, the use of
35 manual aspiration combined to soft centrifugations lead to the best results in the selected
36 models.

37

38 Introduction

39

40 Interest in autologous fat grafting (AFG) has increased since the advent of lipoaspiration in
41 the 1970's. It is used both for aesthetic purposes (volume augmentation, wrinkles) and for
42 plastic reconstruction to treat adipose tissue affections (lipodystrophy) or injuries (burn
43 marks, mastectomy, scars...)¹. The principle of this procedure is to provide soft tissue filling
44 of a chosen area of the body *via* subcutaneous injection of adipose tissue that has been
45 harvested from a donor site (mostly abdomen according to the American Society of Plastic
46 Surgeons in 2013).

47

48 However, high levels of graft resorption several months after injection (from 30% to 80%
49 depending on site, volumes and protocols) is still a major clinical limit to AFG^{2,3}.

50

51 The AFG technique can be divided into 4 steps: infiltration, aspiration, purification and
52 reinjection. Each of these steps is critical for the survival of adipose and stromal vascular cells
53 and are influential in post-injection outcome^{2,4,5}. The majority of surgeons harvest fat with a
54 syringe and manual suction⁶, but new alternative devices are also available. Centrifugation is
55 commonly used during purification, but high speed centrifugation has been shown to be
56 harmful to adipose tissue cells^{7,8}. For this reason, other techniques have been developed that
57 utilize decantation, filtration systems, or soft centrifugations^{5,9,10}. Finally, washing the tissue
58 to remove blood and infiltration solutions has been shown to improve results⁷, but this
59 technique is still only used in a handful of protocols.

60

61 Currently, surgeons have numerous devices at their disposal that use different processes to
62 harvest and purify tissue. Despite growing interest in this field, there is still no consensus

63 about the way in which fat should be processed from harvesting all the way through to fat
64 transfer, leading to highly variable results.

65

66 In this study, the adipose tissue graft was harvested and processed *via* 4 “new generation”
67 lipotransfer protocols that represent 3 different concepts: BodyJet® (water assisted
68 lipoaspiration and decantation), PAL®+PureGraft® (power assisted lipoaspiration and
69 filtration), Microfill® and Macrofill® (manual aspiration, soft centrifugation and washing).

70 The harvested tissue was compared *in vitro* and *in vivo* to determine which protocol gives the
71 best results in terms of quality (oil formation, histological aspect) and quantity (resorption
72 rate).

73

74 **Material and Methods**

75

76 *Patients:*

77

78 All protocols were approved by the French national ethics committee (code DC-2011-1399).
79 Lipoaspirates were obtained (January 2014 to May 2015), from 8 female patients undergoing
80 abdominal lipoplasty or dermolipectomy (mean age: 41.5 (range 29-55) and mean body mass
81 index: 26.2 (range 23.5-29.5)). All patients gave their informed consent. Exclusion criteria
82 were BMI>30 and lipodystrophy syndrome. For each patient, the abdomen was divided into 4
83 sites and the study protocols were randomly attributed to each site. For each protocol, the
84 same amount of lipoaspirate (75cc) was harvested with a total of 300c per patient for all 4
85 protocols.

86 For each protocol, apart from Water-Assisted-Lipoaspiration (WAL), a tumescent solution
87 (saline solution NaCl 0.9%, adrenaline 2%) was infiltrated prior to aspiration with a ratio of
88 1cc infiltrate for 1cc of harvested tissue. With the WAL protocol, the tumescent solution was
89 infiltrated before and during the harvesting step in accordance with the manufacturer's
90 instructions (Bodyjet[®] - Human med, Schwerin-Germany).

91

92 *Harvesting and processing methods:*

93

94 Harvesting products and consumables were generously provided by Adip'sculpt, Human-med
95 and Microaire companies.

96

97 WAL protocol:

98 Infiltration and tissue aspiration were performed with the Bodyjet[®] device. Infiltration was set
99 at 2 and aspiration set at 0.5atm (approximately 380mmHg). The aspiration device was
100 connected to a fat trap (Lipocollector 3[®] - Human-med, Schwerin-Germany) in which the
101 tissue was allowed to decant for at least 15min. The lower liquid phase was then discarded
102 and the adipose tissue phase was used for our experiments.

103

104 PAL and filtration:

105 Following infiltration, the fat tissue was harvested with a 3mm multi-hole cannula connected
106 to a PAL device (PAL[®] - Microaire, Charlottesville-USA) with vibration set at 5/10 and a
107 0.5atm aspiration. The harvested adipose tissue was then washed through a filtration device
108 (Puregraft[®] - Cytori Therapeutics, San Diego-USA) according to the manufacturer's
109 instructions. Briefly, fat was inserted into the Puregraft[®] bag and then washed twice with the
110 same amount of washing solution (Ringer Lactate – Bbraun, Melsungen-Germany). After
111 each washing step, liquid and oil fraction were allowed to evacuate into the appropriate bag.
112 The remaining tissue was used for our experiments.

113

114 Multiple washing and centrifugation protocol:

115 The adipose tissue was harvested and processed with two slightly different protocols
116 according to the manufacturer's instructions (Microfill[®] and Macrofill[®] – Adip'sculpt, Sainte
117 Clotilde-France). With Microfill[®], the tissue was harvested with a 2mm multi-hole cannula
118 connected to a 10cc syringe and a vacuum of -0.5atm (2cc aspiration). With Macrofill[®], a
119 3.5mm multi-hole aspiration cannula connected to a 50cc vacuum-controlled syringe (-0.5
120 atm) was used. Once harvested with either of the two protocols, fat tissue was washed by the
121 addition of 15cc of Ringer Lactate for 35cc of tissue and centrifuged at 100g for 10s. This
122 procedure was repeated twice. A final washing step was followed by centrifugation at 400g

123 for 1min. At each step, the oil supernatant and the lower liquid phase were discarded. The
124 remaining tissue was used for our experiments.

125

126 *In vitro experiments:*

127

128 Tissue culture:

129 With the tissue harvested from the first 5 patients, processed fat tissue from each protocol was
130 cultured in 24 well microplates (Corning, Corning-USA). In each well, one cubic centimeter
131 of fat was combined with 2cc of standard medium: Dulbecco's modified Eagle's medium
132 GlutaMax (Thermo Fischer Scientific, Waltham-USA), 10% Fetal Calf Serum (PAN-Biotech,
133 Aidenbach-Germany), Penicillin 10 000U/mL, and Streptomycin 10 000µg/mL (Thermo
134 Fischer Scientific). Plates were incubated at 37°C with 21% oxygen and 5% carbon dioxide
135 (CO₂). After 2 days of culture, tissue and medium were collected and gently centrifuged at
136 400g for 1min to determine the volume of oil (upper phase) and the remaining volume of
137 tissue (middle phase).

138

139 Tissue secretion of inflammatory cytokines:

140 After 2 days of adipose tissue culture and centrifugation for 400g/1min, the lower liquid phase
141 was collected and Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) and Interleukin 6 (IL6) secretion
142 were quantified with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the
143 manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego-USA). Briefly, plates coated with an
144 anti-MCP1 or an anti-IL6 antibody were incubated with the samples. A biotinylated antibody
145 (anti-MCP1 or anti-IL6) coupled with an HRP enzyme was added.

146

147 Stromal vascular fraction cells isolation:

148 On 4 patients, part of tissue samples obtained by liposuction were digested under agitation for
149 1h at 37°C in Ringer-Lactate buffer containing 1.5% collagenase (NB4, SERVA, Heidelberg-
150 Germany, PZ activity 0.175U/mg) followed by centrifugation at 900g for 3min. The cell
151 pellet (SVF, Stromal Vascular Fraction) was then resuspended in Ringer Lactate and washed
152 with centrifugation at 900g for 3min. This operation was repeated twice. After the third wash,
153 the pellet was resuspended in Ringer Lactate and filtered through Steriflip 100µm (Millipore,
154 Molsheim-France). After centrifugation at 900g for 3min, cells were resuspended in standard
155 medium then cell number and viability were assessed microscopically by trypan blue dye
156 exclusion.

157

158 *In vivo experiments:*

159

160 *Animals:*

161 Thirty-six adult (2 month old), CB17 severe combined immunodeficient (SCID) female mice
162 (Charles River Laboratories, Wilmington-USA) were used in this study. Two subcutaneous
163 tunnels were created in the mice flanks to perform 2 injections per mouse (n=6 injections per
164 group). One cubic centimeter of fat was injected with a retrograde movement using a 2mm
165 cannula connected to a 1cc syringe. After 4 weeks, mice were sacrificed with carbon dioxide
166 and fat grafts were retrieved. Samples were fixed in 4% formaldehyde for 48h. This
167 experiment was repeated 3 times with the tissues obtained from the three last patients.

168

169 *Implant characterization:*

170 Grafts were retrieved and fixed one month after implantation. Fixed samples were quickly
171 dried and weighed with a precision scale.

172

173 Histological analyses:

174 Fixed samples were dehydrated in a series of alcohol baths and embedded in paraffin. Five
175 micrometer tissue sections were performed on a microtome and stained with
176 Hematoxylin/Phloxin/Saffron (HPS) staining. Slides were scanned (Hamamatsu nanozoomer)
177 and area measurements and histological scoring was carried out with NDPview software
178 (Hamamatsu, Hamamatsu-Japan). Histological scoring was adapted from a previous study¹¹.

179

180 Statistical analysis:

181 All statistical analyses were conducted with Prism (GraphPad, La Jolla-USA) software.
182 Significance was determined by Kruskal-Wallis analysis combined with a Dunn's Multiple
183 Comparison test.

184

185 **Results**

186

187 *In vitro analysis of harvested lipoaspirates*

188

189 Cellularity and stem cell contents

190 Isolation of SVF cells from the lipoaspirates of the first 4 patients was carried out with no
191 significant cellular differences being observed. Moreover, Adipose Stromal Cells (ASC) were
192 isolated by plastic adhesion over a period of 24h and again no significant differences were
193 found in the number of cells per milliliter of lipoaspirate (data not shown).

194

195 Tissue resorption in culture

196 The lipoaspirates obtained from 5 donors and harvested/purified with 4 protocols were seeded
197 in culture plates with culture medium. After 2 days of culture the remaining tissue phase was
198 significantly higher with the two manual aspiration/centrifugation techniques (77.7 and
199 79.5%) compared to the WAL/decantation (48.9%) (Figure 1A). The proportion of residual
200 tissue seemed intermediate with the PAL/filtration (62.2%) protocol but no statistical
201 differences were noted.

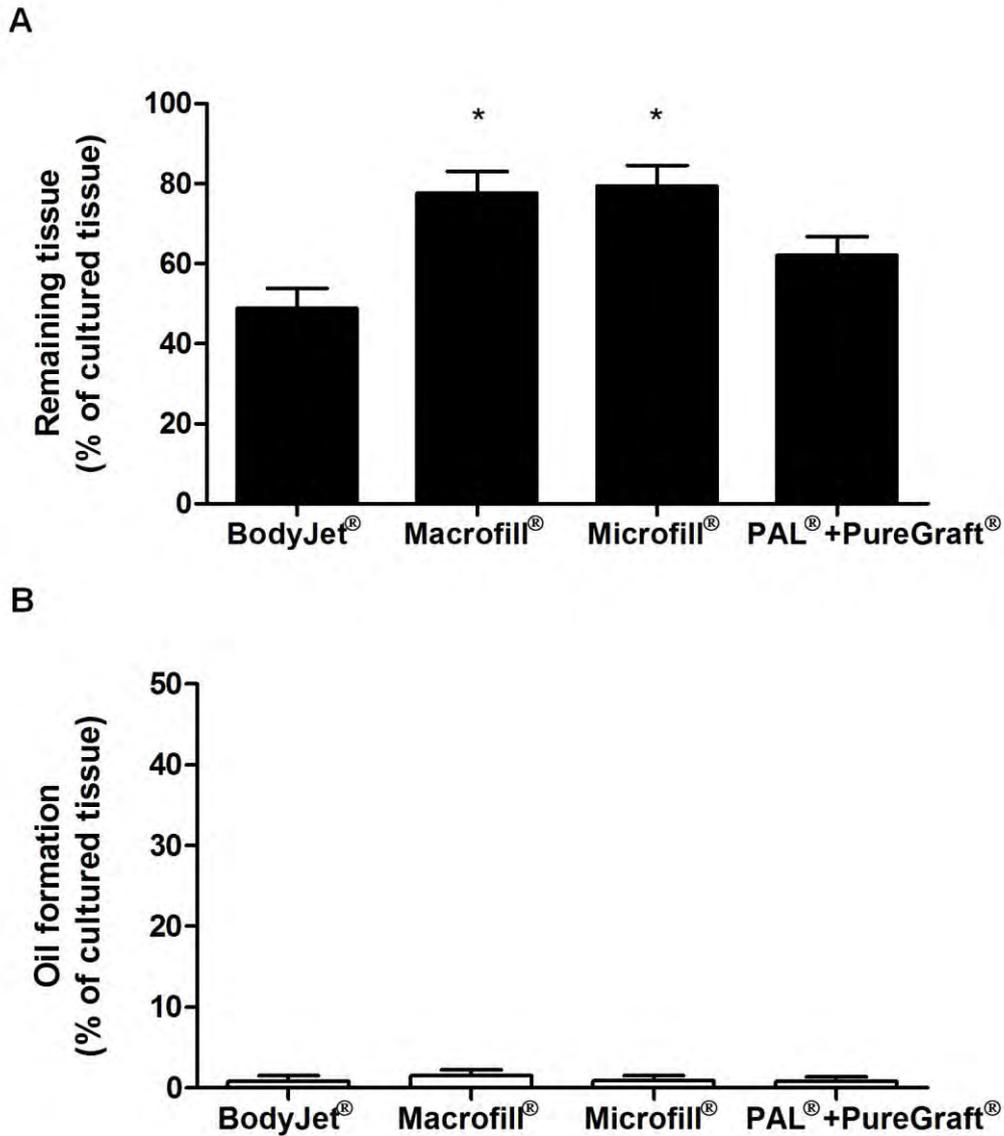
202

203 Oil formation in culture

204 In addition to the adipose tissue phase, oil formation was also measured (Figure 1B). In all
205 protocols, only a limited amount of oil was detected (under 2% of initial volume: 0.9, 1.5, 0.9
206 and 0.8% respectively).

207

Figure 1



208

209 Figure 1: *In vitro* evaluation of adipose tissue and oil quantity after harvesting and processing

210 with the 4 different protocols. Processed lipoaspirates were incubated in the presence of

211 culture medium for 48 hours. (A) The adipose phase was assessed and the results expressed as

212 a percentage of initial volume. * $p < 0.01$ compared to the BodyJet® condition. (B) The oil

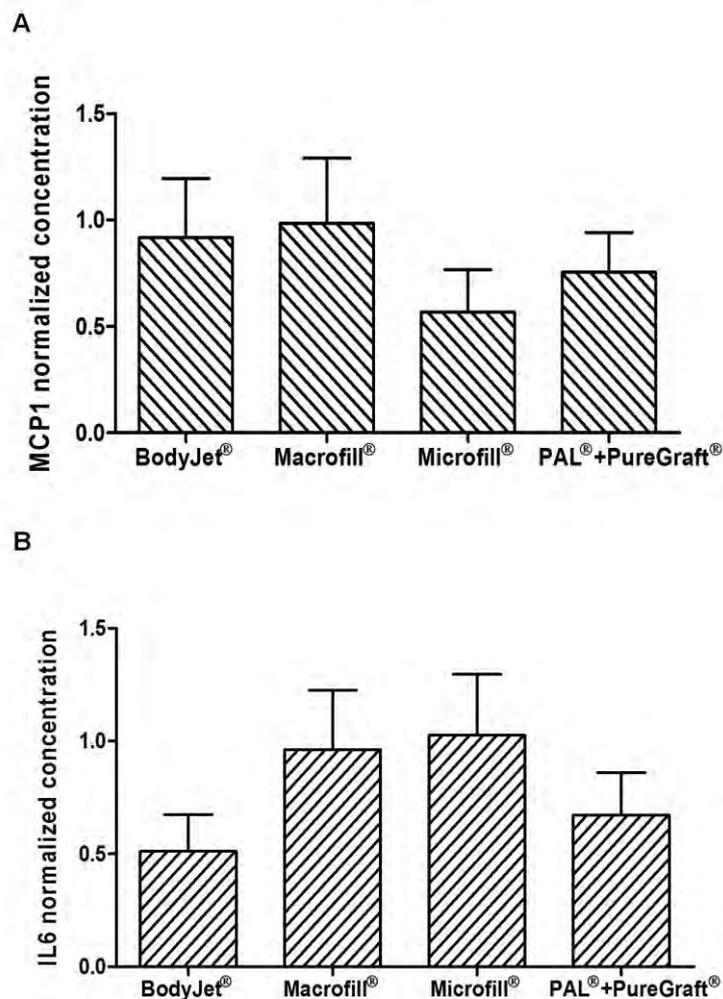
213 supernatant was measured and the results expressed as a percentage of initial volume.

214

215 Cytokine secretion in culture

216 After two days of culture, the tissue medium (lower phase) was harvested, filtered and
217 cytokine secretion was evaluated with an ELISA test. Extensive patient-dependent cytokine
218 secretion was observed. When comparing the techniques, no significant differences were
219 found for MCP1 or IL6 secretion (Figure 2A and 2B). In all cases, cytokine secretion was
220 lower than 100ng/mL.

Figure 2



221 Figure 2: Adipose tissue cytokine secretion after 48h of culture. Processed lipoaspirates were
222 incubated in the presence of culture medium for 48 hours, then medium subnatant was
223 retrieved to assess MCP1 (A) or IL6 (B) concentration with ELISA.

224

225 *In vivo analyses of implanted lipoaspirates*

226

227 Histological scoring at one month

228 Harvested grafts were analyzed histologically for the presence of oil cysts, fibrous tissue and
229 inflammatory cell infiltration (Table 1). The results of histological scoring are presented in
230 figure 3A. The lower the histological score, the more oil cysts, fibrous tissue and cell
231 infiltration was present in the samples (examples are listed in figure 4).

232 No significant histological differences were observed when comparing the grafts (with scores
233 of 4.72 for WAL/decantation, 5.75 and 5.25 for manual aspiration/centrifugation and 5.76 for
234 PAL/filtration).

Table 1. Histological scoring of adipose grafts 1 month after implantation

Scoring Criteria	Evaluation	Score
<i>Oil vacuoles</i>	<2%	5
	2-5%	4
	5-10%	3
	10-15%	2
	15-20%	1
	>20%	0
<i>Signs of fibrosis</i>	Absence	3
	Minimal	2
	Moderate	1
	Extensive	0
<i>Signs of inflammation</i>	Absence	3
	Minimal	2
	Moderate	1
	Extensive	0
<i>Adipocyte size and shape</i>	Homogeneous	1
	Heterogeneous	0
Maximal score		12

The higher scores are attributed to healthy criteria, whereas the lower scores are assigned to injured grafts.

235

236 Table 1: Detailed histological scoring grid of adipose tissue grafts.

237

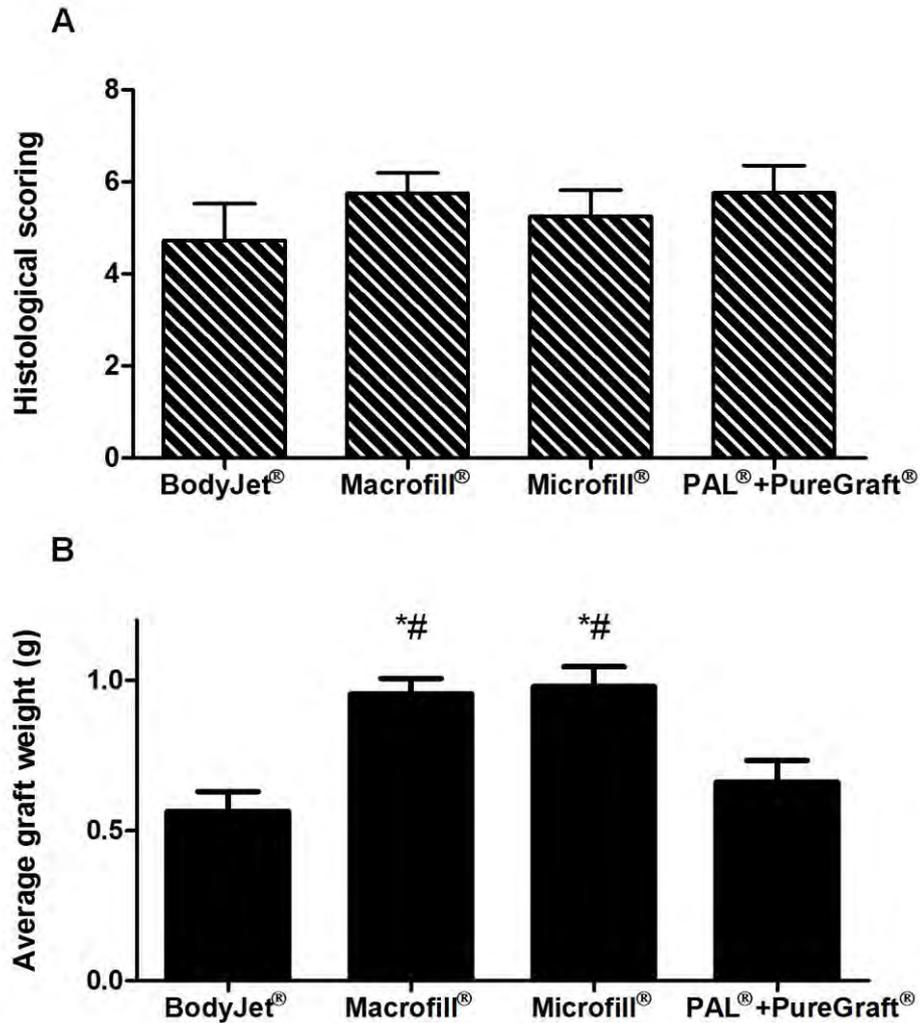
238 Tissue resorption after one month

239 One cubic centimeter of tissue obtained with each protocol was implanted in the subcutaneous
240 tissue of immunodeficient mice. After one month, grafts were harvested and the remaining
241 tissue weight was assessed (Figure 3B). Once again, manual aspiration/centrifugation
242 techniques resulted in higher remaining tissue size and weight (means of 0.95g and 0.97g
243 respectively) than the other two techniques (a mean of 0.56g for WAL/decantation and a
244 mean of 0.66g for PAL/filtration).

245

246

Figure 3



247

248 Figure 3: *In vivo* evaluation of fat grafts one month after subcutaneous implantation. Fat grafts

249 were conducted in mice following liposuction and lipoaspirate purification with 4 different

250 protocols. The entire graft was removed after 1 month. (A) Histological scoring was

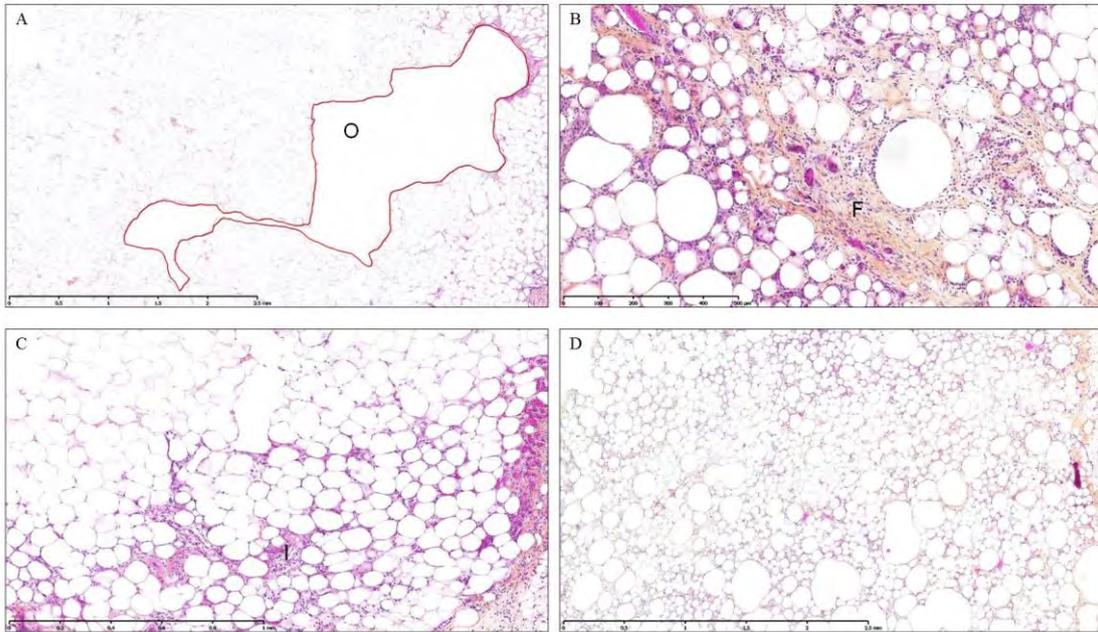
251 performed on HPS stained sections. Longitudinal sections were prepared from 3 different

252 graft depths. (B) Harvested grafts were weighed. * $p < 0.05$ compared to the BodyJet®

253 condition. # $p < 0.05$ compared to the PAL®+PureGraft® condition.

254

Figure 4

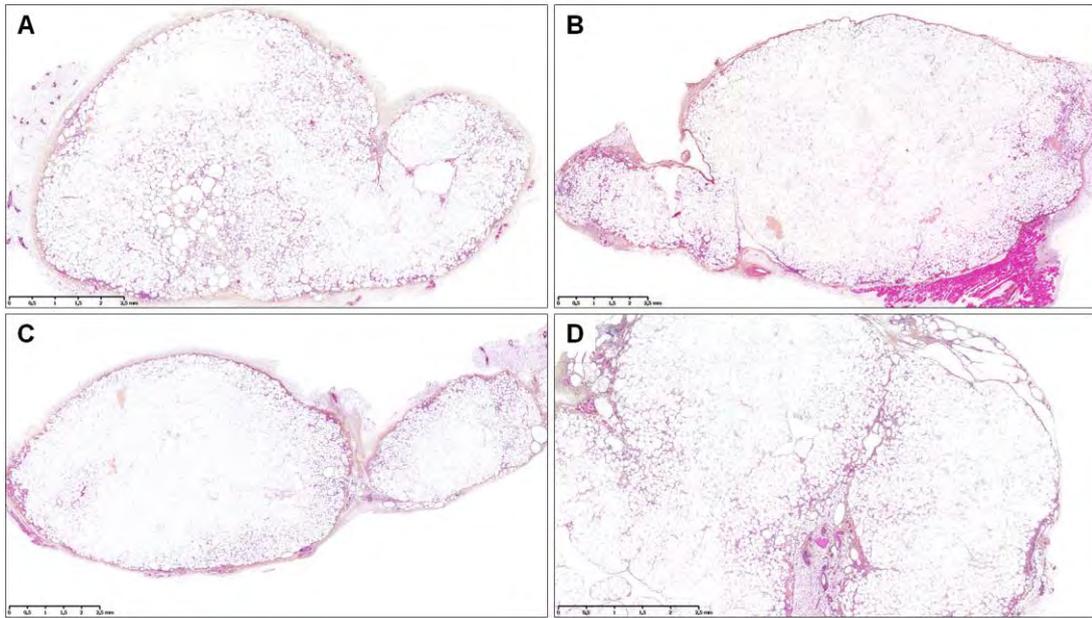


255

256 Figure 4: Examples of graft histological scoring of HPS stained sections. (A) Example of the
257 presence of oil lacuna, marked “O”. (B) Example of the presence of fibrous tissue, marked
258 “F”. (C) Example of the presence of inflammatory infiltration, marked “I”. (D) Example of
259 heterogeneity of adipocyte size and shape.

260

Figure 5



261

262 Figure 5: Representative histological images of HPS stained graft sections 1 month after sub-
263 cutaneous injection in mice. (A) graft processed with the BodyJet® protocol. (B) graft
264 processed with the Macrofill® protocol. (C) graft processed with the Microfill® protocol. (D)
265 graft processed with the PAL®+PureGraft® protocol.

266

267 **Discussion**

268

269 *The actual context of AFG*

270

271 From simple decantation to the use of Coleman's centrifugation protocol, lipotransfer
272 protocols are increasingly being used worldwide. Nowadays, most of the techniques in use are
273 still based on decantation in a fat trap, or centrifugation by a Coleman protocol, but other
274 methods using filtration, washing steps or centrifugation with a range of settings are also
275 used⁶.

276 Faced with reaching the limits of graft resorption during AFG, several teams have set out to
277 define the critical points that can improve the technique in order to develop a new, more
278 efficient approach^{7,10,12-14} that could lead to the commercialization of new lipotransfer
279 devices.

280 In recent years there, there have been great advances in lipotransfer tissue processing. Use of
281 a controlled vacuum during aspiration is now a commonly accepted critical step^{15,16}.
282 Similarly, reducing the use of local anesthetic^{11,17}, or removing any potential blood waste, or
283 slowly reinjecting small aliquots to improve neovascularization and reduce shear stress¹⁸ are
284 all equally important.

285 However, the appearance of several new devices for aspiration and purification has not led to
286 the identification of a protocol that provides the best results in terms of patient volume
287 maintenance, decreasing oil cysts, and avoidance of over-correction or multiple AFG
288 procedures.

289

290 Our study aimed to compare 4 of the “new generation” of AFG clinical protocols with other
291 harvesting and purification methods. The potential for patient-dependent results was limited
292 by comparing the 4 protocols in the same patient¹⁹.

293

294 *Good handling of tissue viability*

295

296 All protocols used a controlled harvesting vacuum to improve the viability of the cells and
297 limit oil formation. In fact, as described previously, no or very little oil formation was
298 detected in the *in vitro* 48h graft culture model, for all conditions^{5,7,20}. Filtration, decantation
299 and, soft centrifugations did not produce more oil after culture or implantation. Our findings
300 confirm that the vacuum used during aspiration is crucial and when not properly controlled is
301 probably responsible for the majority of post-implantation oil formation.

302

303 It is now commonly accepted that the survival of SVF cells is critical for graft vascularization
304 and survival. In our study, all techniques gave the same proportion of SVF cells with more
305 than 90% viability. Moreover, when isolating the adipose stromal cells (ASC) from the SVF,
306 no difference was found in number, viability or proliferation rate after 1 week. These results
307 are concordant with previously described studies²⁰⁻²².

308

309 The lipotransfer protocol, in particular the harvesting of cells from their environment and the
310 concentration of the cellular phase prior to reinjection, can be stressful for the cells, leading to
311 the production of pro-inflammatory cytokines. IL6 and MCP1 are two cytokines secreted by
312 the adipose tissue during inflammation⁷. This inflammatory environment can lower the
313 viability of cells. In our experiments no difference in IL6 and MCP1 secretion was detected in

314 whole adipose tissue (Figure 2) or SVF cells (data not shown), with cytokine secretion
315 remaining low with all protocols.

316

317 Histological analysis showed that all of the techniques resulted in relatively healthy tissue
318 after injection (low rate of oil formation and limited signs of fibrosis or inflammation). These
319 results can be explained by the utilization of our *in vivo* model (relatively small amounts of fat
320 were injected for a limited period of time). Moreover, in our study, the tested protocols
321 maintained adipose graft viability with low vacuum aspiration (<700mmHg), without the use
322 of local anesthetic, and with fat processed in a closed circuit (no contact with the air). The
323 control of these points is critical for post-injection tissue shape, as we have been able to
324 demonstrate with the good histological scores that we obtained in this study.

325

326 However, the main limitation of AFG is not the shape of the graft but the resorption rate. In
327 order to compare the different clinical processing techniques, we calculated the remaining
328 tissue weight in our *in vitro* and *in vivo* models (the density of the graft was constant for all
329 tested conditions).

330

331 *Graft volume maintenance*

332 Major differences between the tested conditions were, in general, observed when we
333 investigated the remaining tissue after processing in our two models: 48h *in vitro* and 1 month
334 *in vivo*. The two manual aspiration/centrifugations/washing protocols that were tested in these
335 two models resulted in higher volumes of fat tissue than the other protocols.

336

337 The BodyJet[®] protocol uses the WAL technique with continuous infiltration during aspiration.
338 This process allows the harvesting of small aliquots of fat, with lobules separated with a jet of

339 water. An advantage of infiltration is that there is a low bleeding rate that results in a "blood
340 free" lipoaspirate. Although the lipoaspirate is much more diluted by the presence of
341 infiltration liquid, the decantation process with the Lipocollector[®] device enables the liquid
342 phase to collect in the bottom of the fat trap through the action of gravity, thus eliminating it
343 almost completely. However, it is extremely likely that a large part of the liquid phase will
344 still be trapped in the adipose phase^{23,24}. This liquid will be the first to be reabsorbed after
345 injection, which explains the lower remaining quantity of tissue obtained with this technique
346 in our study. It would be very interesting to assess the combination of WAL fat harvesting
347 with centrifugation in order to eliminate most of the liquid component prior to reinjection.

348

349 Like the WAL process, PAL[®] enables the harvesting of small fat lobules by dissection of the
350 tissue with cannula vibration. However, care should be taken not to use vibration at full
351 capacity, which could lead to tissue damage. The PAL[®] system is only a fat harvesting
352 aspiration device and does not purify the fat. It is for this reason that, like in a number of other
353 clinical protocols, we combined the PAL[®] aspiration device with the PureGraft[®] filtration
354 bag. The PureGraft[®] system enables the removal of the liquid and oil phases whilst washing
355 the tissue, without the use of gravity (decantation or centrifugation). Our study did not enable
356 us to assess which of the points is critical in improving graft efficacy in this combined system.
357 Nevertheless, to our knowledge this is the first time that this combination has been tested in
358 these experimental models.

359 Good results have previously been obtained with each device^{5,20}. However, previous studies
360 have focused on cell viability and differentiation, blood cell content, or growth factors. In our
361 study, we focused on short and long term resorption of fat grafts and on the histological
362 appearance of the grafts one month post-injection. We highlighted significant differences in

363 terms of graft resorption with the PAL/filtration combination, whilst the amount of stem cells
364 per volume of adipose tissue remained equivalent to other techniques.

365

366 In our study, the Macrofill[®] and Microfill[®] kits, using manual aspiration, washing steps, and
367 soft centrifugations, gave significantly better results as far as remaining tissue was concerned
368 than the other techniques.

369 The results that we obtained are consistent with previous studies that reported the advantages
370 of gentle centrifugation(s)^{4,7,13} and tissue washes^{11,25}.

371 Firstly, controlled aspiration, with a syringe or smooth aspiration with WAL or PAL are
372 crucial for adipocyte survival. However, this alone is insufficient for good resorption results.
373 To achieve this goal, the removal of the majority of the liquid phase of the lipoaspirate is
374 critical (especially if WAL is used).

375 Centrifugation can be harmful to the tissue when duration and speed are excessive. The use of
376 several short and soft centrifugations overcomes these constraints whilst at the same time
377 concentrating the fat tissue. The other advantage of using multiple centrifugations is that it
378 allows washing steps to be included to eliminate possible dead cells, residual local anesthetics
379 and cell debris^{11,26}. It is for this reason that a filtration method, with, for example, a filtration
380 bag, is of interest when washing the lipoaspirate. Furthermore, the addition of soft
381 centrifugations to WAL or PAL harvesting could improve liquid removal and post-reinjection
382 tissue maintenance. In this study, the *in vitro* results indicate that there is higher graft
383 resorption with decantation/filtration purified tissue than tissue purified with centrifugation
384 alone. Our *in vitro* results confirm that more liquid is present in injected tissue that has not
385 undergone centrifugation. This liquid part is likely to be resorbed after injection as is probably
386 the case in our model. The use of centrifugation to remove more liquid from the graft results
387 in decreased resorption.

388

389 This study compares 4 fat preparation protocols, with manual aspiration, WAL, PAL,
390 decantation, centrifugation, and filtration and represents the majority of the techniques in
391 current use. Although this study has made use of *in vitro* and animal models to try and
392 elucidate what is the best way of handling fat grafts in order to decrease resorption, it would
393 now be highly interesting to take the next step forward and conduct a comparative study in a
394 human clinical trial.

395

396 **Conclusion**

397

398 In this study we confirm once again that fat grafting efficacy and outcome are directly
399 affected by the fat processing protocol. Although the impact of manual or assisted aspiration,
400 or the benefits of a controlled harvesting vacuum were not assessed, our *in vitro* and *in vivo*
401 results suggest that using soft centrifugations can lead to good results in terms of graft
402 maintenance.

403 These results must be combined with the previous recommendations of other research teams;
404 such as cannula type (thin) and the use of weak negative pressure during fat harvesting to
405 avoid tissue damage, as well as reducing to a minimum the resorption rate of the lipotransfer.
406 Our results and the recent clinical evaluation of the technique²⁷ strongly support this
407 recommendation.

408

409 **References**

410

411 1. Gutowski KA, ASPS Fat Graft Task Force. Current applications and safety of
412 autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg.*
413 2009;124(1):272-280.

414 2. Hivernaud V, Lefourn B, Guicheux J, et al. Autologous Fat Grafting in the Breast:
415 Critical Points and Technique Improvements. *Aesthet Plast Surg.* 2015; 39(4):547-61.

416 3. Leopardi D, Thavaneswaran P, Mutimer K, Olbourne N, Maddern G. Autologous fat
417 transfer for breast augmentation: a systematic review. *ANZ J Surg.* 2014;84:225-30.

418 4. Condé-Green A, de Amorim N, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and
419 centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a
420 comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63(8):1375-1381.

421 5. Zhu M, Cohen S, Hicok K, et al. Comparison of three different fat graft preparation
422 methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a
423 closed system. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(4):873-880.

424 6. Kling R, Mehrara B, Pusic A, et al. Trends in autologous fat grafting to the breast: a
425 national survey of the american society of plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg.*
426 2013;132(1):35-46.

427 7. Hoareau L, Bencharif K, Girard A-CC, et al. Effect of centrifugation and washing on
428 adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. *J Plast Reconstr Aesthet*
429 *Surg.* 2013;66(5):712-719.

430 8. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, et al. Influences of centrifugation on cells and
431 tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation.
432 *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(3):1033.

- 433 9. Fodor P, Vogt P. Power-assisted lipoplasty (PAL): A clinical pilot study comparing
434 PAL to traditional lipoplasty (TL). *Aesthet Plast Surg.* 1999;23(6):379-385.
- 435 10. Hoppe D, Ueberreiter K, Surlemont Y, Peltoniemi H, Stabile M, Kauhanen S. Breast
436 reconstruction de novo by water-jet assisted autologous fat grafting—a retrospective study.
437 *GMS German Medical Science.* 2013;11.
- 438 11. Girard A, Mirbeau S, Gence L, et al. Effect of Washes and Centrifugation on the
439 Efficacy of Lipofilling With or Without Local Anesthetic. *Plast Reconstr Surg Glob Open.*
440 2015;3(8):e496
- 441 12. Ansorge H, Garza J, McCormack M, et al. Autologous Fat Processing Via the Revolve
442 System: Quality and Quantity of Fat Retention Evaluated in an Animal Model. *Aesthet Surg J.*
443 2014;34(3):438-447.
- 444 13. Ferraro G, De Francesco F, Tirino V, et al. Effects of a new centrifugation method on
445 adipose cell viability for autologous fat grafting. *Aesthet Plast Surg.* 2011;35(3):341-348.
- 446 14. Minn K, Min K, Chang H, Kim S, Heo E. Effects of fat preparation methods on the
447 viabilities of autologous fat grafts. *Aesthet Plast Surg.* 2010;34(5):626-631.
- 448 15. Cheriyan T, Kao H, Qiao X, Guo L. Low Harvest Pressure Enhances Autologous Fat
449 Graft Viability. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(6):1365-1368.
- 450 16. Shiffman MA, Mirrafati S. Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer
451 methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg.* 2001;27(9):819-
452 826.
- 453 17. Wang W, Fang X, Williams S, Stephenson L, Baynosa R, Khiabani K, Zamboni W.
454 Lidocaine-Induced ASC Apoptosis (Tumescent vs. Local Anesthesia). *Aesthet Plast Surg.*
455 2014;38(5):1017-23.
- 456 18. Lee J, Kirkham J, McCormack M, Nicholls A, Randolph M, Austen W. The effect of
457 pressure and shear on autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(5):1125-1136.

- 458 19. Li K, Gao J, Zhang Z, et al. Selection of donor site for fat grafting and cell isolation.
459 *Aesthet Plast Surg.* 2013;37(1):153-158.
- 460 20. Keck M, Kober J, Riedl O, et al. Power assisted liposuction to obtain adipose-derived
461 stem cells: impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual
462 aspiration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014;67(1):8.
- 463 21. Fisher C, Grahovac T, Schafer M, Shippert R, Marra K, Rubin J. Comparison of
464 harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast*
465 *Reconstr Surg.* 2013;132(2):351-361.
- 466 22. Salinas H, Broelsch G, Fernandes J, et al. Comparative Analysis of Processing
467 Methods in Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2014:1.
- 468 23. Peltoniemi H, Salmi A, Miettinen S, et al. Stem cell enrichment does not warrant a
469 higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast*
470 *Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(11):1494-1503.
- 471 24. Ueberreiter K, von Finckenstein JG, Cromme F, Herold C, Tanzella U, Vogt P.
472 [BEAULI™--a new and easy method for large-volume fat grafts]. *Handchir. Mikrochir.*
473 *Plast. Chir.* 2010;42(6):379-385.
- 474 25. Dos-Anjos Vilaboa S, Llull R, Mendel T. Returning fat grafts to physiologic
475 conditions using washing. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(2):323-326.
- 476 26. Moore J, Kolaczynski J, Morales L, et al. Viability of fat obtained by syringe suction
477 lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthet Plast Surg.* 1995;19(4):335-339.
- 478 27. Nelissen X, Lhoest F, Preud'Homme L. Refined Method of Lipofilling following
479 DIEP Breast Reconstruction: 3D Analysis of Graft Survival. *Plast Reconstr Surg Glob Open.*
480 2015;3(9).
- 481
- 482

F. Discussion sur les différents procédés

Cette étude s'inscrit donc dans un contexte actuel où les résultats cliniques du lipotransfert se heurtent à la principale limite de résorption du greffon.

Comme démontré dans cette étude, la technique qui permet le prélèvement et la purification de la graisse influence la résorption.

En plus des 4 techniques décrites dans cet article (BodyJet, Microfill, Macrofill et PAL+PureGraft), nous avons aussi comparé dans nos modèles la technique de référence qui est la technique Coleman dont les résultats sont les suivants.

Etude sur le modèle *in vitro* de culture du tissu adipeux

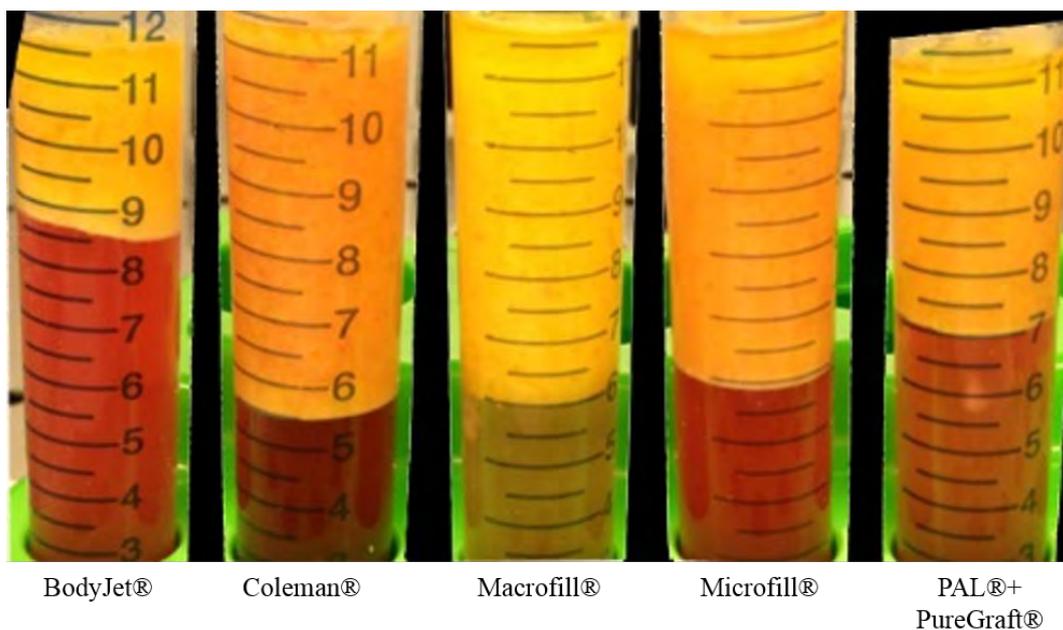


Figure 9: Aspect de la graisse après culture dans du milieu pendant 48h

La figure 9 représente l'aspect de la graisse après 2 jours de culture dans du milieu de culture et dans un incubateur à 37°C, 21% oxygène et en atmosphère humide. La partie supérieure jaune représente la phase adipeuse et la partie inférieure rosée représente le milieu de culture. Pour toutes les conditions il n'y a quasiment pas de surnageant huileux au-dessus de la phase adipeuse. Toutefois l'on observe que le plus grand ratio phase adipeuse/phase aqueuse est présent dans les conditions de graisse centrifugée (Coleman, Macrofill et Microfill). Une

partie de la phase aqueuse provient du milieu de culture (même quantité pour toutes les conditions) et l'autre partie provient du liquide d'infiltration utilisé lors de la lipoaspiration. La phase de purification des protocoles BodyJet et PAL+PureGraft enlève vraisemblablement moins de liquide d'infiltration que les protocoles de centrifugations.

Résorption de la graisse à 48h dans le modèle de culture *in vitro* :

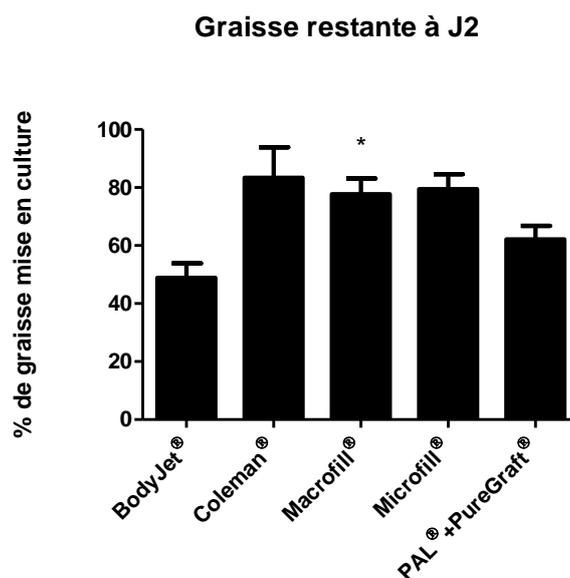


Figure 10 : Volume de tissu restant après 48h de culture (* $p < 0,05$ comparé à BodyJet)

Le calcul des proportions de graisse restante après ces 2 jours de culture confirme les observations visuelles. Ainsi, la résorption du volume graisseux est plus faible pour les protocoles Coleman, Macrofill et Microfill avec une différence significative pour le protocole Macrofill vis-à-vis du protocole BodyJet.

Formation d'huile à 48h dans le modèle de culture *in vitro* :

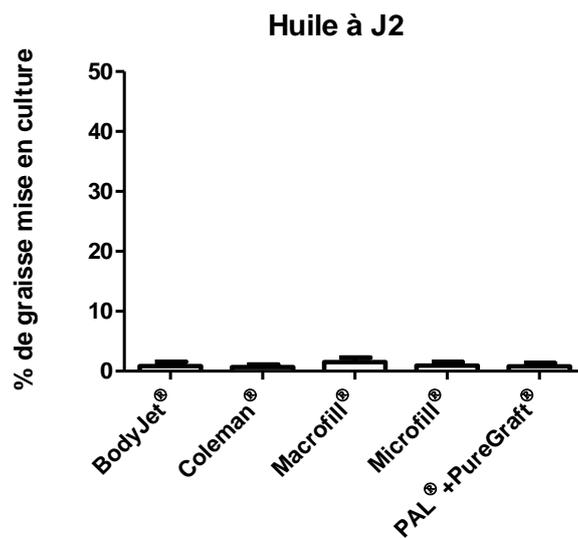


Figure 11: Formation d'huile après 48h de culture

Le calcul de la proportion d'huile confirme lui aussi l'observation visuelle avec une très faible proportion d'huile formée pour tous les protocoles.

Sécrétion de cytokines IL6 et MCP1 par le tissu adipeux en culture pendant 48h :

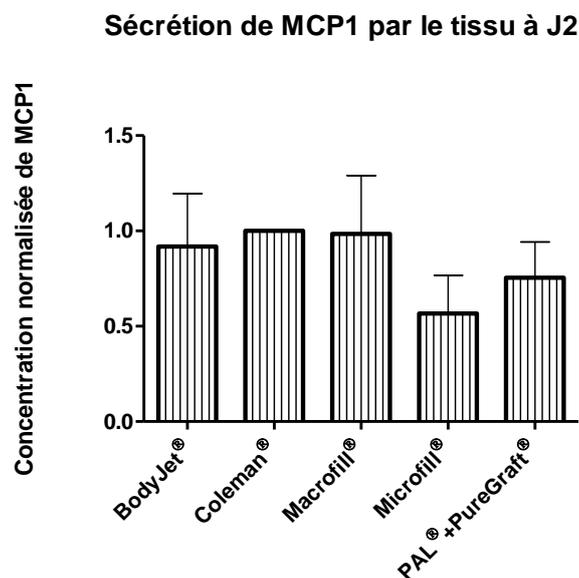


Figure 12: Sécrétion de MCP1 par le tissu en culture pendant 48h

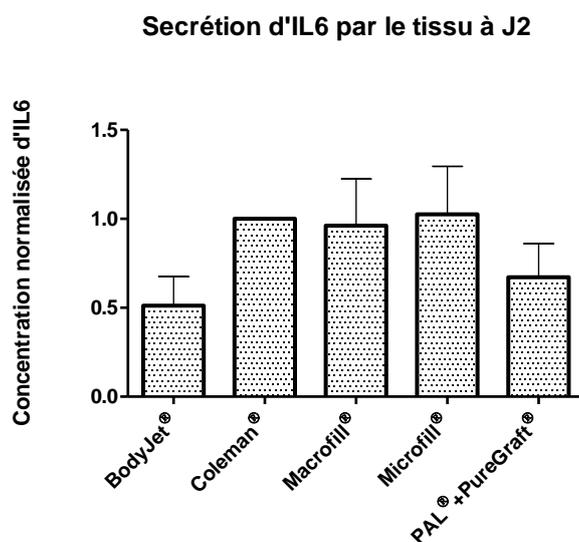


Figure 13: Sécrétion d'IL6 par le tissu en culture pendant 48h

Le sous-nageant aqueux de la graisse mise en culture a été prélevé pour doser la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires MCP1 et IL-6. Aucune différence significative n'est observable dans toutes les conditions testées même si les méthodes de prélèvement manuel/centrifugation(s) semblent stimuler la sécrétion d'IL6.

Ces deux cytokines sont classiquement décrites comme sécrétées par le tissu adipeux dans des situations de stress tissulaire ou encore dans des cas pathologiques comme lors d'obésité.

De plus, dans cette étape de comparaison *in vitro*, des analyses complémentaires ont été effectuées sur les lipoaspirats obtenus sur les premières patientes de l'étude. En effet, sur 3 patientes, la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux a été isolée par digestion du tissu à la collagénase. A la suite de cette isolation, la quantité de cellules et leur phénotype a été observé.

Concernant la cellularité de la FSV, aucune différence n'a été observée selon les 5 techniques de prélèvement/purification du tissu.

Concernant le phénotype de ces cellules, une analyse par cytométrie a été réalisée sur les marqueurs endothéliaux C31 et CD34, le marqueur hématopoïétique C45 et les marqueurs mésenchymateux C73, C90 et C105. Une très grande disparité inter-individuelle a été mise en évidence.

Pour ces deux paramètres, les fortes différences inter-individuelles, l'absence de significativité et la nécessité d'effectuer des prélèvements de tissu plus conséquent qui augmentent le temps opératoire ont conduit à l'abandon de ces analyses pour notre étude qui cherchait avant tout à répondre au questionnement clinique concernant la resorption du greffon.

Pour finir, une partie des cellules de la FSV isolée des différents prélèvements précédemment cités a été mise en culture pour sélectionner par adhésion au plastique de culture les Cellules Stromales Adipeuses (CSA). Les cellules adhérentes ont été dénombrées et amplifiées afin d'observer leur viabilité sur une courte période à partir de leur deuxième passage.

Ici encore aucune différence n'a été visible concernant la quantité et la viabilité de ces cellules adhérentes.

Il serait toutefois intéressant d'observer si la technique de prélèvement va influencer le potentiel de différenciation adipogénique de ces CSA. Ce paramètre impacterait la capacité des cellules implantées à permettre le renouvellement des cellules adipocytaires lors de leur mort.

Etude sur le modèle *in vivo* d'injection du tissu adipeux

Volume de graisse restant après 1 mois d'implantation :

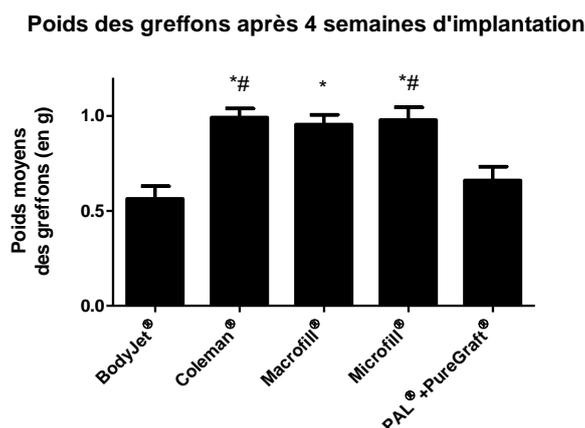


Figure 14: Poids des greffons après 1 mois d'implantation en sous-cutanée de souris SCID (* $p < 0,01$ comparé à BodyJet; # $p < 0,01$ comparé à PAL+PureGraft)

Les lipoaspirats traités selon les 5 protocoles ont été injectés en sous-cutanée de souris immunotolérantes. Un mois après injection, les greffons de graisse sont récupérés pour analyse volumétrique et histologique.

L'analyse du volume des greffons de graisse, confirme nos résultats obtenus dans le modèle de culture du tissu adipeux. En effet, les protocoles Coleman, Macrofill et Microfill résultent en une résorption moindre du greffon à 4 semaines.

Scoring histologique de la graisse après 1 mois d'implantation :

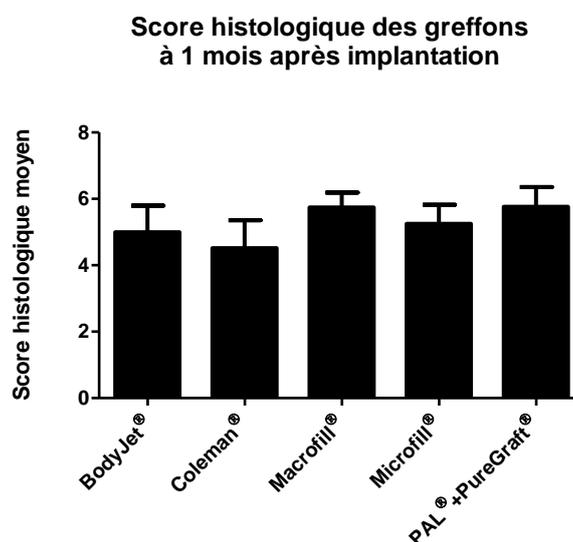


Figure 15: Score histologique des greffons après 1 mois d'implantation en sous-cutanée de souris SCID

L'analyse histologique des greffons par coloration HPS et scoring ne montre aucune différence d'aspect significative selon la technique utilisée (Figure 15).

Ces analyses à 4 semaines après injection des greffons montrent des différences significatives concernant le maintien du tissu injecté selon les différentes techniques de prélèvement/purification étudiées. C'est le temps de 4 semaines d'implantation qui a été retenu car il avait déjà été possible d'observer des effets significatifs du protocole de traitement à ce temps là (Girard et al. PRSGO 2015).

Nous avons dans un premier temps prévu un suivi longitudinal *in vivo* des animaux à différents temps après l'injection et envisagé de garder les animaux plus longtemps. Ce protocole nous aurait permis d'obtenir un plus grand nombre de points expérimentaux tout en réduisant le nombre d'animaux afin de respecter la règle des 3R d'éthique animale (réduire, raffiner, remplacer).

Toutefois, les techniques d'imagerie *in vivo* utilisées dans des expérimentations préliminaires à l'école vétérinaire (IRM, microscanner et échographie), n'étaient pas d'une résolution suffisante pour observer les greffons dans notre modèle. Malgré de très bons résultats *ex-vivo* avec l'IRM de l'école vétérinaire de Nantes, l'antenne utilisée était prévue pour imager des chiens ne permettait pas de discerner de faibles variations de volume dans nos greffons de seulement 1cc.

La taille des lobules graisseux aspirés varie selon le type de canule utilisée. Au sein de notre étude le tableau suivant résume les différentes canules utilisées.

Protocole d'aspiration	Diamètre interne	Nombre de trous	Taille des trous	Aire des trous
BodyJet®	3mm	4	8mm sur 1,5mm	~ 12mm ²
Coleman®	3mm	2	4mm sur 1,8mm	~ 7,2mm ²
Macrofill®	3mm	20	2,5mm de diamètre	~ 4,9mm ²
Microfill®	1,7mm	8	1,2mm de diamètre	~ 1,1mm ²
PAL®	3mm	22	1,8mm de diamètre	~ 2,5mm ²

Tableau 2: Paramètre des canules d'aspirations utilisées dans l'étude de comparaison des procédés de lipotransfert

Les caractéristiques des canules varient énormément et vont impacter la taille des lobules adipeux prélevés lors de la lipoaspiration.

Toutefois, à la vue des résultats et du tableau précédent, aucun facteur prédictif ne semble se dégagé entre les paramètres de la canule d'aspiration et les résultats sur le maintien de la graisse.

La figure suivante illustre les canules d'aspiration des 5 techniques de lipotransfert comparées dans notre étude.

BodyJet®



Coleman®



Macrofill®



Microfill®



PAL®



Figure 16: Différentes canules d'aspirations utilisées lors de l'étude de comparaison

En addition des résultats présentés dans l'article, nous observons dans notre étude que les résultats obtenus avec Coleman[®], Macrofill[®] et Microfill[®] sont quasi-équivalents dans nos 2 modèles d'études. Ces 3 techniques utilisent le principe de l'aspiration manuelle et de la centrifugation, suggérant ici encore une supériorité de ces procédés.

La technique dite de Coleman[®], est certes très répandue en clinique mais ne possède pas de protocole détaillé à la lettre, pouvant ainsi combiner différentes centrifugeuses (et donc des centrifugations de force différentes), différentes canules (et donc des lobules de taille variable). Pour comparer les kits commerciaux avec des protocoles validés et donc comparables à la littérature nous avons choisi de ne pas intégrer la technique Coleman[®] à l'article, nos résultats n'étant pas forcément représentatifs de la façon de faire d'autres équipes (canule différente, centrifugation de 4min ou dans une autre centrifugeuse, contact avec l'air lors du traitement, non-respect des 2cc de dépression). En effet, la valeur de la dépression influe sur la mort des adipocytes. Ainsi une dépression supérieure à 700mmHg ne devrait pas être utilisée dans le cadre des lipotransferts sous peine de réduire fortement la viabilité du greffon (Shiffman and Mirrafati 2001, Cheriyan, Kao et al. 2014).

Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus qui avaient mis en évidence l'importance des faibles centrifugations et du lavage du tissu (Hoareau, Bencharif et al. 2013, Girard, Mirbeau et al. 2015). En addition, notre étude permet de replacer ces résultats dans le contexte clinique actuel qui voit la multiplication des techniques proposées aux chirurgiens.

Ainsi, notre étude met en avant une influence des différents protocoles utilisés pour le lipotransfert. En effet, dans deux modèles différents les protocoles comparés donnent de bons résultats d'un point de vue histologique (faible formation d'huile et de tissu fibreux). Toutefois des différences significatives sont observables lorsqu'il est question de résorption du greffon de graisse avec dans notre étude une supériorité des techniques Coleman[®], Macrofill[®] et Microfill[®].

Toutefois, il est important de noter que les bons résultats obtenus ne sont valables que si plusieurs points critiques sont bien respectés :

- Respect d'une dépression faible dans la seringue (contrôlée pour Macrofill[®], et respectée à 2cc pour les autres).
- Utilisation d'une canule d'aspiration à trous de petite taille (<3mm).
- Centrifugation en circuit fermé et en contact limité avec l'air.

Ces points sont ceux discutés dans la revue (Hivernaud, Lefourn et al. 2015) et avec cette étude, nous souhaitons confirmer que le respect de ces points critiques permet l'obtention de meilleurs résultats à long terme.

Une étude clinique sur des reconstructions mammaires chez 23 patientes utilisant un lambeau abdominal (DIEP : deep inferior epigastric perforator) couplé à un lipotransfer avec le protocole Macrofill[®] vient d'être publiée (Nelissen, Lhoest et al. 2015). Les résultats sont de 70,9% de survie du greffon après 4 mois. Ces bons résultats dans un contexte clinique de zone irradiée confirment ceux de notre étude.

G. L'enrichissement du greffon

Parallèlement à la diversification des procédés de lipotransfert, un nouveau concept a vu le jour qui vise à enrichir le greffon adipeux avec des facteurs de croissance dans le but d'améliorer le maintien de celui-ci et ainsi les résultats cliniques.

1) Avec le Plasma Riche en Plaquettes

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est un terme qui regroupe divers dérivés sanguins utilisés dans un premier temps en implantologie. La centrifugation d'un prélèvement sanguin (prélevé avec et/ou sans anticoagulant selon le résultat voulu), permet d'enrichir le plasma en plaquettes et/ou en facteurs coagulants. Cette préparation peut ensuite être utilisée pour obtenir un gel biologique résorbable.

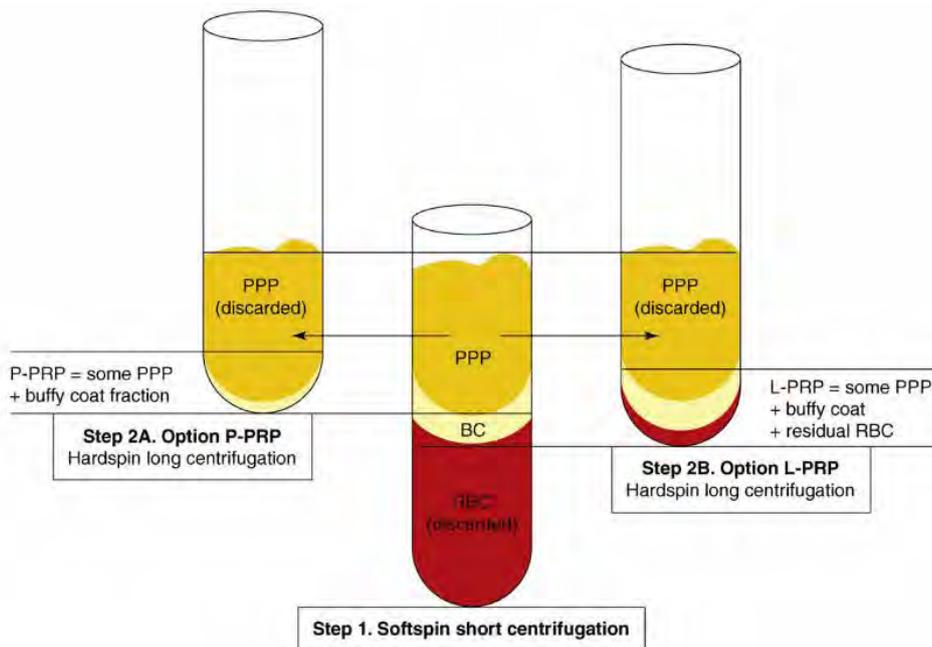


Figure 17 Etapes de préparation des "Plasma Riche en Plaquettes"
(Dohan Ehrenfest et al. Trends Biotech 2009)

La figure 16 explique les étapes permettant d'obtenir deux différents types de PRP avec ou sans fraction leucocytaire (Dohan Ehrenfest, Rasmusson et al. 2009). La première étape de centrifugation permet, à partir d'un prélèvement sanguin, de séparer les hématies du plasma. Une deuxième centrifugation plus longue est effectuée avec ou sans leucocytes. Durant cette centrifugation, les plaquettes sédimentent au fond du tube. En retirant la phase supérieure du plasma (plasma pauvre en plaquettes – PPP) l'expérimentateur obtient un plasma riche en plaquette : PRP, avec (L-PRP) ou sans leucocytes (P-PRP).

Ce n'est qu'un exemple des nombreux kits utilisés en clinique et qui permettent une préparation de type PRP. Les protocoles dont le point commun est l'utilisation de centrifugation pour concentrer les plaquettes dans le plasma diffèrent selon les fabricants et permettent d'obtenir des préparations aux qualités biologiques et rhéologiques différentes.

Le « PRP » est un terme qui comprend différentes préparations plasmatiques toutes enrichies en plaquettes. Ces préparations sont actuellement utilisées en clinique humaine, notamment en implantologie, en orthopédie, en chirurgie maxillo-faciale et en chirurgie plastique.

En 2009, Dohan Ehrenfest et son équipe ont proposés une classification de ces dérivés plaquettaires (Dohan Ehrenfest, Rasmusson et al. 2009) qui se base sur 3 composants clés : les plaquettes, les leucocytes et la fibrine.

Cette classification différencie 4 types de préparations qui sont listées dans le tableau suivant. Les PRP étant les plasmas riches en plaquettes et les PRF étant les fibrines riches en plaquettes (Dohan Ehrenfest, Andia et al. 2014).

	Plaquettes	Leucocytes	Fibrine
<i>P-PRP (Pure PRP)</i>	++	-	-
<i>L-PRP (Leucocytes PRP)</i>	++	+	-
<i>P-PRF (Pure PRF)</i>	+	-	++
<i>L-PRF (Leucocytes PRF)</i>	+	+	++

*Tableau 3 : Différent types de concentrés plaquettaires
(d'après Dohan Ehrenfest et al. Muscles Tendons Ligaments 2014)*

Le choix du concentré plaquettaire peut se faire selon l'effet recherché. En effet, les PRP peuvent se présenter sous forme liquide pour être injectés en intramusculaire ou intra-articulaire chez les sportifs professionnels par exemple. Les PRF plus souvent utilisés en

implantologie, sont des gels solides non injectables qui servent de "colle biologique" pour les biomatériaux ou les greffes osseuses.

En chirurgie plastique, le lipotransfert peut dans certains protocoles, être enrichi avec du PRP autologue liquide. Le rationnel de ce mélange découle du rôle des plaquettes dans les processus cicatriciels.

En effet, les plaquettes, aussi nommées thrombocytes, sont produites dans la moelle osseuse et représentent les produits finaux anucléés des mégacaryocytes. Après libération dans la circulation sanguine, la durée de vie des plaquettes varie entre 5 et 10 jours. Lors de dégâts au niveau des vaisseaux sanguins, les plaquettes vont s'agréger pour participer à la formation du caillot sanguin. Durant ce processus nommé "activation", les plaquettes subissent un phénomène de dégranulation des granules alphas qu'elles contiennent. En fusionnant avec la membrane cellulaire, les granules alphas relâchent dans le milieu extracellulaire les molécules qu'elles contiennent. Ce phénomène a lieu dans l'heure qui suit l'activation des plaquettes.

Parmi les molécules ainsi sécrétées, de nombreux facteurs de croissances ont été décrits. Le PDGF (platelet derived growth factor) le TGF β 1/2 (transforming growth factor beta 1 et 2), et le VEGF (vascular endothelial growth factor) sont les plus connus. Le tableau 3 liste de manière non-exhaustive les facteurs de croissance le plus souvent retrouvés dans la littérature (Dhillon, Schwarz et al. 2012). De plus, l'effet pro-angiogénique du PRP a été démontré *in vivo* (Kakudo, Morimoto et al. 2015).

Facteur de croissance	Fonction
<i>Transforming Growth Factor β (TGF-β)</i>	Stimule la prolifération des CSM Régule la mitose des cellules endothéliales, fibroblastes et ostéoblastes Régule la synthèse de collagène et la sécrétion de collagénase Régule les effets mitogéniques des autres facteurs de croissance Stimule le chimiotactisme endothélial et l'angiogenèse Inhibe la prolifération des macrophages et des lymphocytes
<i>Fibroblast Growth Factor (FGF)</i>	Promeut la croissance et la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes Stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses
<i>Platelet-Derived Growth Factor a and b (PDGF)</i>	Stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses Stimule le chimiotactisme et la mitose des fibroblastes, cellules gliales ou des muscles mous Régule la synthèse de collagène et la sécrétion de collagénase Stimule le chimiotactisme des macrophages et des cellules neutrophiles
<i>Epidermal Growth Factor (EGF)</i>	Stimule le chimiotactisme endothélial et l'angiogenèse Régule la sécrétion de collagénase Stimule la mitose des cellules mésenchymateuses et épithéliales
<i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i>	Augmente l'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux Stimule la mitose des cellules endothéliales
<i>Connective Tissue Growth Factor (CTGF)</i>	Promeut l'angiogenèse Promeut la régénération cartilagineuse Promeut l'adhésion des plaquettes et la fibrose
<i>Insuline Like Growth Factor (ILGF 1 et 2)</i>	Chemottractant pour les fibroblastes et stimule la synthèse protéique Améliore la formation osseuse

<i>Platelet Factor 4 (PF-4)</i>	Stimule l'infiltration initiale des neutrophiles lors de blessures Chemoattractant pour les fibroblastes
<i>Interleukin 8 (IL-8)</i>	Méiateur pro-inflammatoire Recrutement de cellules inflammatoires
<i>Keratinocyte Growth Factor (KGF)</i>	Promeut la croissance, la migration, l'adhésion et la survie des cellules endothéliales Pro-angiogénique

Tableau 4: Facteurs de croissances sécrétés par le PRP et leurs fonctions principales (d'après Dhillon et al. Arthritis Research & Therapy 2012)

Le concept du lipotransfert supplémenté de PRP repose donc sur l'action de ses facteurs de croissance pour augmenter la revascularisation du greffon et la survie des cellules de celui-ci. L'exemple le plus probant étant la stimulation de la prolifération des cellules stromales mésenchymateuses (MSC), très intéressante dans le cadre d'ingénierie tissulaire impliquant ces cellules.

Malheureusement à l'heure actuelle il existe de nombreux kits de préparation de PRP donnant lieu à de grandes différences sur les PRP en termes de concentration plaquettaire et de concentrations en facteurs de croissance (Kushida, Kakudo et al. 2014, Magalon, Bausset et al. 2014).

Ces différences sont très certainement responsables des résultats contradictoires trouvés dans la littérature actuelle.

En effet, en 2011, une étude publiée dans *Plastic and Reconstructive Surgery* ne montre aucun bénéfice à l'ajout de PRP à un protocole Coleman (Salgarello, Visconti et al. 2011). L'année suivante, un article publié dans *Stem Cells Translational Medicine* (Gentile, Orlandi et al. 2012) conclut sur une diminution de la résorption de 30% avec le PRP ajouté à la même technique Coleman.

Une analyse plus détaillée des différentes études qui ont eu lieu sur "PRP" et "Fat Grafting" permet est détaillée dans le tableau suivant.

(Por, Yeow et al. 2008, Cervelli, Gentile et al. 2009, Cervelli, Palla et al. 2009, Fraga, Nishio et al. 2010, Nakamura, Ishihara et al. 2010, Rodríguez-Flores, Palomar-Gallego et al. 2010, Cervelli, Gentile et al. 2011, Dong, Cheon et al. 2011, Cervelli, Nicoli et al. 2012, Gentile, Orlandi et al. 2012, Cervelli, Bocchini et al. 2013, Gentile, Di Pasquali et al. 2013, Keyhan, Hemmat et al. 2013, Gentile, De Angelis et al. 2014, Serratrice, Bruzzese et al. 2014, Willemsen, van der Lei et al. 2014, Li, Guo et al. 2015, Sasaki 2015, Seyhan, Alhan et al. 2015).

Auteur, année	Zones ou Contexte	Patients	Suivi	Protocole	Résultats
<i>études pré-cliniques</i>					
Por 2009	Sous-cutanée de souris nude	12	4 mois	0,25mL de PRP/mL de graisse (vs ajout solution saline)	Pas de différence significative sur le maintien de la graisse dans les 2 conditions
Nakamura 2010	Sous-cutanée de rat	-	4 mois	-	Meilleur maintien avec PRP
Pires Fraga 2010	Oreille de lapin	30	6 mois	1,25mL de PRP/g de graisse (vs ajout solution saline)	Meilleur maintien avec PRL, plus d'adipocytes viables et moins de fibrose
Oh 2011	Sous-cutanée de souris nude	20	2,5 mois	0,3mL de PRP/mL de graisse (vs ajout solution saline)	Meilleur maintien avec PRL que sans PRP
Rodriguez-Flores 2011	Lèvre supérieure du lapin	9	3 mois	1mL de PRP/mL de graisse (vs graisse seule)	Moins d'inflammation et de kystes huileux si l'on ajoute le PRP.
Serratrice 2014	Modèle de sclérodemie souris	72	2 mois	1mL de PRP/mL de graisse 0,02mL de FSV/mL de graisse	PRL, et CAL réduisent la sclérose dermale et épidermale PRP et FSV seule ne réduisent que la sclérose dermale
Seyhan 2015	Sous-cutanée de rat	40	3 mois	0,2mL de PRP/mL de graisse (vs milieu de culture) 5 millions de CSA avec ou sans 0,2mL de PRP	Meilleur maintien et formation de vaisseaux si CSA+PRP

L'enrichissement du greffon

Li 2015	Sous-cutanée de souris nude	12	3 mois	Graisse + 0,5 millions de CSA + 10/20 ou 30% de PRP	Meilleur maintien si 20 ou 30% de PRP
<i>études cliniques</i>					
Cervelli 2009	Multiples	43	12 mois	0,5mL de PRP/mL de graisse	70% de maintenance avec PRL 31% de maintenance avec Coleman
Cervelli 2009	Rajeunissement facial	15	18 mois	0,3-0,5mL de PRP/mL de graisse	Bons résultats
Cervelli 2011	Cicatrices traumatiques	60	6 mois	0,2-0,3mL de PRP/mL de graisse Avec ou sans laser	Scoring de guérison La combinaison PRL+laser est supérieur à PRL seul ou laser seul
Cervelli 2011	Ulcères des membres inférieurs	20	2,5 mois	CAL vs PRL vs Acide hyaluronique vs PRP	Réépithélisation 97,9% avec CAL 97,8% avec PRL 89,1% avec PRP 87,8% avec Acide hyaluronique
Gentile 2012	Reconstruction mammaire	23	1 an	0,5mL de PRP/mL de graisse	63% avec CAL 39% graisse centrifugée 69% avec PRL
Keyhan 2012	Face	25	1 an	Graisse additionnée de PRP ou de PRF	82% de maintien avec PRP 87% de maintien avec PRF
Gentile 2013	Mammaire	50	12 mois	-	69% avec PRL 39% avec Coleman

L'enrichissement du greffon

Cervelli 2013	Multiples	223	18 mois	0,2/0,3/0,4/0,5mL de PRP/mL de graisse	Effet dose réponse du PRP 65% avec PRL 0,4/0,5 60% avec PRL 0,3 38% avec PRL 0,2 26% avec Coleman
Gentile 2014	Cicatrices de la face	20	12 mois	-	63% avec CAL 39% graisse centrifugée 69% avec PRL
Willemsen 2014	Rajeunissement facial	37	2 mois	0,1mL de PRP/mL de graisse	Amélioration de l'aspect esthétique et diminution du temps de rétablissement si PRL
Sasaki 2015	Face	236	12 mois	- (FSV) 0,2mL de PRP/mL de graisse	Augmentation de la maintenance du greffon avec l'ajout de PRP, de FSV ou des deux

Tableau 5: Différentes études sur le Platelet Rich Lipotransfer

En conclusion, l'ajout de PRP au greffon de graisse semble avoir un effet positif sur le maintien du greffon et la vascularisation de celui-ci. La concentration minimale de PRP nécessaire serait de 0,2mL de PRP par cc de graisse avec un effet dose réponse si l'on augmente cette concentration. De plus cette technique d'ajout de PRP qui peut aussi s'appeler PRL pour Platelet Rich Lipotransfer semble avoir des effets bénéfiques dans les traitements des zones cicatricielles ou pathologiques comme les ulcères ou encore la sclérodermie.

2) Avec la Fraction Stromale Vasculaire

En 2006, des chirurgiens japonais de l'université de Tokyo publiaient pour la première fois le concept de Cell Assisted Lipotransfer (CAL) (Matsumoto, Sato et al. 2006). Le principe découle des études de l'époque sur la fraction non adipocytaire du tissu adipeux : la fraction stromale vasculaire.

Comme expliqué plus loin, la fraction stromale vasculaire contient non seulement des cellules souches et des progéniteurs à la fois adipocytaires et vasculaires mais aussi une forte concentration en facteurs pro-angiogéniques.

Le protocole de CAL propose donc dans le même temps opératoire que le lipotransfert de se servir d'une moitié du tissu prélevé pour isoler la FSV (par digestion enzymatique par exemple). Les cellules ainsi récupérées sous forme de culot cellulaire sont ensuite mélangées avec la deuxième moitié du prélèvement pour obtenir un greffon adipeux enrichi en cellules stromales progénitrices (très souvent nommées ADRC pour adipose-derived regenerative cells dans la littérature et qui correspondent en fait à la fraction stromale vasculaire). Le but théorique de cette stratégie est d'améliorer la vitesse de vascularisation du greffon mais également d'avoir un plus grand nombre de cellules souches capables de se différencier pour remplacer plus rapidement les adipocytes qui meurent suite à la greffe.

A l'heure actuelle l'utilisation du CAL fait débat pour deux principales raisons :

- La première de ces raisons est la nécessité d'utiliser au moins la moitié du lipoaspirat pour isoler les cellules de la FSV ce qui réduit la quantité de tissu transférable chez certains patients et augmente le temps opératoire nécessaire par rapport au lipotransfert plus conventionnel.
- La deuxième raison, plus régulièrement évoquée est le risque potentiel lié à une augmentation de la concentration en cellules stromales et de facteurs de croissance qu'elles secrètent. En effet une concentration supra-physiologique de ces cellules et molécules à fort

potentiel mitogénique pose la question d'un possible effet pro-tumoral de cette technique notamment lors de lipotransfert mammaires.

Ce cout à la fois financier, en temps opératoire et en risque potentiel est loin de faire l'unanimité d'autant plus que certaines études remettent en cause ses effets bénéfiques comparés à un lipotransfert conventionnel.

Le tableau suivant récapitule les études humaines qui ont eu lieu sur l'utilisation des greffons de graisse enrichis. Les études ont tout d'abord portées sur l'enrichissement en cellules de la FSV (généralement deux fois la dose physiologique puisque la moitié du greffon est utilisée pour l'isolation), puis plus récemment à l'aide de concentrations bien plus importantes de cellules stromales adipeuses amplifiées en culture (Yoshimura, Sato et al. 2007, Yoshimura, Sato et al. 2008, Calabrese, Orzalesi et al. 2009, Cervelli, Gentile et al. 2010, Yoshimura, Asano et al. 2010, Kamakura and Ito 2011, Sterodimas, de Faria et al. 2011, Tiryaki, Findikli et al. 2011, Castro-Govea, Garza-Pineda et al. 2012, Gentile, Orlandi et al. 2012, Pérez-Cano, Vranckx et al. 2012, Bulgin, Vrabic et al. 2013, Kølle, Fischer-Nielsen et al. 2013, Mailey, Saba et al. 2013, Peltoniemi, Salmi et al. 2013, Tanikawa, Aguenta et al. 2013, Anjos, Matas-Palau et al. 2015, Aronowitz, Lockhart et al. 2015, Domenis, Lazzaro et al. 2015, Gentile, Scioli et al. 2015, Jung, Kim et al. 2015, Wang, Luo et al. 2015).

Auteur/Année	Adjuvant	Concentration adjuvant	Site	Patients	Suivi	Résultats
Yoshimura, 2008	FSV (mixée ou injectée après)	x2	Augmentation mammaire	40	~6 mois	Augmentation du tour de poitrine de 4 à 8cm
Yoshimura, 2008	FSV (mixée)	x2	Lipoatrophie faciale	6	9 mois	Résultats cliniques bons et non significatifs par rapport à la technique standard (Coleman)
Calabrese, 2009	FSV (mixée)	x2	Reconstruction mammaire	1	17 mois	Couplé à un implant. Excellente satisfaction du patient
Yoshimura, 2010	FSV (mixée)	x2	Remplacement implants mammaires	15	~12 mois	Maintien de 40 à 80% du volume injecté.
Sterodimas, 2011	FSV	x2	Face	20	18 mois	Besoin d'une seule séance avec CAL pour tous les patients contre 2 séances pour certains patients du groupe standard. Pas de différence de satisfaction à 18 mois,
Tiryaki, 2011	FSV (injectée après) Si moins de 100cc, séparation des hématies par MACS	x2	Plusieurs sites récepteurs en conditions sous-optimales	29	12 mois	Bons résultats chez des patients où la méthode standard n'avait pas été suffisante. Effet possible sur l'aspect de la peau.
Kamakura, 2011	FSV (mixée)	x2	Augmentation mammaire	20	9 mois	Augmentation du tour de poitrine de 3,3cm en moyenne. 75% de satisfaction bonne ou excellente chez les patientes

L'enrichissement du greffon

Cervelli, 2011	FSV (mixée) ou PRP (mixé)	x2 pour FSV 0,3-0,5cc de PRP pour 1cc de graisse	Ulcères post- traumatiques des extrémités inférieures	20	10 semaines	Re-épithélisation: 97,9% pour Graisse+FSV 87,8% pour Acide hyaluronique 97,8% pour Graisse+PRP 89,1% pour PRP seul
Castro-Govea, 2012	FSV (mixée)	x2	Syndrome Parry- Romberg (face)	1	12 mois	Bons résultats à 1 an même au niveau du pli nasio-labial et des lèvres. Effet possible sur l'aspect de la peau
Pérez-Cano, 2012	FSV (mixée)	x2	Reconstruction mammaire (BCT)	67	12 mois	Scoring post-irradiation, meilleur à 12 mois pour 29 patientes (34 sans changement, et 4 avec un score qui diminue). Satisfaction à 12 mois e 45 patientes
Gentile, 2012	FSV (mixée) ou PRP (mixé)	x2 pour FSV 0,4cc de PRP pour 1cc de graisse	Reconstruction mammaire	23	12 mois	63% de maintenance à 1 an pour graisse+FSV 69% de maintenance à 1 an pour graisse+PRP 39% de maintenance à 1 an pour méthode Coleman
Doi, 2013	FSV (mixée)	x2	Face et Seins	42	3-12 mois	Résultats cliniques globalements bons
Peltoniemi, 2013	FSV (mixée)	x2	Augmentation mammaire	18	6 mois	52% de maintenance à 6 mois pour WAL 50% de maintenance à 6 mois pour WAL+FSV
Bulgin, 2013	CSM-MO (repris dans plasma et mixé)	Equivalent de 70mL de moelle dans 185cc de graisse	Augmentation mammaire	1	14 mois	Augmentation du tour de poitrine de 5,5cm à 1 an.

L'enrichissement du greffon

Mailey, 2013	FSV	-	Plusieurs applications	36	10 mois	Pas de différence de satisfaction entre graisse+FSV et technique standard. Seuls les patients avec graisse+FSV notent une amélioration sur la pigmentation de la peau.
Kølle, 2013	CSA (mixés)	x2000 20 millions de cellules/mL (dans 30mL)	Bolus sur l'épaule	13	4 mois	80,9% de maintenance pour graisse+ASC 4,66% de maintenance pour graisse
Tanikawa, 2013	FSV (mixée)	x2	Microsomes cranio-faciales (face)	14	6 mois	88% de maintenance pour graisse+ASC 54% de maintenance pour graisse (Coleman)
Domenis, 2015	FSV (mixée)	FSV (mixée)	Reconstruction et syndrome mammaire	36	12 mois	La technique graisse+FSV améliore l'épaisseur sous-cutanée comparée à la technique de référence (Coleman). Légères différences selon le type d'isolation de la FSV (Cytori vs Lipokit vs Fastem).
Wang, 2015	FSV (mixée)	x2	Augmentation mammaire	12	6 mois	51,84% de resorption à 6 mois (contre 40 à 50% pour la technique standard). Ne semble pas améliorer le résultat en volume.
Jung, 2015	FSV (mixée)	x0,9	Augmentation mammaire	5	12 mois	47% de resorption à 1 an. Ne semble pas améliorer le résultat en volume.
Aronowitz, 2015	FSV (mixée)	-	Plusieurs applications	174	~20mois	Technique de risque équivalent à la technique standard.

L'enrichissement du greffon

Dos Anjos, 2015	FSV (mixée)	x1,1 (low) (moins de 50 000 cellules/cc) x2 (high) (plus de 200 000 cellules/cc)	Reconstruction et augmentation mammaire	74	18 mois	75% de maintenance avec la concentration la plus élevée de FSV 50% de maintenance avec la concentration la plus faible de FSV.
Sasaki, 2015	FSV (mixée) PRP (injectée après)	- (FSV) 0,2mL de PRP/mL de graisse	Face	236	12 mois	Augmentation de la maintenance du greffon avec l'ajout de PRP, de FSV ou des deux
Gentile, 2015	FSV (mixée)	-	Reconstruction mammaire	50	12 mois	39% de maintenance avec la technique Coleman 43% avec la technique graisse+FSV isolée par Mystem 52% avec la technique graisse+FSV isolée par Fastem 63% avec la technique graisse+FSV isolée par Celution

Tableau 6: Etudes cliniques sur l'enrichissement du greffon par des cellules stromales dans le cadre du lipotransfert

Les résultats de ces études sont contradictoires. Nombre d'entre elles portent sur l'augmentation et la reconstruction mammaire (procédures où la résorption du greffon est très importante du fait de l'utilisation de mégavolumes souvent supérieurs à 100cc).

La technique de purification de la graisse, comme nous l'avons montré dans notre étude, influence les résultats de l'opération au niveau du volume. Si l'on se concentre donc sur les études qui comparent le CAL à la technique standard utilisée par la même équipe, une tendance semble ressortir sur ces dernières années :

- Les équipes suivantes, Peltoniemi 2013, Mailey 2013 et Wang 2015, ont étudié la technique de CAL sur des augmentations mammaires ou sur différentes applications à la fois et ne semble obtenir aucun effet bénéfique significatif de l'enrichissement du greffon.
- Les équipes suivantes, Gentile 2012, Domenis 2015 et Gentile 2015, ont étudié la technique de CAL sur des reconstructions mammaires post-tumeurs et observent de meilleurs résultats en comparaison d'un lipotransfert « standard ».

Il est possible que la technique d'enrichissement du greffon trouve son intérêt seulement dans les cas où le site receveur est en conditions sous-optimales pour la greffe (tissu irradié, cicatriciel, à l'architecture vasculaire diminuée...).

Un effet sur la pigmentation de la peau a été soulevé par plusieurs études mais ce paramètre reste encore à mesurer de manière objective. Pour aller dans ce sens, la récente étude de (Luan, Duscher et al. 2015) démontre dans un modèle de scalp irradié l'effet du CAL non seulement sur le maintien et l'aspect du greffon de graisse mais aussi sur l'histologie de la peau irradiée sus-jacente.

D'autres études sont nécessaires pour avoir une vision plus claire sur la méthode, d'autant plus que différents procédés d'isolation de la FSV sont présents dans ces études cliniques et semblent influencer les résultats (Gentile, Scioli et al. 2015), et que la présence d'un effet dose-réponse (Anjos, Matas-Palau et al. 2015) va compliquer la mise au point d'un protocole où la balance résultats obtenus/quantité de graisse nécessaire sera acceptable.

3) Du lipotransfert à l'ingénierie tissulaire adipeuse

Une source cellulaire :

Comme nous pouvons l'observer dans le tableau 5, la FSV n'est plus la seule source cellulaire à l'étude pour l'enrichissement du greffon, les CSM isolées (de la moelle ou du tissu adipeux) et amplifiées sont aussi à l'étude. A l'heure actuelle, c'est la théorie de l'effet pro-angiogénique par une action paracrine qui prend le pas sur l'effet de différenciation des cellules souches (Philips, Grahovac et al. 2013, Garza, Rennert et al. 2015). Dans ce contexte des études sur des modèles animaux ont lieu avec des cellules stromales sur-exprimant le VEGF (Lu, Li et al. 2009), des cellules stromales couplés à du VEGF encapsulé (Li, Pan et al. 2014), ou encore l'isolation des cellules endothéliales de la FSV (Luo, Cao et al. 2015) le tout dans le but d'améliorer les résultats du lipotransfert.

Un microenvironnement :

Les études qui viennent d'être citées utilisent toutes comme base de leur technique le lipoaspirat entier (bien que traité selon différents protocoles). Toutefois depuis quelques temps, il est question de remplacer le greffon de graisse par un matériau commercialisable, prêt à l'emploi et mimant les caractéristiques du tissu adipeux natif : La Matrice Adipeuse Decellularisée (Acellular adipose matrix **AAM** en anglais).

Ce tissu adipeux allogénique sans cellules sert alors de biomatériau naturel à la formation d'un tissu adipeux. Différentes méthodes de préparation existent visant à éliminer les cellules du tissu adipeux prélevé (Sano, Orbay et al. 2013) mais le principe est le même que pour les allogreffes osseuses (voir plus loin). Ce tissu adipeux allogénique possède encore la matrice collagénique du tissu adipeux natif et ainsi des propriétés d'adipo-induction puisque de récentes études semblent montrer que des cellules stromales cultivées dans cette matrice vont se différencier en adipocytes en présence d'un milieu de prolifération sans signaux adipogéniques.

Cette matrice allogénique peut donc potentiellement être utilisée pour cultiver/injecter des cellules adipeuses et corriger des défauts de tissus mous (Wu, Nahas et al. 2012).

Cette nouvelle ère d'enrichissement cellulaire promet encore de nombreux changements sur l'utilisation et la vision du lipotransfert en clinique dans les années à venir.

PARTIE II :
La Fraction Stromale
Vasculaire
du tissu adipeux

PARTIE II : La Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux

Comme nous venons de le voir, le tissu adipeux est un tissu de comblement très utilisé à l'heure actuelle notamment en chirurgie plastique et reconstructrice. Les modalités de protocoles pour obtenir des résultats optimaux sont toutefois encore à l'étude.

Au-delà de cette application du tissu adipeux "total", ce tissu sous la loupe de nombreux chercheurs car il constitue à l'heure actuelle la plus grande source de cellules stromales mésenchymateuses adultes (CSM).

L'utilisation de dérivés du tissu adipeux (aussi bien les CSM que la FSV qui contient ces CSM) est donc à l'étude pour de nombreuses applications d'ingénierie tissulaire, dont l'ingénierie tissulaire osseuse.

Dans les chapitres suivants nous allons donc détailler les potentielles applications cliniques de cette Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux.

Puis la partie III résumera la deuxième partie de ce travail de thèse qui consistait à utiliser cette FSV combinée à des biomatériaux osseux dans la recherche d'une alternative intra-opératoire à la greffe osseuse en cas d'atteintes osseuses en zone maxillo-faciale.

A. La Fraction Stromale Vasculaire du Tissu Adipeux

1) Définition

Même si les adipocytes de par leur contenu en lipides représentent la majorité du volume du tissu adipeux, ce ne sont pas les seules cellules qui le composent. Les cellules non-adipocytaires composent la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux (FSV, ou SVF en anglais). Elle est isolable à partir d'une digestion du tissu adipeux par une ou plusieurs de ces enzymes : collagénase (les plus fréquemment utilisées), dispase, trypsine, ou bien par dissociation mécanique du lipoaspirat (Aronowitz, Lockhart et al. 2015). Le protocole de digestion enzymatique implique le plus souvent une phase de digestion de 1 heure à 37°C. Suite à cette digestion/dissociation, une centrifugation permet de différencier la phase adipocytaire contenant les adipocytes libérés de leur matrice, une phase liquide contenant une solution physiologique (selon le protocole de digestion) et un culot cellulaire avec les cellules de la FSV.

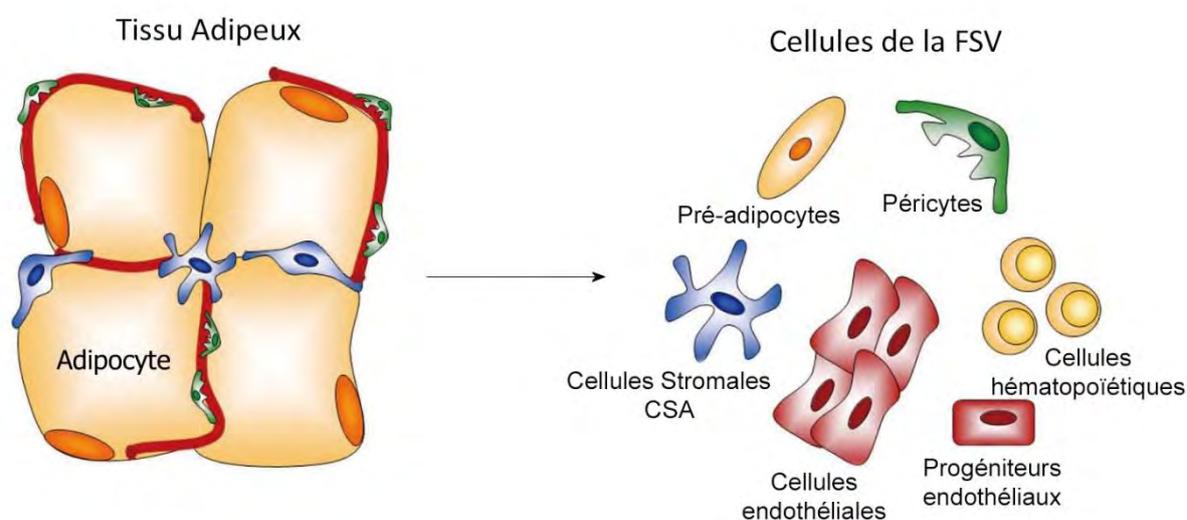


Figure 18 : Schéma représentatif de la FSV
(d'après Scherberich et al. World Journal of Stem Cells 2013)

Cette FSV contient plusieurs types cellulaires dont les proportions dépendent des individus, des zones de prélèvements et des protocoles de digestion.

Le tableau 5 représente les pourcentages moyens des différents types cellulaires de la FSV humaine (Bourin, Bunnell et al. 2013).

Populations cellulaires de la FSV	
Lignée hématopoïétique	
Cellules souches et progéniteurs	<0,1%
Granulocytes	10-15%
Monocytes	5-15%
Lymphocytes	10-15%
Cellules endothéliales	10-20%
Péricytes	3-5%
Cellules stromales	15-30%

Tableau 7 : Populations cellulaires de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux humain (d'après Bourin et al. Cytotherapy 2013)

Ces pourcentages sont dépendants des individus mais aussi des marqueurs de surface (Cluster of Differentiation : CD) utilisés pour définir chaque population.

2) Les "cellules stromales adipeuses"

Les cellules souches/stromales adipeuses (CSA) est le terme générique de cellules décrites comme Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) présentes au sein du tissu adipeux (Zuk, Zhu et al. 2001). Les CSM sont classiquement isolées entre autre de la moelle osseuse (CSMO-MO) ou de la FSV du tissu adipeux (CSA) et représentent une population hétérogène de cellules (Liu, Martina et al. 2007).

Les CSM ont depuis été décrites dans de nombreux tissus et sont potentiellement présentes dans tout l'organisme comme source de cellules progénitrices mésoenchymateuses. Ces cellules seraient *in vivo* une source de cellules progénitrices d'origine périovasculaire, même si il n'est pas encore clair si ces cellules sont ou non des péricytes quittant leur niche périovasculaire en cas de dommage localisé (Strioga, Viswanathan et al. 2012).

Il existe toutefois certaines différences entre les populations de CSM isolées des différents tissus (Puissant, Barreau et al. 2005, Sakaguchi, Sekiya et al. 2005, Bourin, Bunnell et al. 2013).

En 2013, l'ISCT et l'IFATS s'accordaient sur les caractéristiques permettant de décrire les CSA (Bourin, Bunnell et al. 2013) :

- Expression ou non de certains marqueurs de surface cellulaires. Ce paramètre est évalué par cytométrie en flux. C'est ce paramètre qui varie le plus entre les CSM des différents tissus (tableau 7). Au sein même de la population de CSA, l'expression du marqueur CD34 a tendance à diminuer après culture de ces cellules.
- Propriété clonogénique (capacité de certaines cellules à donner un clone de cellules identiques à partir d'une seule cellule mère).
- Multipotence, ou autrement dit la capacité à se différencier sous l'effet d'un environnement adapté vers différents lignages mésenchymateux : à savoir dans les voies adipogénique, chondrogénique et ostéogénique.

	Moelle Osseuse		Tissu Adipeux	
	MOT (population mère)	CSM-MO (population fille)	FSV (population mère)	CSA (population fille)
<i>CD34</i>	+/-	-	+	+/-
<i>CD45</i>	++	-	+	-
<i>CD13</i>	++	++	+/-	++
<i>CD73</i>	+/-	++	+/-	++
<i>CD90</i>	+/-	++	+/-	++
<i>CD105</i>	+/-	++	+/-	++
<i>CD10</i>		+/-		++
<i>CD36</i>		-		+
<i>CD106</i>		+		+/-
CFU-F	>0,001%	>5%	>1%	>5%

MOT: moelle osseuse totale (cellules nucléées) / CSM-MO: cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse

FSV: Fraction Stromale Vasculaire / CSA: cellules stromales adipeuses

CFU-F: Colony Forming Unit - Fibroblast

++ >70% ; + 30-70%; +/- 2-30%; - <2%

Tableau 8: Différences phénotypiques entre la Moelle Osseuse et le Tissu Adipeux humain (d'après Bourin et al. Cytotherapy 2013)

Dans la plupart des protocoles les CSA sont isolées des autres cellules de la FSV par adhésion au plastique de culture en 24h ce qui permet d'obtenir une population hétérogène répondant aux critères mentionnés ci-dessus (de la même manière, les CSM-MO sont isolées par adhésion au plastique lors de la culture de la Moelle Osseuse). Toutefois des cellules répondant à ces mêmes critères ont été décrites dans la partie non-adhérente de la FSV

(Mehrkens, Di Maggio et al. 2014). Il n'existe à l'heure actuelle aucun protocole ou marqueur cellulaire spécifique qui permettrait d'isoler toutes les CSA du tissu adipeux.

Les CSA, CSM issues du tissu adipeux, possèdent donc des propriétés de multiplication et de différenciation qui en font d'excellentes candidates à toutes les procédures d'ingénierie tissulaire des tissus mésenchymateux.

- Il est possible de les isoler à partir d'une lipoaspiration, technique à faible morbidité pour les patients, et avec peu de douleurs associées.
- Il est possible de les amplifier pour en obtenir un nombre plus important afin de réparer de grandes zones tissulaires lésées.
- Il est possible de les engager dans des voies de différenciations adipogéniques chondrogéniques et ostéogéniques et donc potentiellement de réparer des tissus cartilagineux ou osseux.

Type cellulaire	Facteurs d'induction de la différenciation	Marqueurs d'expression
<i>Adipocyte</i>	Dexaméthasone, isobutyl méthylxantine, indométhacine, insuline, thiazolidinédione	Lipoprotéine-lipase, aP2, PPAR- γ 2, léptine, Glut4
<i>Ostéoblaste</i>	Acide ascorbique, BMP-2, dexaméthasone, Dihydroxy-vitamine D	Phosphate alcaline, collagène de type I, ostéopontine, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse, Runx2, BMP-2, BMP-4, BMPR I, BMPR II, PTHr
<i>Chondrocyte</i>	Acide ascorbique, BMP-6, dexaméthasone, insuline, TGF- β	Protéoglycanes sulfatés, collagène de type II, collagène de type VI, aggrecan, PREPL

Tableau 9: Différenciation in vitro des CSA dans les 3 principales lignées cellulaires mésenchymateuses (d'après Gentile et al. 2012)

De plus de nombreuses études ont tenté de moduler les environnements de différenciation de ces cellules pour obtenir les caractéristiques d'autres types cellulaires, nous pourrions notamment citer les cellules musculaires, les cellules nerveuses, les cellules du disque intervertébrales etc.

B. Propriétés de la Fraction Stromale Vasculaire

L'intérêt des cellules de la FSV ne repose pas seulement sur son contenu en cellules capables de différenciation mésenchymateuses.

En effet la FSV (par l'intermédiaire des CSA mais aussi des autres types cellulaires), possède un sécrétome riche qui lui confère un rôle régulateur sur son environnement tissulaire. La plupart des essais cliniques actuels misent d'ailleurs sur un effet trophique des CSA *via* la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, immunosuppresseurs et régulateurs de l'inflammation.

Ainsi, les CSA ont un potentiel immuno-régulateur, régulant à la fois l'inflammation et la réponse immunitaire. Concernant les activités immuno-modulatrices, différents modes d'actions ont été décrits pour les CSA (Puissant, Barreau et al. 2005). L'exemple le plus connu est l'inhibition, par les CSA de l'activation (prolifération) lymphocytaire en présence d'un antigène (ou d'un mitogène) (Puissant, Barreau et al. 2005). Cette inhibition se fait à la fois par un phénomène de contact mais aussi par la sécrétion de facteurs solubles. Les CSA sont capables, sous stimuli de sécréter différentes cytokines agissant sur les acteurs de la réponse immunitaire (Figure 18).

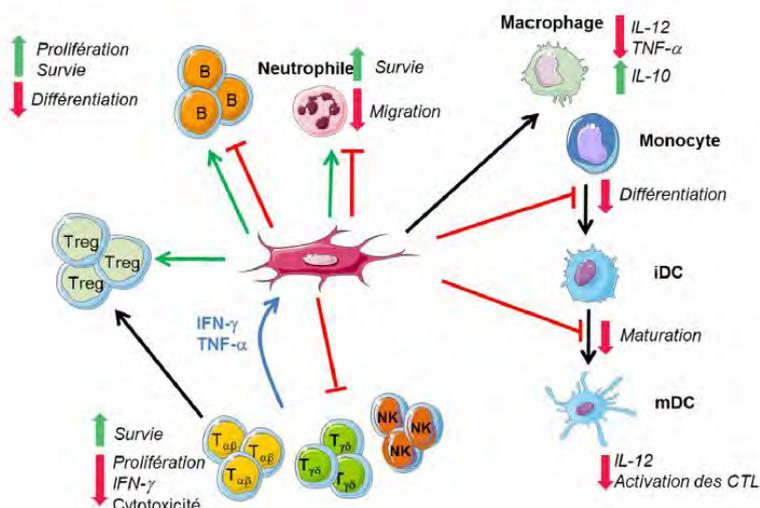


Figure 2 Effet immunosuppresseur des CSM sur les différents acteurs de l'immunité. B : lymphocyte B ; iDC : cellule dendritique immature ; mDC : cellule dendritique mature ; NK : cellules *natural killer* ; CTL : lymphocyte T cytotoxique ; Treg : lymphocyte T régulateur ; IL-12 : interleukine 12 ; TNF- α : *tumor necrosis factor alpha* ; IFN- γ : interféron-gamma.

Figure 19 : Interactions des CSA avec les différents acteurs de la réponse immunitaire (Bertheuil et al. *Ann Chir Plast.*)

Ces actions sur les différentes cellules du système immunitaire sont aussi responsables de l'effet immuno-modulateur des CSA qui sont capables par exemple via la sécrétion de TSG-6 de diminuer l'effet pro-inflammatoire des macrophages (Bertheuil, Chaput et al. 2015). Ces actions sur les effecteurs de l'immunité (lymphocytes B et T, macrophages, natural killer, cellules dendritiques, neutrophiles...) sont très variées et les connaissances actuelles sont bien résumées dans la publication de Bertheuil & co. (Bertheuil, Chaput et al. 2015).

Une autre propriété de la FSV, très importante en clinique, est son potentiel pro-angiogénique important. Non seulement les CSA expriment de nombreux facteurs pro-angiogénique dont le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Schubert, Xhema et al. 2011). Mais en plus, la FSV compte parmi ces cellules des progéniteurs endothéliaux, permettant un effet paracrine direct de ces facteurs et multipliant son potentiel néo-angiogénique. Or la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle dans des contextes pathologiques ischémiques (infarctus, ischémie des membres...) mais aussi dans tous les contextes de greffe (lipotransfert ou ingénierie tissulaire par exemple).

Concernant une utilisation en contexte hétérologue (d'un patient à un autre), en l'absence de stimuli inflammatoire, les CSM n'expriment pas le "Human Leucocyte Antigen -DR" (HLA-DR) molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Cette absence d'expression leur confère une faible immunogénicité (sans toutefois être

immunoprivilégiées puisqu'elles peuvent être tuées par les cellules natural killer NK activées (Spaggiari, Capobianco et al. 2005). Toutefois, la facilité de prélèvement et la disponibilité de ce tissu chez la plupart des patients incitent à une utilisation majoritairement autologue.

C. Le potentiel clinique de la Fraction Stromale Vasculaire

1) Utilisation actuelle

La fraction stromale vasculaire à l'heure actuelle est utilisée surtout en clinique sportive avec des injections intra-musculaire ou intra-articulaire essentiellement pour tenter de diminuer les dégâts aux muscles et articulation qui accompagne une pratique sportive intense.

2) Les études cliniques

Actuellement le National Institute of Health (NIH) des Etats Unis recense sur son site « clinicaltrials.gov » des essais cliniques déclarés du monde entier. Il existe 30 essais recensés utilisant la fraction stromale vasculaire humaine dans diverses applications cliniques.

La majorité (7 d'entre eux) porte sur l'utilisation de la FSV pour traiter l'arthrose. Toutefois il est intéressant de noter que les domaines potentiels d'utilisation de la FSV sont très variés et touchent tous les domaines de la médecine moderne.

Domaine d'utilisation	Nombre d'études
<i>Arthrose</i>	7
<i>Arthrite Rhumatoïde</i>	2
<i>Fibrose pulmonaire</i>	1
<i>Ischémie des membres</i>	2
<i>Lipotransfert</i>	3
<i>Sclérodermie</i>	1
<i>Diabète (type 1 et 2)</i>	1
<i>Fistules</i>	1
<i>Sclérose multiple</i>	1
<i>Broncho-pneumopathie chronique obstructive</i>	2
<i>Maladie neurodégénérative (dont Parkinson)</i>	2 (1)
<i>Disfonction érectile</i>	1
<i>Maladie auto-immune</i>	1
<i>Cardiomyopathie</i>	1
<i>Emphysème</i>	1
<i>Douleur post-amputation</i>	1
<i>Peau post-irradiation</i>	1
<i>Perte osseuse ostéoporotique</i>	1
	30

Tableau 10 : Etudes cliniques actuelles sur l'utilisation de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux humain

Ce tableau illustre l'engouement actuel de la Fraction Stromale Vasculaire comme tissu autologue de régénération/traitement. Cet engouement clinique est dû à la fois à la facilité de prélèvement mais aussi aux caractéristiques cellulaires de la FSV :

- Le prélèvement intra-opératoire et a-traumatique
- La présence de cellules stromales mésenchymateuses en grande proportions
- La présence de progéniteurs endothéliaux et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques
- Le potentiel de régulation des signaux-inflammatoires

3) La Fraction Stromale Vasculaire pour l'ingénierie tissulaire osseuse

a. Le rationnel du concept

Parmi les sources cellulaires d'ingénierie tissulaire osseuse (voir plus loin) seules la Moelle Osseuse Totale et la Fraction Stromale Vasculaire sont utilisables dans un timing intra-opératoire à l'heure actuelle.

Le potentiel clinique de la moelle osseuse en association avec des biomatériaux a été étudié cliniquement et permet de bons résultats mais reste limité en quantité prélevable et en morbidité du site donneur.

Cependant, le potentiel clinique de la fraction stromale vasculaire dans ces applications n'est pas connu et seulement quelques études précliniques se sont intéressées à la FSV humaine à l'heure actuelle.

Ce concept offre un double avantage de la FSV sur les CSA isolées :

- La FSV est isolable et utilisable dans un timing intra-opératoire
- La culture de la moelle osseuse ou de la FSV pour obtenir les CSM va progressivement faire perdre les cellules CD31+/CD34+, décrites comme des progéniteurs endothéliaux.

Ainsi une étude de Güven en 2011 a montré que la FSV totale favorisait la formation osseuse en sous-cutanée de rat nude en comparaison des CSA et des CSM-MO (Güven, Mehrkens et al. 2011).

Pour rappel, sur les 30 études cliniques recensées sur clinicaltrial.gov et utilisant la FSV, une étude porte sur son utilisation pour des pertes osseuses ostéoporotiques.

Cette étude nommée ROBUST, menée en Suisse s'est terminée en 2014 et les résultats seront disponibles dans les mois à venir.

b. Les différentes études

Le tableau suivant représente les différentes études (pré-cliniques pour la plupart) publiées sur l'utilisation de la FSV pour des procédures d'ingénierie osseuse.

	Etudes	Cellules	Biomatériaux	Culture (de la FSV totale)	Additif	Modèle	Formation osseuse
Etudes in vitro	<i>Papadimitropoulos 2011</i>	FSV humaine	Cylindre de BCP	Oui	Cellules CD14+ du sang	Culture 3D	+ (TRAP et IHC-BSP)
	<i>Tchang 2015</i>	FSV humaine	Cylindre d'HA	Oui	PRP	Culture 3D	++ 1,5% (HES)
Etudes ectopiques	<i>Scherberich 2007</i>	FSV humaine	Cylindre d'HA	Oui	-	Sous-cutanée de souris	+ (HES et IHC-BSP)
	<i>Müller 2009</i>	FSV humaine	Cylindre d'HA	Oui	Lysat plaquettaire	Sous-cutanée de souris	- (HES)
	<i>Müller 2010</i>	FSV humaine	BCP-HA ou Xenogrefe	Non	Gel de fibrine	Sous-cutanée de souris	+ (HES et IHC-OC)
	<i>Güven 2011</i>	FSV humaine	Cylindre d'HA	Oui	-	Sous-cutanée de souris	+ (HES)
	<i>Mehrkens 2012</i>	FSV humaine	Granules de BCP	Oui	rhBMP2 Gel de fibrine	Sous-cutanée de souris	++ (MEB, HES, TRAP)
Etudes orthotopiques	<i>Rhee 2010</i>	FSV rat	DBM +/- PLA	Non	Gel de fibrine Thrombine	Défaut calvaria de rat	++ 59% (μ CT, HES, IHC-OC)
	<i>Cheung 2010</i>	FSV cheval	Eponge de collagène	48h au frais		Défaut calvaria de rat	+ 20% (HES, ALP)
	<i>Kim 2012</i>	FSV lapin	Cylindre de PLGA	Oui	Milieu ostéogénique PRP	Défaut ulna de lapin	++ 55% (radio, HES)

Le potentiel clinique de la Fraction Stromale Vasculaire

	<i>James 2012</i>	FSV humaine	PLGA coaté d'apatite	Non	-	Défaut calvaria de souris	++ (μ CT, HES, Masson)
	<i>Jurgens 2013</i>	FSV chèvre	Collagène I/III	Non	-	Défaut ostéochondral genou de chèvre	+ (μ CT)
	<i>Mohammadi 2015</i>	FSV rat	Block de chitosan	Non	-	Défaut mandibule de rat	-
	<i>Thery 2015</i>	FSV rat	Granules de BCP	Non	-	Défaut en tibia irradié de rat	+ 0,5% (MEB, Movat)
Cas cliniques	<i>Lendeckel 2004</i>	FSV humaine	-	-	Grefe osseuse Gel de fibrine	Fracture de calvaria	+ (μ CT)
	<i>Pak 2012</i>	FSV humaine	-	-	PRP Acide Hyaluronique	Hanche ostéonecrotique	+ (IRM)

Tableau 11: Etudes publiées sur l'utilisation de la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux pour la reconstruction osseuse

Depuis 10 ans environ, différentes études se sont donc penchées sur le potentiel ostéoinducteur de la FSV de différentes espèces. La plupart des résultats histologiques montrent des résultats encourageant avec la FSV humaine, montrant une différenciation de ces cellules ainsi qu'une formation de néovaisseaux.

Très peu ont quantifié ce potentiel et aucune ne l'a comparé à un gold standard clinique (greffe osseuse ou BMP2).

Il apparait donc nécessaire de détailler ce potentiel ostéoinducteur de la FSV humaine (moins connu que celui d'autres espèces), de le replacer dans un contexte clinique et de le comparer aux autres stratégies intra-opératoires à la disposition des cliniciens (aucune étude actuelle ne compare aux gold standards de repousse osseuse).

PARTIE III :
Développement
d'un procédé intra-opératoire
de régénération osseuse avec la
Fraction Stromale Vasculaire

PARTIE III : Développement d'un procédé intra-opératoire de régénération osseuse avec la Fraction Stromale Vasculaire

A. La Médecine Régénératrice Osseuse

1) Généralités sur le tissu osseux

Le tissu osseux possède à la fois (1) un rôle de soutien et biomécanique (résistance aux contraintes mécaniques externes et aux forces appliquées par les muscles), (2) un rôle métabolique en assurant en grande partie l'homéostasie du calcium et du phosphate et (3) un rôle en tant qu'hôte de la moelle osseuse, organe lymphoïde primaire et lieu de formation de nombreuses cellules sanguines.

D'un point de vue anatomique les os peuvent être séparés selon leur forme :

- Les os longs avec un fut central (diaphyse) contenant la moelle osseuse, et des extrémités (épiphyses) recouvertes de cartilage articulaire. Ex : fémur, humérus, radius, métatarsiens etc.
- Les os plats tels que l'os frontal, temporal, les côtes, la mandibule.
- Les os courts tel que la rotule.
- Les os irréguliers tels que les vertèbres ou l'os pelvien.

a. Organisation de l'os

La matrice organique du tissu osseux est composée à 90% de collagènes (dont 80% de type I) et d'autres protéines non-collagéniques aux rôles moins connus, ainsi que d'un grand nombre de facteurs de croissance influençant le renouvellement du tissu osseux.

La phase minérale du tissu osseux est responsable à la fois du rôle de soutien de l'os et de réservoir d'ions pour l'ensemble de l'organisme (99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore, et 40 à 60% du sodium et du magnésium par exemple). La majorité de la phase minérale est constituée de cristaux de phosphates de calcium dont le rapport Ca/P varie selon la maturation de ceux-ci.

Le tissu osseux, en remaniement constant au cours de la vie, alterne entre :

- l'**os fibreux** immature
- l'**os lamellaire** organisé de structures concentriques

La structure de l'os lamellaire est un assemblage d'**ostéons** (ou systèmes harvésiens) qui forment les unités fonctionnelles de l'os et dont le nombre varie selon le type d'os (figure 19).

La densité de ces unités varie entre

- l'**os cortical** (ou compact) qui forme par exemple la périphérie de la diaphyse des os longs et les surfaces externe de la calvaria (os du crâne).
- l'**os trabéculaire** (ou spongieux) qui se retrouve à l'intérieur de l'épiphyse des os longs et, en fine couche, au centre de la calvaria (Rho, Kuhn-Spearing et al. 1998).

Enfin, la face externe des tissus osseux est entourée d'une membrane fibreuse séparant l'os des tissus mous : le **périoste**.

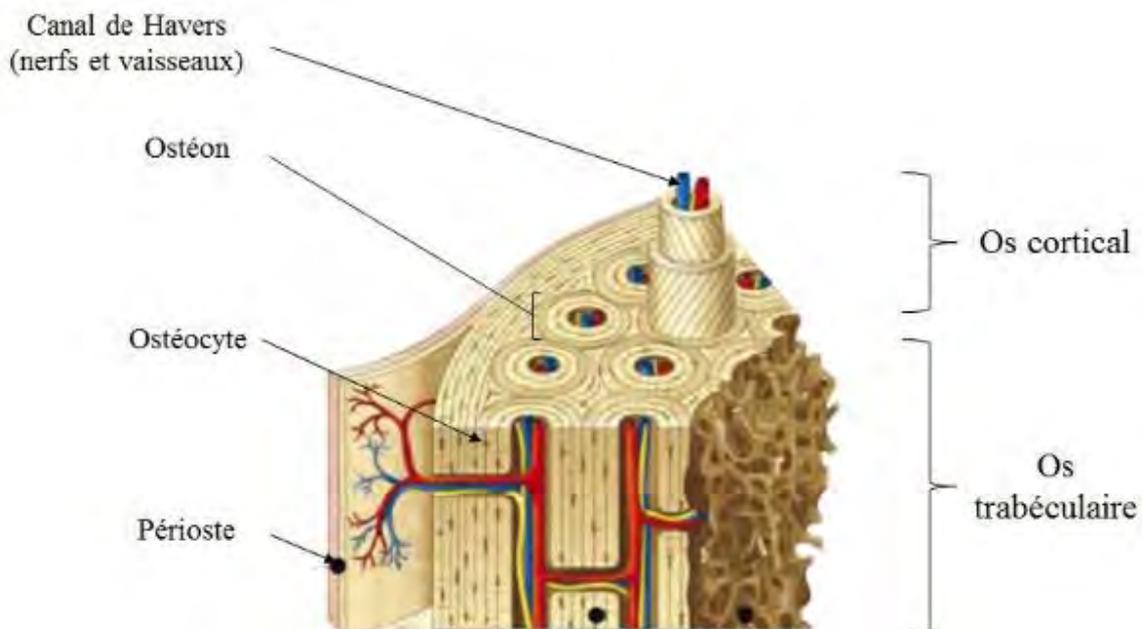


Figure 20 : Structure du tissu osseux

b. Cellules du tissu osseux

En mettant de côté la moelle osseuse, organe lymphoïde primaire source de nombreux types cellulaires mésenchymateux et hématopoïétiques, le tissu osseux, dans sa partie minéralisée contient 4 types cellulaires assurant son homéostasie : les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes.

Les trois premiers types cellulaires sont d'origine mésenchymateuse dérivant des CSM présentes dans la moelle osseuse.

Les **ostéoblastes** :

Les ostéoblastes sont des cellules d'une vingtaine de microns, qui ont pour fonction principale la synthèse de la matrice osseuse (ostéoïde) et sa minéralisation.

Les **ostéocytes** :

Lors de la minéralisation de la matrice, environ un dixième des ostéoblastes se retrouvent enchâssés dans celle-ci au sein de logettes appelées ostéoplastes. Leur phénotype va alors changer pour se transformer en cellules très étendues avec de nombreux prolongements cytoplasmiques. Ces ostéocytes ont un rôle important dans la régulation du remodelage osseux en transmettant les informations chimiques et mécaniques au sein de toute la matrice osseuse.

Les **cellules bordantes** :

Au fur et à mesure de la minéralisation de la matrice osseuse, certains ostéoblastes s'aplatissent à la limite entre la moelle osseuse et le tissu osseux minéralisé. En s'aplatissant ainsi, les ostéoblastes cessent leur action de minéralisation de la matrice pour devenir des cellules bordantes. Tout comme les ostéocytes piégés dans la partie minéralisée, les cellules bordantes participent au réseau cellulaire transmettant les informations de stimuli chimiques et mécaniques. Ces cellules contribuent aux cycles de remodelage osseux en modulant l'activité ostéoclastique et ostéoblastique (redifférenciation en ostéoblastes par l'action de certaines molécules comme la PTH (parathyroïde hormone) (Kim, Pajevic et al. 2012).

Le schéma suivant adapté de (Javed, Chen et al. 2010), retrace les étapes de différenciation de la cellule souche mésenchymateuse dans la lignée ostéoblastique/ostéocytaire ainsi que les principales protéines influençant et caractérisant chaque étape.

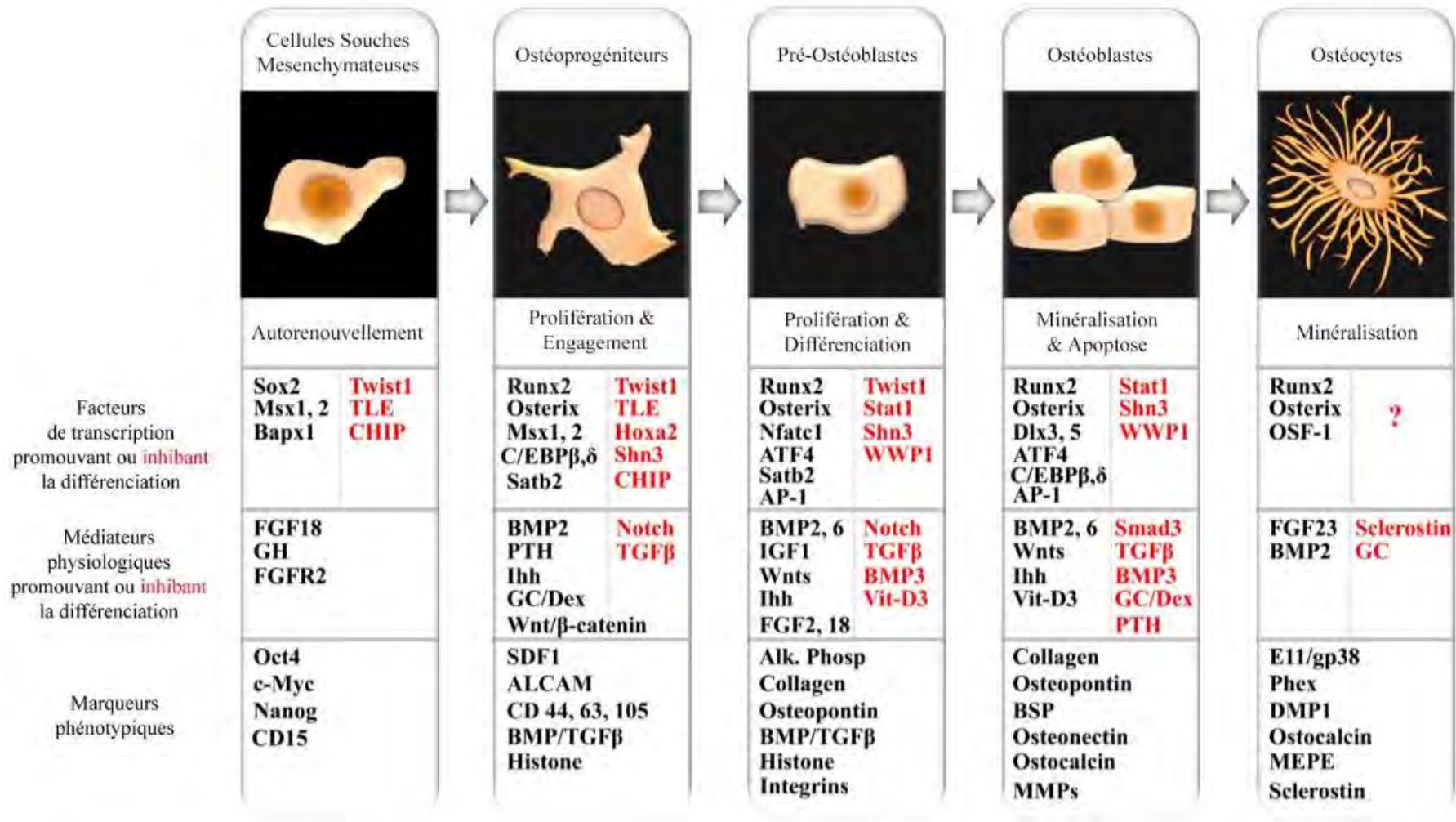


Figure 21 : Les étapes de la différenciation ostéoblastique/cytaire (d'après Javed et al. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2010)

Les **ostéoclastes** :

Les ostéoclastes, à l'instar des ostéoblastes sont des cellules capables de résorber la matrice osseuse. L'ostéoclaste dérive de progéniteurs hématopoïétiques (monocytes, macrophages et cellules dendritiques). Les progéniteurs engagés dans la différenciation ostéoclastiques vont fusionner sous l'action de stimuli comme le RANKL (Receptor Activating NF Kappa B Ligand) pour devenir des cellules géantes multinucléées. Au niveau du pôle basal de ces cellules, appelé bordure en brosse se forme la lacune de résorption (ou de Howship) où a lieu la dissolution de la phase minérale et la digestion de la matrice osseuse par le relargage de protons (H^+) et de différentes protéinases matricielles libérées par exocytose.

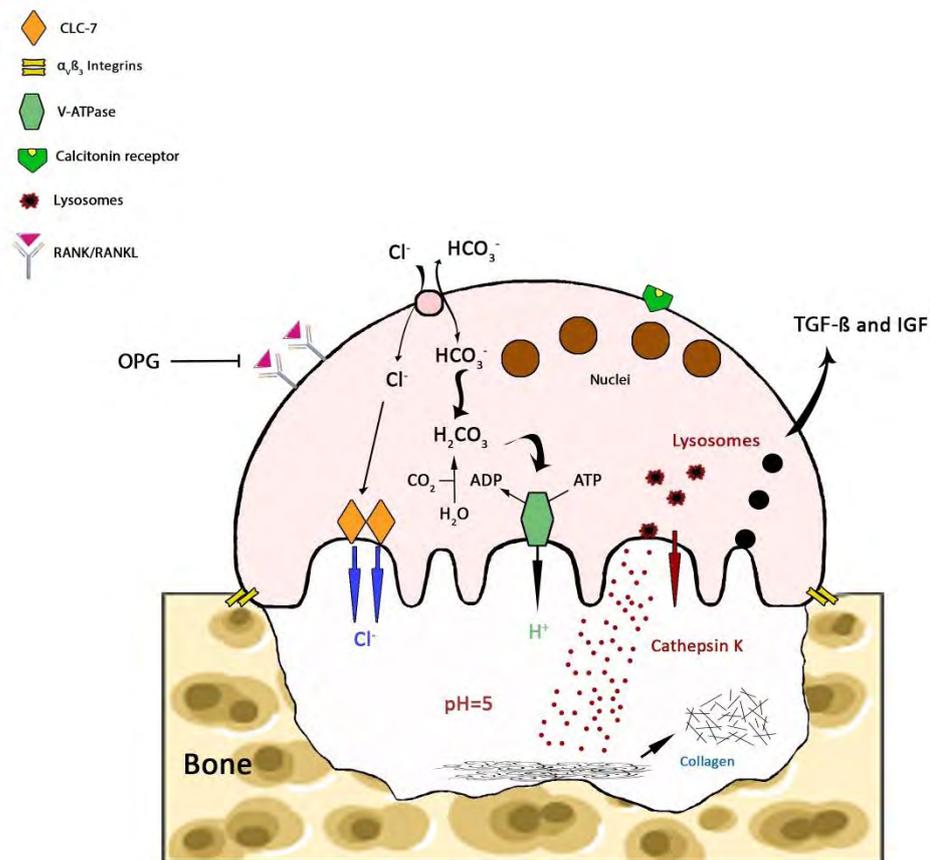


Figure 22: Mécanisme de résorption osseuse ostéoclastique (Laperine et al. Drug Disc Today 2016)

c. Le processus de cicatrisation osseuse

Selon les classifications il est possible de distinguer 3 ou 4 phases (la phase intermédiaire pouvant être divisée en 2 étapes) dans le processus de réparation osseuse naturelle suite à une fracture par exemple.

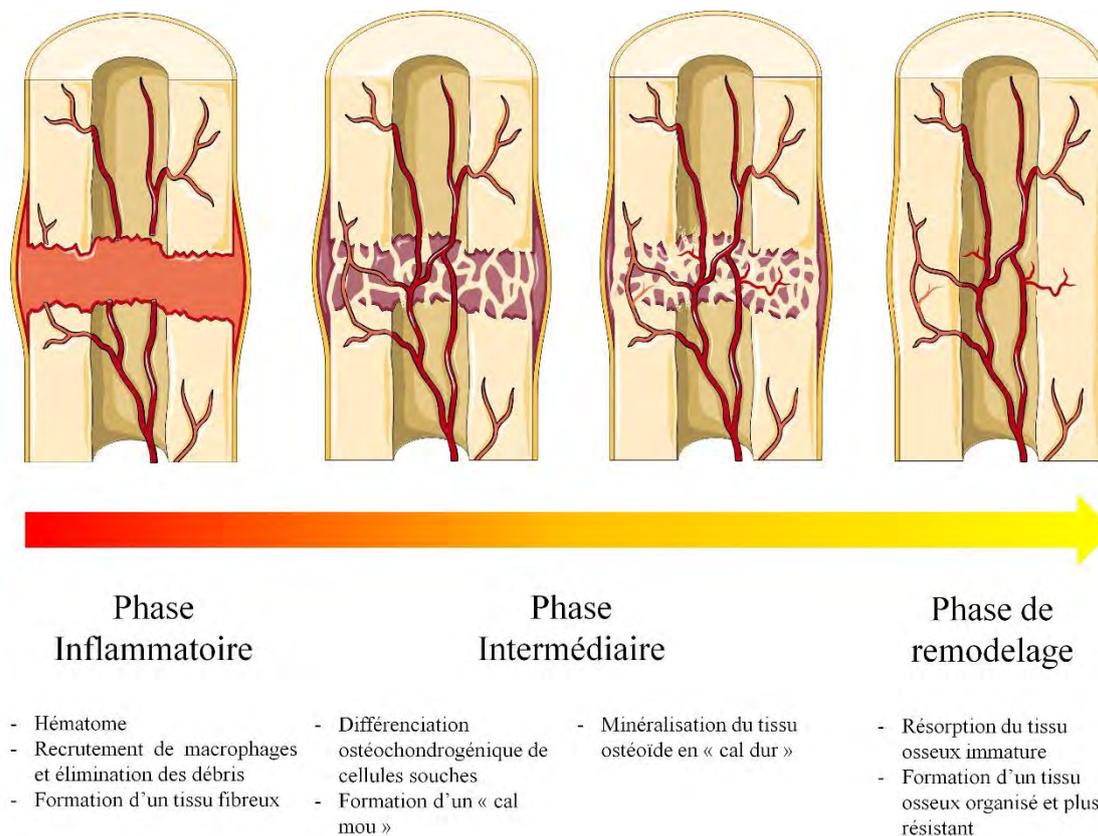


Figure 23: Processus de cicatrisation d'un défaut osseux non-critique

La première phase est une « **phase inflammatoire** » qui voit la mise en place de l'hématome fracturaire. Cet hématome correspond à une inflammation locale du tissu lésé. Les cellules nécrotiques du tissu lésé vont par l'intermédiaire de signaux chimiotactiques recruter sur le foyer de la lésion un certain nombre de cellules provenant du sang ou de la moelle osseuse environnante. Parmi ces cellules se trouvent des macrophages chargés d'éliminer les débris cellulaires de la zone endommagée. En plus des cellules inflammatoires il y a recrutement et prolifération de cellules souches (mésenchymateuses et hématopoïétiques) qui donneront ensuite naissance aux futures cellules osseuses de l'os reconstruit. Lors de cette phase qui dure généralement 2 à 3 semaines, il y a mise en place d'un tissu de granulation fibreux riche en fibroblastes et en collagène de type III.

« **La phase intermédiaire** » qui suit est appelée phase de réparation elle dure elle aussi plusieurs semaines. Il y a formation d'un « cal mou » dit primaire. Lors de ce processus les précurseurs préalablement recrutés se différencient dans les lignées ostéoblastiques et chondrocytaires sous l'action de stimuli chimiques (facteurs de croissance) et physiques (contraintes mécaniques). Au centre du foyer lésé, les ostéoblastes modèlent un tissu ostéoïde riche en collagène de type I qui va progressivement minéraliser sous l'action de ces mêmes cellules. Les chondrocytes créent un anneau cartilagineux autour du foyer. Ce tissu cartilagineux minéralise ensuite lui aussi avec l'arrivée de la néovascularisation et des cellules osseuses. Ce « cal mou » va progressivement devenir un « cal dur » minéralisé formant un pont entre les bords de la fracture. Toutefois, cet os néoformé possède une structure osseuse minéralisée aléatoire et constitue un os immature moins résistant aux contraintes mécaniques que l'os natif.

C'est pourquoi intervient la dernière phase qui est une « **phase de remodelage** » osseux qui va durer plusieurs mois. Ce mécanisme de renouvellement tissulaire a lieu aussi naturellement dans l'os sain pour réparer les micro-dommages osseux qui apparaissent tout au long de la vie. Ce processus correspond à la succession séquentielle de 4 étapes au sein d'unités fonctionnelles nommées « Basal Multicellular Unit » BMU.

- La première phase correspond à l'**activation** de précurseurs ostéoclastiques par les cellules bordantes de la zone à remodeler. Durant le recrutement des pré-ostéoclastes il y a dégradation de la couche collagénique entourant le tissu minéralisé par les cellules bordantes.
- Les pré-ostéoclastes fusionnent ensuite pour donner des ostéoclastes matures qui résorbent la matrice osseuse au sein de la lacune de résorption. C'est la phase de **résorption**.
- Une fois une partie de l'os résorbé une inversion des signaux chimiques d'activation des ostéoclastes en faveur d'une inhibition de ceux-ci intervient. Il y a aussi recrutement de cellules ostéoblastiques, c'est la phase dite **d'inversion**.
- La dernière phase du remodelage correspond alors au dépôt d'un tissu ostéoïde nouveau par les ostéoblastes, qui va ensuite minéraliser. C'est la phase de **formation**.

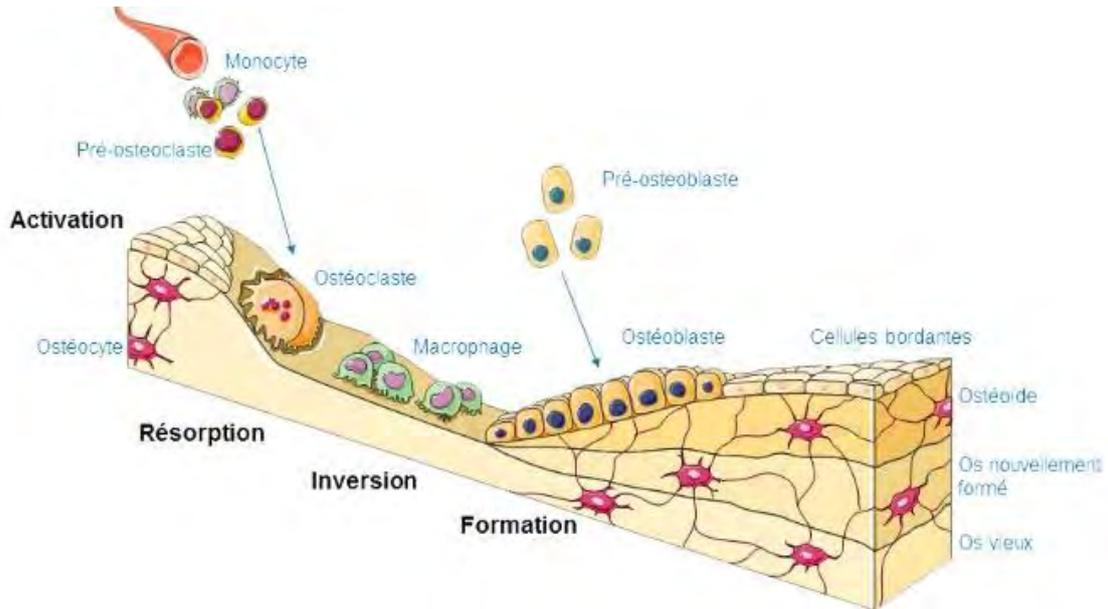


Figure 24 : Processus de remodelage osseux, dernière étape de la cicatrisation osseuse

Tout ce processus de cicatrisation osseuse est influencé par de nombreux facteurs environnementaux dont :

- la vascularisation du site cicatriciel, essentiel au recrutement des différents progéniteurs osseux
- la présence de cellules souches et précurseur ostéoblastiques, ostéoclastiques et vasculaires pour permettre la formation du tissu cicatriciel qui minéralisera

2) Les atteintes cliniques du tissu osseux

a. Le contexte clinique dans la région maxillo-faciale

Le squelette cranio-faciale dérive des cellules de la crête neurale. Cette région possède des os issus d'ossification membraneuse (à partir du tissu mésenchymateux) (frontal, pariétal...) et d'autres issus d'ossification endochondrale (en passant par une matrice cartilagineuse) (base de l'occipital, corps du sphénoïde, base du temporal...).

De manière naturelle, l'os est un tissu capable de cicatriser mais aussi de se remodeler de manière à obtenir un tissu avec des propriétés identiques au tissu natif, notamment en termes de résistance mécanique.

Toutefois, cette réparation a des limites. En effet, lorsque le défaut osseux est trop important (défaut osseux de taille critique), lorsque la zone lésée est hypotrophique (faible cellularité et absence de vascularisation), lorsque la localisation est défavorable à la cicatrisation (à proximité du nez ou de la cavité buccale), dans certaines zones de la face cicatricielles après traumatisme, malformation, ou en cas d'irradiation, alors le tissu osseux ne sera pas en mesure de cicatriser correctement. Dans ce cas il y a persistance d'un défaut osseux incapable de remplir son rôle mécanique et physiologique.

➤ Les fentes alvéolaires

Les fentes cranio-faciales sont des malformations faciales congénitales qui proviennent d'un défaut de fusion des bourgeons crânio-faciaux lors du développement embryonnaire. Parmi les différents types de fentes possibles, les atteintes de la zone alvéolaire (gencive et os maxillaire) représentent les plus graves sur le plan du défaut osseux.

Les fentes alvéolaires qu'elles soient associées ou non avec une fente du palais (fente du voile ou de la voûte du palais) nécessitent, pour être traitées, un apport osseux afin de combler la non-séparation des orifices oral et nasaux.

L'incidence des fentes palatines varie selon le sexe, les régions et selon l'atteinte (labio-palatine) ou non (palatine seule) de la lèvre. Ces fentes appelées aussi labio-maxillopalatine représentent sont les malformations congénitales faciales les plus fréquentes avec 1 naissance sur 750 avec 46% de fente labio-palatines, 33% de fente palatine et 21% de fente labiale.

Ces fentes peuvent être isolées ou associées à d'autres malformations cranio-faciales (syndrome).

D'un point de vue clinique et embryologique, se distinguent :

- Les fentes du palais primaire : touchant lèvre, nez et l'os maxillaire en avant du foramen incisif
- Les fentes du palais secondaire : touchant l'os maxillaire en arrière du foramen incisif, l'os palatin et le voile du palais.

Enfin, les fentes peuvent être unilatérales ou bilatérales.

Le traitement de ces affections fait intervenir chirurgiens maxillo-faciaux, plasticiens ainsi que ORL, pédiatres, orthodontistes, phoniatres. C'est lors de reconstruction de la partie osseuse du palais primaire (os alvéolaire), entre 4 et 9 ans, qu'un apport osseux externe (greffe) est nécessaire dans environ 40% des cas.



Figure 25: Exemple de fente unilatérale du palais primaire et secondaire

➤ Les tumeurs osseuses

Les cancers de la cavité orale représentaient 2,1% des cancers en 2012 (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). La prise en charge des cancers des voies aérodigestives supérieures et en particulier de la cavité orale peut nécessiter une résection osseuse, en fonction du type de cancer, du degré d'évolutivité de la pathologie, et de l'envahissement osseux.

La réhabilitation fonctionnelle passe alors par une reconstruction adaptée notamment sur le plan osseux, le plus souvent à l'aide de greffes osseuses autologues vascularisées (ou lambeaux libres osseux), fiables mais difficiles techniquement.

Selon le type de tumeur peuvent être proposés des séances de radiothérapie et ou de chimiothérapie. Toutefois, les séquelles de radiothérapie en terrain osseux, à savoir l'aplasie médullaire de l'os irradié, la diminution de la vascularisation voir l'ostéoradionécrose qui l'accompagne en font un territoire des plus hypotrophiques. Les greffes osseuses non-vascularisées en territoire irradié se compliquent par un rejet dans 50 à 80% des cas. C'est pourquoi l'indication principale clinique est la greffe osseuse vascularisée. Ces caractéristiques en font un sujet d'étude et un challenge à part pour les stratégies d'ingénierie tissulaire osseuses.



Figure 26: Exemple de défaut osseux mandibulaire post-extraction tumorale (Hidalgo et al. PRS2002)

➤ Les traumatismes et exemples d'ostéotomies

Les causes traumatiques de défaut osseux cranio-faciaux sont multiples et très fréquentes ; rixes, accidents de la voie publique, chutes, lésions balistiques etc. Les localisations fracturaires et les pertes osseuses sont multiples que ce soit au niveau du sinus frontal, du tripode zygomatique, du maxillaire, de la mandibule ou encore de la pyramide nasale et peuvent nécessiter une greffe osseuse.

Les dysmorphoses faciales maxillo-mandibulaires nécessitent une prise en charge orthodontico-chirurgicale. En effet les anomalies de l'occlusion dentaire peuvent traduire une anomalie des bases osseuses maxillaires et/ou mandibulaires, et dont la correction chirurgicale lors d'ostéotomies faciales peut nécessiter une interposition osseuse ou de substituts osseux.

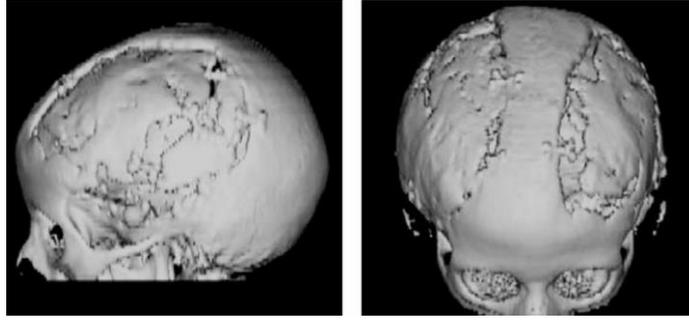


Figure 27: Exemple de traumatisme osseux crânien
(Lendeckel et al. J Cranio-Maxillofac Surg 2004)

➤ Les extractions dentaires

Après extraction dentaire un phénomène de perte osseuse alvéolaire peut survenir. Par la perte d'attache du parodonte (tissu de soutien de la dent) des suites de l'extraction, une récession gingivale est quasi systématique et est associée à une fonte osseuse alvéolaire. Ce phénomène peut être atténué par le comblement alvéolaire par des biomatériaux en post-extraction. Toutefois, après perte osseuse alvéolaire, les biomatériaux seuls ne peuvent plus répondre à l'indication. Cette perte osseuse est une limitation à la réhabilitation implantaire (exemple : place d'un implant) qui nécessite une hauteur alvéolaire suffisante pour la stabilité future de l'implant et une technique pour régénérer du tissu osseux par apposition est alors un challenge.



Figure 28: Exemple de perte osseuse alvéolaire post-extraction dentaire
(Dental Implant Dentistry blog)

b. Le gold standard et ses limites

Dans toutes ces indications de perte osseuse critique (qui ne va pas se reconstruire spontanément), la technique de référence actuelle est la greffe osseuse autologue.

La résistance mécanique et la forme recherchée lors de la greffe sont deux paramètres majeurs dans le choix de la zone de prélèvement.

- L'os prélevé peut être de l'os cortical/compact, de l'os spongieux/trabéculaire ou de l'os cortico-spongieux. L'os cortical/compact se résorbant plus lentement que l'os spongieux/trabéculaire. Le choix entre os cortical / os trabéculaire se fera essentiellement selon la nécessité d'un apport structurel/mécanique du défaut à combler.
- L'os peut être prélevé sur de nombreux sites (tibia, côtes, mandibule, os iliaque, voir même la calvaria)
 - La greffe iliaque et l'épiphyse du radius permet un choix de prélèvement d'os spongieux ou cortico-spongieux et est très utilisé pour les défauts de moins de 5cm de long
 - La greffe costale permet un prélèvement cortico-spongieux plus long (jusqu'à 20cm) et offre une bonne régénération du site donneur. De plus, ce prélèvement chez l'enfant va permettre de traiter des défauts où une croissance du site receveur est désirée (fentes palatines par exemple). Enfin grâce au prélèvement mixte os-cartilage intercostal, ce type de greffe permet la reconstruction d'articulation.
 - La greffe crânienne pariétale permet elle aussi la bonne cicatrisation du site donneur tout en travaillant dans la région cranio-maxillo-faciale.
 - La greffe de la symphyse mandibulaire permet un prélèvement d'os cortico-spongieux lui aussi en région cranio-maxillo-faciale.
 - Le greffe tibiale permet le prélèvement d'un os spongieux en zone proximale du tibia, zone facilement accessible chez les patients adultes.

Après la greffe, tout le greffon ne sera pas immédiatement vascularisé et une partie des cellules (plus ou moins importante selon sa taille) va mourir par manque d'apport en oxygène et en nutriments. La greffe sera ensuite colonisée par les cellules osseuses du site donneur pour remodeler le greffon afin de reconstruire le défaut avec de l'os mature.

Il est aussi possible de faire des greffes osseuses hétérologues (d'un autre donneur). Ces prélèvements osseux allogéniques ont permis la mise en place de banques de tissus osseux

pour permettre à tout moment aux chirurgiens de disposer du tissu « sur mesure ». Toutefois, ces prélèvements nécessitent un traitement stérilisant supplémentaire pour éviter les transmissions de pathogène. Ces traitements des greffons pour limiter le risque d'infection vont aussi diminuer les propriétés d'ostéointégration de ceux-ci.

La greffe osseuse autologue donne généralement de bons résultats mais comporte toutefois des limites qui sont classables en deux catégories :

- les limites sur site donneur :

En effet la quantité de tissu prélevable reste limitée. De plus le prélèvement est synonyme d'une morbidité au niveau du site donneur, avec des douleurs, hématomes, infections et une fragilisation mécanique.

- limites sur le site receveur :

La prise de greffe n'est pas efficace à 100% et il peut exister des échecs qui dépendront en partie du site receveur. Pour des localisations peu-vascularisées, ou sur terrain irradié (conditions hypotrophiques) la greffe osseuse ne suffira pas toujours à permettre une régénération du défaut osseux. En cas d'os hétérologue, un risque de rejet est présent.

C'est dans ce contexte clinique qu'il est nécessaire de développer une technique pour régénérer ces défauts osseux qui soit à la fois sans danger pour le patient (innocuité) et avec des résultats prédictibles et reproductibles (Shrivats, McDermott et al. 2014).

3) L'ingénierie tissulaire osseuse

Afin d'offrir une alternative à la greffe osseuse de nombreuses équipes tentent de mettre au point une technique d'ingénierie tissulaire osseuse performante.

a. Définition

L'ingénierie tissulaire dans sa définition historique est un champ de recherche médicale interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et de la biologie pour restaurer, maintenir ou améliorer la fonction d'un tissu (restore, maintain or improve) (Langer and Vacanti 1993). Dorénavant, lorsqu'il est question d'ingénierie tissulaire, au niveau osseux ou pour d'autres organes, il est fait mention des 4 "R" pour Réparer, Remplacer, Reprogrammer et Régénérer comme objectif à atteindre. C'est un principe qui est très souvent représenté par une association entre :

- Un biomatériau (naturel ou synthétique) adapté mimant les capacités matricielles du tissu à régénérer
- Une source cellulaire compétente pour réparer ou remplacer les cellules du tissu à régénérer

A ce couple peut se rajouter une composante environnementale (sous la forme d'un paramètre physique ex : tension en oxygène ou biochimique, ex : facteur de croissance) qui va influencer les cellules implantées et/ou les cellules du site d'implantation.

Ce principe peut être adapté à tous les tissus de l'organisme. Concernant l'os, il existe différents types de biomatériaux, de cellules, et "d'adjuvants" qui sont utilisés ou à l'étude à l'heure actuelle et dont nous allons discuter dans les paragraphes suivants.

Voici tout d'abord quelques définitions des différents phénomènes qui ont lieu lors de la régénération osseuse :

-*ostéoconduction* : C'est la capacité passive d'un tissu ou d'un biomatériau, après implantation en site osseux/orthotopique à accueillir des cellules osseuses et à supporter la formation osseuse induite par ces dernières.

-*ostéoinduction* : C'est la capacité d'un biomatériau ou d'une molécule à induire une formation osseuse après implantation en site ectopique/hétérotopique. (Ripamonti 1996, Barradas, Yuan et al. 2011). Ce phénomène n'est à l'heure actuelle pas totalement connu et le terme regroupe la formation osseuse endochondrale provoquée par les BMP (2 et 7

notamment) (Reddi and Huggins 1972) et la formation osseuse membraneuse (ou intramembranaire) induite par les biomatériaux (Yuan, Bruijn et al. 2001). Dans les deux cas, il y a un phénomène de différenciation des ostéoprogéniteurs.

-*ostéogénique/ostéoformatrice*: Concerne la capacité de certaines cellules à mener à la formation d'un tissu osseux.

b. Les biomatériaux

Les propriétés recherchées des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire sont communes à la plupart des tissus à régénérer :

- Promouvoir l'attachement, la migration, l'interaction, la prolifération et la différenciation des cellules à son contact
- Etre biocompatible avec le système immunitaire au site d'implantation
- Servir de support structural aux cellules et au tissu néoformé

En addition à ces caractéristiques, selon la composition physico-chimique du biomatériau, celui-ci peut être résorbé ou non :

- Un matériau osseux biocompatible reste intact sur le site d'implantation. C'est le cas des biomatériaux biotolérés (*e.g.* polyacrylics), formant une capsule fibreuse les séparant de l'os ou des biomatériaux bioinertes (*e.g.* aluminium ou titane), ne formant pas de tissu fibreux mais sans interaction biologique.
- Un substitut osseux, au contraire va être progressivement résorbé par l'organisme et remplacé par du tissu osseux. C'est le cas des matériaux bioactifs (carbonates de calcium, phosphates de calcium et bioverres), qu'ils aient des propriétés ostéoinductives ou non (Malard, Espitalier et al. 2007).

Les biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse peuvent être répartis en 4 classes (García-Gareta, Coathup et al. 2015) :

- Les polymères qui sont soit naturels (comme le collagène ou la cellulose) ou synthétiques (comme l'acide poly-lactique).
- Les céramiques qui regroupent les phosphates de calcium (comme l'HA ou les BCP), les bioverres et d'autres céramiques.
- Les métaux comme le titane par exemple.

- Les matériaux composites qui comportent les propriétés des plusieurs des classes précédemment citées (comme les polylactiques renforcés de phosphates de calcium par exemple).

Matériaux de greffe osseuse		Exemples
Polymères	Naturels	Protéiques: collagène, fibrine, gélatine, fibroïne Polysaccharides: acide hyaluronique, chondroïtine sulfate, cellulose, amidon, alginate, agarose, chitosan, pullulan, polydextrose
	Synthétiques	-acide poly-glycolique (PGA) -acide poly-lactique (PLA) -poly-(ε-caprolactone) (PCL) -Poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) -Poly-hydroxyméthylméthacrylate (poly-HEMA)
Céramiques	Phosphates de Calcium	-Hydroxyapatite coralline ou synthétique (HA) -HA substituée en silicate -Phosphate β-Tricalcium (β-TCP) -Phosphate dicalcium deshydraté (DCPD) -Phosphate de calcium biphasique (HA+β-TCP) (BCP)
	Bioverres	Verre bioactif silicaté Verre bioactif borate/borosilicate
	Autres	Céramique d'aluminium (Al ₂ O ₃)
Métaux		Titane Tantale Acier inoxydable Magnésium
Matériaux composites		-HA/poly-(D,L-lactide) -HA/chitosan-gélatin

Tableau 12 : Classification possible des différents biomatériaux de reconstruction osseuse (d'après Garcia-Gareta et al. Bone 2015)

Les propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction des biomatériaux vont dépendre à la fois de leur structure chimique mais aussi des caractéristiques physiques comme la surface spécifique, la micro- et macro-porosité ainsi que la granulométrie si ce sont des granules (Barradas, Yuan et al. 2011). La vitesse de résorption du biomatériau est aussi un facteur très influant de la repousse osseuse par des cellules implantées.

En clinique humaine, la plupart de ces matériaux sont commercialisés sous différentes formes pour de nombreuses applications, donc la plupart en implantologie pour permettre de prévenir une perte osseuse.

Origine	Type	Exemple clinique
Naturels	Allogreffe	GRAFTON® DBM, OSTEOSET BDM®
	Xéno greffe HA biologique	ENDOBON®, BIO-OSS®, LUBBOC®, OXBONE®, SURGIBONE®, OSTEOGRAFT®
Synthétiques	Carbonates de calcium	BIOCORAL®
	Céramiques Phospho- Calciques	<i>HA</i> CERAPATITE®, TRANS-OSSATITE®
		<i>aTCP - bTCP</i> BIOSORB®, CALCIRESORB®, CEROS®, CERASORB®, BIOSORB®, RTR®
		<i>BCP</i> CALCIRESORB 35®, CERAFORM®, ALASKA®, MBCP®, CROSS-BONE®, SBS60/40®
	Polymères	<i>Ciments acryliques (PMMA) Polyesters aliphatiques</i> BIOPLANT®, HTR®
	Bioverres	PERIOGLASS®, BIOGRAN®, BIOGLASS®.
Matériaux composites	Sulfate de calcium Naturels	LIFECORE®, OSTEOSET BIOSTITE®, BIO-OSS®COLLAGEN, RTR®, CALCIRESORB-COLLAGEN™, CERAPATITE- COLLAGEN™, COLLAPAT®, COLLAGRAFT®
	Synthétiques	PEPGEN®

Tableau 13: Biomateriaux osseux utilisés en clinique humaine selon leur origine (autre classification possible)

En termes d'ostéoinduction, la majorité des rapports d'ossification ectopique concerne des phosphates de calcium.

La libération d'ions phosphates et d'ions Ca^{2+} , PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} par ces biomatériaux semble impliquée dans la formation osseuse aussi bien en ce qui concerne l'ostéoconduction en site osseux que l'ostéoinduction (Barradas, Yuan et al. 2011).

Les propriétés chimiques influent sur la formation osseuse, l'un des exemples connus est la faculté des phosphates de calcium à lier certaines molécules, dont les BMP, et augmenter ainsi la concentration de signaux pro-ostéogéniques.

De plus, les propriétés mécaniques des matériaux influent sur la transmission des signaux de mécano-transduction nécessaires à la différenciation des progéniteurs en cellules osseuses.

Enfin la présence d'une porosité au niveau macroscopique et microscopique est essentielle pour stimuler la formation osseuse. Les pores permettent à la fois l'invasion vasculaire et cellulaire mais aussi une dégradation plus rapide du biomatériau pour être remplacé par du tissu osseux.

Les BCP sont formés d'HA et de β -TCP. Le β -TCP se dégrade relativement rapidement *in vivo* et permet ainsi la libération d'ions calcium et d'ions phosphate stimulant la calcification. L'HA met plus longtemps à se dégrader *in vivo* et permet d'avoir une base stable nécessaire à un phénomène d'ossification post-calcification.

Les recherches sur les biomatériaux, bien que non abordés dans cette thèse, représentent un champ incontournable de la recherche en ingénierie tissulaire actuelle. Le développement et la combinaison de nouveaux matériaux permettent de moduler :

- Leurs propriétés mécaniques et de mécanotransductions
- Leurs porosités et potentiels d'envahissement par les fluides biologiques
- Leurs capacités de dégradation
- Leurs potentiel à véhiculer des facteurs angiogéniques ou ostéogéniques
- Leurs interactions avec le système immunitaire de l'hôte et l'environnement inflammatoire qui en découle

Enfin, le développement des nouveaux procédés d'impression en 3 dimensions permet déjà d'envisager la création de biomatériaux spécialement créés pour une forme et une application personnalisée (Amini, Laurencin et al. 2012).

c. Les sources cellulaires

➤ La moelle osseuse

Il est souvent fait notion de moelle jaune et de moelle rouge. La moelle jaune correspond au tissu adipeux médullaire cité précédemment. La moelle rouge correspond à la moelle osseuse non adipocytaire et regroupe les fonctions d'organe lymphoïde primaire siège de l'hématopoïèse mais aussi de source de cellules précurseurs du tissu osseux (à la fois ostéocytaires et ostéoclastiques). Cette présence de cellules progénitrices osseuse *via* les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) et hématopoïétiques (CSH) a fait de la moelle osseuse, historiquement, la première source cellulaire à être utilisée pour la reconstruction osseuse (Trojani, Balaguer et al. 2008). Etant située au niveau de l'os trabéculaire elle contient, en plus des cellules, des molécules pro-ostéogéniques (BMP) et constitue au total un microenvironnement osseux natif.

Cette source cellulaire, présente au sein même de l'os est la seule utilisée actuellement en clinique maxillofaciale humaine (hors études cliniques). Cette moelle est généralement prélevée au niveau de la crête iliaque par ponction puis implantée en site osseux avec ou sans biomatériau ou en supplément de la greffe osseuse.

Ce mélange moelle osseuse dite « totale »/biomatériau donne de bons résultats en clinique mais aussi lors d'études en site osseux (Corre, Merceron et al. 2015).

Toutefois, cette technique reste limitée par :

- la quantité de moelle prélevable, souvent de l'ordre de quelques cc si elle n'est pas diluée dans le sang
- la "richesse" de cette moelle, les proportions cellulaires la composant variant énormément selon les individus, l'âge et les pathologies osseuses
- la morbidité (douleur et possibilité d'infection) du site donneur

➤ Les cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses, sont des cellules souches multipotentes capable de proliférer de manière clonogénique (une cellule mère donnant deux cellules filles aux propriétés rigoureusement identique à la cellule d'origine) et de se différencier en multiples

types cellulaires mésenchymateux (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes) sous l'action de stimuli adaptés (Pittenger, Mackay et al. 1999).

Elles furent décrites dans un premier temps comme des progéniteurs osseux de la moelle osseuse « totale » (Friedenstein, Petrakova et al. 1968, Tavassoli and Crosby 1968) et représentent moins de 0,1% des cellules nucléées de celle-ci (Haynesworth, Goshima et al. 1992).

Ce sont majoritairement les CSM de la moelle osseuse qui sont utilisées dans les études d'ingénierie tissulaire osseuse.

L'amplification du nombre de ces cellules par culture *in vitro* permet d'en obtenir un très grand nombre sans perdre leur capacité à se différencier en cellules osseuses. Ces cellules sont ensuite implantées avec ou sans différenciation préalable en culture, au contact de biomatériaux pour permettre la repousse osseuse par différenciation *in situ* de ces cellules en cellules ostéoformatrices. Cette étape d'amplification est nécessaire car plusieurs études ont montrées une formation osseuse dépendante du nombre de cellules implantées et une concentration de l'ordre de $7,5 \times 10^6$ cellules par cm^3 est nécessaire à l'ostéoformation (Mankani, Kuznetsov et al. 2007). Plusieurs études s'accordent aussi pour dire que la différenciation de ces cellules avant implantation vers un phénotype ostéogénique, (ajout dans le milieu de culture d'acide ascorbique, de dexaméthasone et de β -glycérophosphate) améliore les résultats en termes de formation osseuse (Yoshikawa, Ohgushi et al. 1996, Corre, Merceron et al. 2013, Corre, Merceron et al. 2015).

Cette ostéoformation dépendante du nombre de cellules a été à l'origine de la recherche d'autres sources de cellules ostéogéniques que la moelle osseuse. En effet depuis la découverte des CSM et de leurs propriétés, ces cellules ont été décrites au sein de nombreux tissus.

➤ Le tissu adipeux

Le tissu adipeux, plus précisément la fraction stromale vasculaire, au même titre que la moelle osseuse est une source de cellules stromales mésenchymateuses au potentiel de différenciation ostéogénique. En continuant la comparaison moelle osseuse, la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux possède plusieurs avantages :

- la proportion de CSM qui est comprise entre 1 et 10% de la FSV contre moins de 0,1% pour la moelle osseuse

- la plus faible morbidité de prélèvement du tissu adipeux par lipoaspiration vis-à-vis de la ponction de moelle.

Il est souvent fait mention d'inégalité entre les capacités de différenciations des CSM issues de la moelle osseuse (CSM-MO) ou du tissu adipeux (CSA). Selon certaines études, les CSM-MO possèderaient une capacité de différenciation ostéogénique "plus importante" que les CSA, qui à l'inverse seraient plus enclin à se différencier dans la voie adipogéniques. Ces résultats sont contradictoires à l'heure actuelle (Strioga, Viswanathan et al. 2012). Il est fort probable, qu'en plus des différences intra-individuelles, les différences de micro-environnements natifs des différentes populations de CSM influent sur les stimuli auxquels ces cellules sont sensibles. Ainsi un milieu de différenciation ostéogénique optimal pour les CSM d'un tissu sera moins efficace pour induire la même réponse sur des cellules d'un autre tissu.

➤ Autres sources de cellules souches

En plus de la moelle osseuse et du tissu adipeux qui sont les deux sources majoritairement étudiées à l'heure actuelle, des CSM isolées d'autres organes ont été utilisées en ingénierie tissulaire osseuse. Les cellules stromales mésenchymateuses de la pulpe dentaire, de la gencive, du périoste ou de l'os trabéculaire sont ses exemples (Szpalski, Barbaro et al. 2012). Dans une optique de régénération osseuse passant par le repeuplement du tissu par des cellules osseuses apportées lors de la stratégie d'ingénierie tissulaire, les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont à l'étude actuellement. Leur capacité de répondre aux signaux de différenciation mimant les étapes du développement embryonnaire les inscrit dans une stratégie d'organogenèse *in vitro* pour "Reconstruire" un tissu osseux *ex vivo* qui sera ensuite implanté en site osseux, ou bien encore pour induire leur différenciation *in situ* après implantation dans un macro-environnement favorable (Levi, Hyun et al. 2012).

➤ Sources de cellules non autologues

Enfin, en ajout de ces différentes sources cellulaires autologues classiquement étudiées, d'autres sources non-autologues sont envisagées pour la régénération osseuse, comme par exemple les cellules de sang de cordon (Kang, Ryu et al. 2012, Chen, Liu et al. 2013).

Type Cellulaire	Stade de différenciation	Potentiel en ingénierie tissulaire osseuse	Avantages	Limites
CSM de la moelle osseuse	Multipotent	Ostéogénique, Vasculogénique	Facilité d'acquisition, Très caractérisé, Potentiel de néovascularisation	Morbidité du site donneur, Faible proportion de CSM
CSM du sang de cordon	Multipotent	Ostéogénique	Capacité proliférative, Morbidité de prélèvement minimale	Peu caractérisé
CSM du tissu adipeux	Multipotent	Ostéogénique, Vasculogénique	Facilité d'acquisition et d'isolation, Très caractérisé, Abondance, Potentiel de néovascularisation	Légère morbidité du site donneur après anesthésie
Cellules endothéliales du sang de cordon	Différencié	Vasculogénique	Facilité d'acquisition, Potentiel de néovascularisation	Pas de capacité de multipotence
CSM de la pulpe dentaire	Multipotent	Ostéogénique	Disponibilité	Moins caractérisé

Tableau 14: Caractéristiques de sources cellulaires utilisées en ingénierie tissulaire osseuse (d'après Szpalski et al. Tissue Eng 2015)

d. Les adjuvants

➤ Facteurs de croissance

L'ostéoinduction des biomatériaux seuls ne suffit pas à induire la repousse osseuse dans tous les cas. Certains défauts osseux, de taille importante, en zone peu vascularisé, ou peu cellularisé nécessite l'apport d'autres facteurs ostéogéniques. Les cellules ostéoformatrices citées précédemment sont une solution intéressante mais pour l'instant la seule stratégie de reconstruction osseuse qui permet d'obtenir des résultats équivalents à une bonne prise de greffe est l'utilisation de facteur de croissance (*i.e.* BMP).

Les facteurs de croissances aux propriétés ostéoinductrices sont diverses et possèdent tous un rôle physiologique dans la formation osseuse.

L'action des **BMP** a été découverte lors de l'étude des propriétés d'ostéoinduction de la matrice osseuse déminéralisé (DBM en anglais).

Les BMP sont des protéines appartenant à la superfamille des TGF (Transforming Growth Factor), exprimés dans tous les tissus et à tous les stades du développement et à l'âge adulte. Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. L'action des BMP a lieu après liaison à des récepteurs présents sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles. Il existe plus de 30 membres dans la famille des BMP.

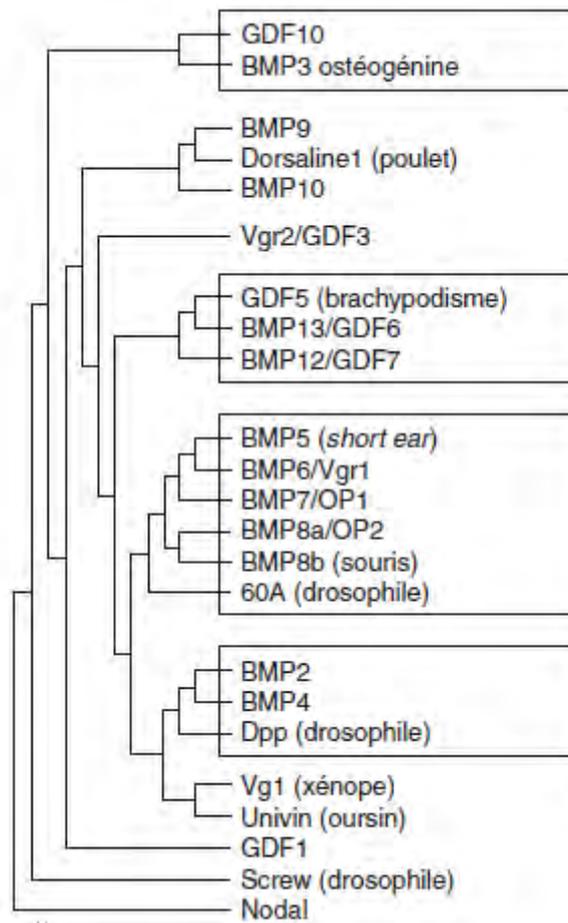


Figure 29 : Arbre phylogénétique de la famille des BMP (Sailhan et al. EMC 2010)

Le nom BMP venant de la découverte des premiers membres de cette famille de protéines, toutes les BMP ne sont pas impliquées dans la physiologie osseuse mais plutôt sur la morphogénèse de l'organisme en général. Les BMP étant impliquées dans le métabolisme osseux sont les BMP 2, 3, 3b, 4, 7, 8a, 13, 14, 16, 17.

Chez l'adulte, les BMP sont déposées dans la matrice osseuse par les ostéoblastes. Lors du remodelage osseux elles sont libérées par la matrice et sécrétées par les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes. Les BMP stimulent alors la différenciation des CSM en chondrocytes et en ostéoblastes et sont ainsi indispensables au processus de cicatrisation osseuse (Tsuji, Bandyopadhyay et al. 2006). Toutes les BMP ne sont pas pro-ostéogénique, par exemple la BMP3, présente dans la matrice osseuse et donc dans les DBM inhibe l'action ostéoinductrice des BMP2, 4, 6, 7 et 9.

Une étude en 2003 a comparé les 14 BMP identifiées chez l'homme en analysant leurs effets sur les cellules osseuses plus ou moins différenciées (Cheng, Jiang et al. 2003).

L'action des BMP sur les CSM dépend aussi d'autres facteurs environnementaux comme la tension en oxygène, et peut induire l'expression par ces cellules de marqueurs chondrogéniques et ostéogéniques selon les autres signaux transmis aux cellules (Freyria, Courtes et al. 2008).

La plupart des études montrent l'association avec des biomatériaux collagéniques qui permettent une biocompatibilité, biodégradabilité et la diffusion locale des BMP.

Toutefois, une étude publiée en 2003, (Akamaru, Suh et al. 2003) a aussi montré que l'ajout de BCP à l'éponge de collagène classiquement utilisée peut améliorer les résultats de repousse osseuse obtenus avec de la BMP2.

Plus récemment, la modification génétique de la BMP2 pour augmenter son affinité au biomatériau (collagène) a montrée de bons résultats (Chen, Lin et al. 2007). Ces données ouvrent la porte à l'utilisation de protéines modifiées pour moduler leur affinité ou encore leur demi-vie afin de moduler le phénomène de repousse osseuse à façon.

Il est aussi possible de s'affranchir du biomatériau pour délivrer le facteur de croissance en utilisant la thérapie génique par vecteurs (viraux ou non) induisant l'expression (contrôlée ou non) de la protéine d'intérêt par des cellules (préalablement isolées ou localement). Toutefois l'utilisation de ce type de procédé est plus long à mettre en place et l'intérêt, ostéoconducteur et protecteur vis-à-vis des cellules, du biomatériau est alors perdu.

Toujours parmi les BMP, il est possible de citer le **GDF-5** (growth and differentiation factor 5). Ce facteur est impliqué dans le développement de tissus cartilagineux. Son action pro-chondrogénique a été utilisée pour obtenir une ossification endochondrale dans des modèles de défauts osseux (Spiro, Liu et al. 2000, Yoshimoto, Yamamoto et al. 2006).

La liste n'est pas exhaustive et de nouvelles études paraissent chaque année sur l'utilisation de molécules ou cocktails de molécules ostéoinducteurs. Plusieurs études ont par exemple utilisé la protéine **Nel-1** (Nel-like molecule 1) (Siu, Lu et al. 2011) pour stimuler la formation osseuse.

Actuellement en clinique humaine, ce sont les BMP2 et 7 qui sont utilisées pour leurs capacités d'ostéoinduction (Lissenberg-Thunnissen, de Gorter et al. 2011).

- La BMP2 (dibotermine alfa) est commercialisée sous le nom d'INDUCTOS[®] sous forme de poudre et dont l'utilisation, une fois dissoute, est couplée à une matrice de collagène bovin de type I (éponge). Son autorisation de mise sur le marché (AMM) couvre pour le moment l'indication suivante "traitement des fractures du tibia chez l'adulte, en tant que complément au traitement standard comprenant la réduction de la fracture ouverte et la fixation par enclouage centromédullaire sans alésage" et "le traitement de la discopathie dégénérative lombaire par arthrodèse lombaire antérieure". Toutefois, l'HAS (Haute Autorité de Santé) a estimé le bénéfice (SMR : service médical rendu) de cette technique comme "faible" depuis mai 2015 alors qu'il était jugé "important" en 2003 et "modéré" en 2006. Depuis 2015, il est donc considéré comme sans avantage clinique démontré vis-à-vis de l'autogreffe dans le cadre de la "fracture ouverte du tibia" et de la "discodiscopathie dégénérative lombaire par arthrodèse lombaire antérieure". L'autorisation de mise sur le marché a donc été suspendue.

- La BMP7 (eptotermine alfa) est commercialisée sous le nom d'OSIGRAFT[®] sous forme de poudre pour suspension implantable, elle aussi couplée à une matrice de collagène bovin de type I (sous forme de granules). L'AMM prévoit son utilisation pour "le traitement de fractures non consolidées du tibia datant d'au moins 9 mois, secondaires à un traumatisme, chez des patients dont le squelette est adulte, dans les cas où un traitement antérieur par autogreffe a échoué ou quand l'utilisation d'une autogreffe est impossible" et les études ont montrées des résultats équivalents à la greffe osseuse autologue.

Les rhBMP (2 et 7), donnent donc de bons résultats cliniques et des études randomisées sont régulièrement publiées pour leurs utilisations dans de nouvelles applications

comme l'arthrodèse rachidienne (Baskin, Ryan et al. 2003, Dawson, Bae et al. 2009), ou la pseudarthrose (Anticevic, Jelic et al. 2006, Fabeck, Ghafil et al. 2006).

La toxicité de ces molécules a été évaluée lors des AMM et une clairance très rapide (quelques minutes) a été observée. Les études concernant une éventuelle réponse immunitaire par la présence d'anticorps (soit anti-BMP soit anti-collagène) n'ont pas montré d'impact clinique de la présence de ces anticorps. Dans ce contexte toutefois, l'utilisation répétée de ces procédés est à proscrire pour éviter le développement d'une auto-immunité envers les BMP endogènes.

Dans le contexte maxillo-facial, aucune BMP ne possède d'indication clinique pour le moment. Toutefois un certain nombre d'études chez l'homme ont été publiées sur le potentiel des BMP en zone cranio-faciale (Chenard, Teven et al. 2012) sur des reconstructions crâniennes, mandibulaires (Sweeny, Lancaster et al. 2012), du sinus maxillaire (Corinaldesi, Piersanti et al. 2012) et des fentes alvéolaires (Dickinson, Ashley et al. 2008, Allareddy 2014, Alonso, Risso et al. 2014).

Néanmoins, il est essentiel de noter que l'utilisation actuelle des BMP n'est pas sans limites. Ces limites sont dues aux effets secondaires induits par ces BMP de par leur nature de facteur de croissance et de par l'utilisation de dose supra-physiologiques.

Son utilisation est proscrite en cas de cancer quel qu'en soit le type du fait des interactions facteur de croissance/cellules cancéreuses, considérées comme à risque même si elles ne sont pas toujours clairement définies (Hughes, Taher et al. 2013, Kelly, Savage et al. 2014).

Deux types d'effets indésirables sont couramment reportés :

- Une ossification ectopique indésirable, provenant du potentiel ostéoinducteur des BMP et dont l'importance va dépendre du biomatériau porteur et de la vitesse de relargage du facteur de croissance (Boerckel, Kolambkar et al. 2011).
- Une inflammation locale et un œdème au niveau du site d'implantation.

➤ Les dérivés plaquettaires

L'engouement pour les dérivés plaquettaires tels que les PRP et les PRF pour l'ingénierie tissulaire osseuse repose sur 2 propriétés distinctes de ceux-ci.

- Premièrement, comme expliqué précédemment les PRP/F peuvent se présenter sous forme de gels, permettant d'avoir une action mécanique qui vise à maintenir une cohésion au niveau des biomatériaux et cellules au moment de l'implantation. Ces gels se dégradent ensuite avec une cinétique variable de l'ordre de quelques jours.
- Deuxièmement l'activation de ces concentrés plaquettaires par une source de calcium ou au contact du collagène sur le site d'implantation permet le relargage par les plaquettes d'un certain nombre de facteurs de croissance. La sécrétion de TGF- β est très connue pour stimuler la prolifération des CSM. L'effet ostéoinducteur des facteurs relargués par les PRP n'a pas été démontré mais l'effet pro-angiogénique (Kakudo, Morimoto et al. 2015) de ceux-ci est évident et permet l'invasion vasculaire au niveau du défaut osseux. Cette formation de nouveaux vaisseaux sanguins permet un apport en oxygène nécessaire à la survie des cellules implantées mais est aussi une étape essentielle dans le processus de cicatrisation osseuse.

e. Les modèles d'étude d'ingénierie tissulaire osseuse

Différents facteurs vont influencer les résultats obtenus avec un procédé d'ingénierie tissulaire osseuse : l'espèce animale, le site d'implantation, la procédure d'implantation et le délai d'étude.

De manière générale, les études avec des petits animaux (rongeurs) conduisent à une formation plus lente que chez les animaux plus larges (chien, brebis, porc). En plus d'une ostéoinduction plus rapide, une quantité plus importante d'os est retrouvée dans les études sur ces grands modèles (Yang, Yuan et al. 1996).

Pour exemple, dans la revue de Barradas publiée en 2011 (Barradas, Yuan et al. 2011), sur les 51 études reportant des capacités ostéoinductrices sur les phosphates de calcium, seules 10 ont été faite chez des rongeurs.

Malgré cette affirmation, la recherche de nouveaux procédés d'ingénierie tissulaire osseuse passe très souvent par une première étape de validation dans des modèles murins (rat ou souris) pour des raisons évidentes de coût/taille des défauts à combler. Ces espèces permettent aussi d'étudier les procédés d'ingénierie utilisant des cellules humaines grâce à des souches animales immunotolérantes. Enfin, les modèles de rongeurs permettent de nombreuses techniques d'analyses adaptés à la fois au niveau de l'imagerie petit animal que des techniques biochimiques utilisant de nombreux anticorps développés pour les rongeurs.

Dans le contexte osseux maxillo-facial, les modèles sont très souvent communs au rat et à la souris :

- Modèles ectopiques : sous-cutanée, intra-musculaire, inter-musculaire
- Modèles orthotopiques (en site osseux) : calvaria, défaut mandibulaire

f. La survie et le suivi des cellules

Lorsqu'il est question d'ingénierie tissulaire osseuse, de nombreuses questions restent en suspens : Quel biomatériau utilisé ? Quelles cellules ? Pour quelles applications ? Comment amener les cellules sur le site ? Quel est l'avenir de ces cellules implantées ?

Cette dernière question va dépendre des cellules utilisées. Les stratégies utilisant des CSM pré-différenciées implantées en site osseux visent à faire de ces cellules les ostéoblastes du tissu osseux à reformer (au moins dans un premier temps). Les stratégies utilisant des facteurs pro-ostéo/angiogéniques ou des cellules transformées génétiquement pour exprimer un facteur de croissance reposent sur la capacité de ces cellules à sécréter des facteurs stimulant les cellules de l'hôte à reformer un tissu osseux (recrutement de cellules ostéocompétantes, néovascularisation du défaut, différenciation de cellules progénitrices hôtes).

Ces deux paradigmes reposent sur la survie et le maintien des cellules au niveau du défaut, au moins à court terme, pour permettre à ces cellules implantées de remplir leur(s) rôle(s).

D'un autre côté l'autogreffe osseuse selon sa taille et la zone receveuse conduit à la mort d'une partie des cellules du greffon par ischémie, et la matrice subit alors un remodelage après colonisation par les cellules de l'hôte.

Plusieurs études ont donc tenté de répondre à la question du devenir des cellules après implantation ou même injection systémique. La plupart de ces études ont été faites à partir des CSM de différentes espèces implantées dans des rongeurs en sous-cutanée ou en site osseux.

- En implantation locale (site osseux ou sous-cutané) :

De manière générale, les études publiées dans la littérature sur la survie de CSM implantées suggèrent que la survie dépend de très nombreux paramètres : de l'espèce donneuse, de l'espèce receveuse, du modèle, du biomatériau, de la taille de l'implant d'ingénierie...

En 2010 Geuze (Geuze, Prins et al. 2010) implante des CSM-MO de chèvre exprimant la luciférase. Après implantation en sous-cutanée ou en site vertébral chez le rat, il y a une augmentation du signal de luminescence durant la première semaine puis le signal décroît rapidement dans le mois qui suit. Chez la souris au contraire, le signal décroît moins rapidement et il reste des cellules durant les 7 semaines de l'étude. Une formation osseuse

n'est présente qu'au niveau des animaux qui montrent la présence des cellules sur toute la durée de l'étude. Cette étude suggère que **la survie des cellules est nécessaire à la formation osseuse**, au moins en site ectopique. De plus, des cellules irradiées ayant une capacité proliférative diminuée n'induisent pas de formation osseuse, **suggérant la nécessité d'une prolifération des CSM** implantées. Ces résultats sur ces cellules irradiées sont les mêmes dans l'étude d'Olivo (Olivo, Alblas et al. 2008).

En 2012, dans l'étude de Prins (Prins, Fernandes et al. 2012), des CSM-MO de chèvre et humaines marquées sont implantées en sous-cutanée de souris. La même augmentation de signal est retrouvée pour les CSM-MO de chèvre avec ensuite une diminution qui ne décline pas sous les 60% suggérant une survie d'une majorité des cellules. Toutefois, les CSM-MO humaines dans le même modèle voient leur signal diminuer sur toute la durée de l'étude jusqu'à 25% du signal de base. Ces résultats impliquent **des différences de prolifération et de survie des cellules selon les espèces**. De plus, selon le biomatériau utilisé, la distribution spatiale des cellules mais aussi la formation osseuse varie (entre le TCP et l'HA). En sous-cutané toujours, en 2012, Becquart montre une mort massive des CSM-MO humaine implantées avec du corail qui meurent par ischémie dès 6 jours, avec une mort prédominante des cellules au centre de l'implant (Becquart, Cambon-Binder et al. 2012).

En plus des différences entre les espèces, **la source de CSM peut influencer sur la survie des cellules** après implantation en site osseux. En effet, dans l'étude de Dégano en 2007, les CSM-MO humaines implantées en calvaria de souris nude semblent être présentes en plus grande quantité après 3 mois que les CSA humaines (Dégano, Vilalta et al. 2008).

Concernant la survie des cellules en rapport avec une réponse immunitaire de l'hôte, l'étude de Liu en 2011, montre qu'en contexte allogénique chez la souris, les lymphocytes Th1 de l'hôte induisent la mort des cellules implantées (Liu, Wang et al. 2011). L'étude de Bouvet-Gerbetaz observe les mêmes effets de l'implantation sous-cutanée de CSM-MO de souris C57BL/6 en syngénique ou dans des souris nude en association avec des BCP. Alors que l'implantation en souris nude (immunotolérantes) permet la formation d'un tissu osseux minéralisé, l'implantation en souris immunocompétentes donne lieu à la formation d'un tissu osseux immature. Au sein de ce tissu, se retrouve beaucoup de cellules géantes multinuclées, des cellules qui survivent moins longtemps et un profil ARN proche de celui retrouvé lors d'une inflammation chronique. Ces études démontrent que la **mort des cellules implantées suite à une réaction immunitaire (médiée par les lymphocytes T de l'hôte) est défavorable pour la formation osseuse** via ces cellules (Bouvet-Gerbetaz, Boukhechba et al. 2014). De plus, dans une étude de 2013, Chatterjea utilise des CSM allogéniques ou

syngéniques, associées à des BCP et prédifférenciées dans la voie ostéogénique chez le rat. En utilisant un immunosuppresseur la formation osseuse des cellules allogéniques retrouve un potentiel équivalent aux cellules syngéniques en inhibant le recrutement de lymphocytes B et T (Chatterjea, LaPointe et al. 2013).

- En administration systémique :

Le potentiel des CSM ou de la FSV à migrer sur un site de lésion osseuse suite à une injection systémique reste sujet à discussion. Là encore il est possible que cela dépende à la fois des sources cellulaires (*i.e.* : capacité à répondre aux signaux de recrutement) et des modèles de lésion osseuse (*i.e.* : capacité des cellules présentes au niveau de la lésion d'induire un homing de cellules du sang).

Dans l'étude d'EGgenhofer, les CSM-MO de souris injectées en intraveineuse, se retrouvent majoritairement dans les poumons dès l'heure qui suit l'injection. L'induction d'une lésion d'ischémie/reperfusion dans le foie n'induit pas la migration de ces cellules (EGgenhofer, Benseler et al. 2012).

Dans l'étude de Levi, des CSA de souris ou humaines sont injectées en intraveineuses à la suite de la création d'un défaut de calvaria. Après 2 heures, les cellules sont aussi présentes au niveau des poumons, toutefois **après 4 jours, les cellules migrent vers la calvaria**. De plus, les CSA humaines (et non celles de souris) permettent un début de repousse osseuse après 4 semaines (Levi, James et al. 2011).

- Nécessité d'un signal lésionnel :

Il existe donc un mécanisme de migration des cellules injectées dans la circulation vers un site de lésion osseuse. La même équipe, la même année a testé l'implantation de biomatériau+cellules :

- au moment de la création d'un défaut de calvaria
- 8 semaines après la création d'un défaut de calvaria

Leurs résultats montrent qu'un signal de lésion présent dans le défaut "frais" mais pas dans le défaut "établi" permet la repousse osseuse avec l'association de CSA et de PLGA (60% de régénération contre 30% à 8 semaines). Ce principe, s'il se confirme pour d'autres types de défauts et de stratégies d'ITO, est très important car dans la majorité des cas cliniques, c'est la situation du défaut établi qui est présente. Les auteurs proposent alors de trouver un moyen de mimer ce signal de lésion avec par exemple du PRP (Levi, James et al. 2011).

Sur ce dernier point, il ne faut pas confondre :

- une inflammation prolongée induite par le rejet d'un corps étranger (par exemple les cellules implantées) et retrouvée dans des pathologies osseuses telles que l'arthrite rhumatoïde
- une inflammation plus contrôlée qui a lieu lors des phénomènes de fractures et qui sont nécessaires au recrutement des cellules qui vont régénérer l'os (Mountziaris and Mikos 2008).

Le premier phénomène est délétère pour la formation osseuse (Liu, Wang et al. 2011). Dans un contexte non autologue d'implantation de CSM par exemple, la sécrétion de $TNF\alpha$ et d' $IFN\gamma$ par les lymphocytes Th1 va induire la mort des cellules implantées. L'inhibition de ce phénomène par des anti-inflammatoires améliore la survie des cellules et la formation osseuse.

D'un autre côté, l'inflammation consécutive à une fracture entraîne aussi la sécrétion de $TNF\alpha$ par des cellules immunitaires mais induit un signal chimiotactique 24h après la lésion et accélère la formation osseuse 2 semaines plus tard.

Un contrôle de sécrétion des différentes cytokines inflammatoires, ($TNF\alpha$, IL-1 et IL-6) aux bonnes concentrations et aux bonnes périodes, plutôt qu'une inhibition totale de leur sécrétion, permettraient éventuellement une meilleure stimulation de la repousse osseuse.

En parallèle, la survie des cellules implantées (le plus souvent en situation d'ischémie) est nécessaire à leur sécrétion/différenciation. Dans ce but, différentes équipes tentent d'améliorer ce paramètre en augmentant *via* le biomatériau l'apport en nutriment (apport de glucose par exemple) (Deschepper, Manassero et al. 2013) ou en oxygène (transporteur d'oxygène par exemple).

En conclusion, de nombreux paramètres rentrent en compte dans la survie et la capacité des cellules implantées à permettre une formation osseuse : la diffusion de l'oxygène et des nutriments, le pH, le type cellulaire, les contraintes mécaniques, le biomatériau utilisé (vitesse de résorption, porosité, résistance mécanique)...

- Concernant les stratégies d'ingénierie tissulaire utilisant des CSM, leur rôle principal semble être de survivre et de se différencier en cellules osseuses. Ainsi la survie des cellules est ici indispensable. En addition, il semble qu'un signal aigu de dégâts tissulaire soit nécessaire à ces CSM implantées pour remplir leur rôle régénératif.

- Concernant les stratégies reposant sur d'autres sources cellulaires ou sur des cocktails cellulaires, la part du rôle sécrétoire, du rôle de la différenciation et du rôle global de la survie des cellules à long terme n'est pas encore claire.

Une étude avec de la FSV marquée GFP implantée en combinaison avec un lipotransfert chez la souris semble montré qu'il y a ici aussi un effet de différenciation avec une intégration des cellules dans le tissu adipeux (différenciées en adipocytes) et dans les vaisseaux (différenciées en cellules endothéliales) (Fu, Luan et al. 2013). Toutefois dans cette même étude il y a aussi une perte massive des cellules implantées avec seulement 17% du signal retrouvé à 56 jours, et donc très peu de cellules implantées parmi les nouveaux adipocytes.

Parallèlement à la différenciation des CSA, le potentiel paracrine d'une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse n'est pas à exclure puisque des molécules telles que la simvastatine peut induire le recrutement de progéniteurs endothéliaux et osseux et promouvoir la vasculo-ostéogénèse en site osseux (Yueyi, Xiaoguang et al. 2013).

g. *L'engouement vasculo-ostéogénique*

Dans le but d'améliorer les résultats de formation osseuse avec les stratégies d'ITO un nouveau concept est à l'étude depuis quelques années (Liu, Chan et al. 2015). Ce concept vise à promouvoir la survie des cellules au contact du biomatériau en améliorant la vascularisation de l'association biomatériau/cellules.

L'idée est de permettre une vascularisation rapide du greffon biomatériau/cellules afin de :

- Permettre la survie des cellules implantées (apports d'oxygène et de nutriment)
- Permettre le recrutement de cellules (cellules inflammatoires et progéniteurs osseux) mimant ainsi le début de la phase de cicatrisation osseuse.

Ajout de facteurs pro-angiogénique :

Ainsi en 2006, Kaigler et son équipe obtenaient une amélioration de l'angiogenèse et la régénération osseuse dans un modèle de calvaria irradiée. Après 6 semaines d'implantation, le biomatériau (PLGA) délivrant le facteur pro-angiogénique VEGF régénère presque 50% de défaut contre 30% avec le biomatériau seul. Ces résultats confirment **l'importance de la vascularisation dans le traitement des défauts osseux hypotrophiques** (Kaigler, Wang et al. 2006).

Les facteurs pro-angiogéniques, vont stimuler la régénération osseuse *via* le recrutement de CSM, la différenciation ostéoblastique et la migration et la prolifération des cellules souches. La vascularisation étant une étape essentielle de la formation osseuse, de nombreuses études ont tenté de stimuler la repousse osseuse par l'utilisation de ces facteurs.

Ceux-ci peuvent être délivrés de différentes façons :

- *via* des biomatériaux (par encapsulation, par liaison covalentes ou d'affinité)
- *via* des cellules (transduites ou simplement activées pour sécréter le facteur voulu).

Le tableau suivant résume les principaux facteurs pro-angiogéniques à l'étude pour des applications en régénération osseuse à l'heure actuelle (Almubarak, Nethercott et al. 2015).

Facteur de croissance	Rôle dans l'angiogenèse	Effets ostéogénique
<i>PIGF (Placental Growth Factor)</i>	Recrutement de cellules inflammatoires Prolifération et différenciation des MSC en cellules osseuses	Module la formation et remodelage osseux
<i>IGF (Insulin-like Growth Factor)</i>	Promeut la néovascularisation Permet l'hypertrophie des chondrocytes	Régule la maturation des chondrocytes Médie la réponse squelettique à la PTH (parathyroid hormone) Module la mecanosensibilité de l'os
<i>SHH (Sonic Hedgehog)</i>	Prolifération et différenciation des CSM-MO dans la lignée ostéoblastique	Induit l'expression des marqueurs de différenciation ostéogénique, la minéralisation
<i>VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)</i>	Invasion vasculaire Recrutement de cellules souches	Rôle dans l'ossification endochondrale et intramembranaire
<i>FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)</i>	Angiogenèse Prolifération des CSM et ostéoprogéniteurs	Augmente la densité minérale et la stabilité mécanique du cal osseux en cas de cicatrisation
<i>Ang-1 (Angiopoietin 1)</i>	Remodelage et maturation des vaisseaux sanguins	
<i>PDGF (Platelet Derived Growth Factor)</i>	Facteur chimiotactique pour les ostéoblastes Stimule la prolifération des ostéoprogéniteurs Augmente l'expression du VEGF par les cellules endothéliales	Augmente la densité osseuse la résistance aux contraintes mécaniques Augmente la taille et la densité du cal osseux en cas de cicatrisation

Tableau 15: Principaux facteurs de croissances angiogéniques à l'étude pour la régénération osseuse (d'après Almubarak et al. Bone 2016)

Ajouts de facteurs ostéogéniques et pro-angiogéniques :

Dans la même optique, certaines équipes ont fait exprimer des facteurs de croissances ostéogéniques et angiogéniques à des CSM (Kumar, Wan et al. 2010, Zhang, Wang et al. 2010). Cette approche utilise des vecteurs viraux (souvent virus adéno-associés : AAV en anglais) pour transduire les cellules. Cette approche dans un modèle de défaut tibial segmentaire chez la souris a montré un effet synergique de l'expression de BMP2 et VEGF. En effet les cellules transduites pour les 2 facteurs forment plus de vaisseaux et ont une meilleure repousse osseuse que celles exprimant la BMP2 ou le VEGF séparément (Kumar, Wan et al. 2010). Une approche similaire dans un défaut de membre ischémique (artère ligaturée) avec injection musculaire de CSM transduites pour exprimer la BMP7 humaine et le VEGF humain obtient la même synergie au niveau de la formation de capillaires, de flux sanguin et de modules minéralisés (Zhang, Wang et al. 2010). Dans cette même étude, les cellules exprimant aussi la GFP sont détectées sur la durée de 8 semaines avec une augmentation du signal entre 1 et 4 semaines suggérant une prolifération de ces cellules.

Cultures de cellules avec un potentiel vasculo-ostéogénique :

Une autre approche vise à combiner plusieurs types cellulaires dans une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse afin d'obtenir ce potentiel à la fois vasculogénique et ostéogénique. Dans un modèle de défaut diaphysaire fémoral de rat, des CSM humaines et des progéniteurs endothéliaux humains (isolés des cellules du sang périphérique) ont été implantés en combinaison avec du β -TCP. Après 1 semaine, les cellules humaines sont présentes et la formation de vaisseaux est plus importante dans la condition de co-implantation par rapport à une greffe osseuse autologue (Seebach, Henrich et al. 2012).

Dans un modèle de calvaria de rat nude, modèle très stringent pour la repousse osseuse, une légère formation osseuse a été obtenue après implantation de CSA humaines co-cultivées avec des cellules endothéliales de sang de cordon humain combinés avec fibres de titane (Ma, Both et al. 2014). Le même modèle a été utilisé pour tester l'implantation de CSA humaines source cellulaire unique mais cultivées dans un milieu de co-différenciation ostéo et vasculogénique. Ici encore une formation osseuse est observée après 3 semaines seulement (Gardin, Bressan et al. 2012).

Ces études suggèrent un effet bénéfique ce concept vasculo-ostéogénique dans un modèle de défaut osseux maxillo-faciale hypotrophique.

Sources cellulaires utilisées pour la coculture vasculo-ostéogénique

<i>Sources cellulaires ostéogéniques</i>	Ostéoblastes Ostéoprogéniteurs du périoste CSM de différents tissus ES (Cellules souches embryonnaires) iPS (cellules pluripotentes induites)
<i>Sources cellulaires vasculogéniques</i>	Progéniteurs endothéliaux du sang périphérique (PB-EPC) Cellules endothéliales de sang de cordon (HUVEC) ES (Cellules souches embryonnaires) iPS (cellules pluripotentes induites)

Tableau 16: Exemples de sources cellulaires envisagées pour la co-culture dans le contexte vasculo-ostéogénique (d'après Liu et al. *J Tissue Eng Regen Med* 2015)

Dans le contexte précédemment décrit d'atteinte osseuse maxillo-faciale, il n'existe pour le moment aucune alternative clinique au recours de la greffe osseuse. C'est pourquoi le laboratoire INSERM U791 cherche à développer des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse pour répondre à cette problématique.

Cette recherche passe par le développement de biomatériaux/substituts osseux pouvant supporter la repousse osseuse. C'est le cas des phosphates de calcium biphasé (BCP) mélange d'HA et de β -TCP, développés dans l'unité depuis plusieurs dizaines d'années et avec des utilisations cliniques.

Les granules de BCP sont utilisés en chirurgie orthopédique (arthrodèse, fractures osseuses non portantes, reprise de prothèse de hanche), en implantologie (augmentation alvéolaire et de crête alvéolaire et élévation sinusienne) et en parodontologie (comblement de défauts intra-osseux).

Le deuxième élément de cette recherche concerne l'étude des sources cellulaires ostéocompétentes. Devant cette nécessité d'apporter à la fois un stimulus **ostéogénique** (*via* le biomatériau, les facteurs de croissance et les cellules) et un stimulus **angiogénique** (*via* les cellules ou les facteurs de croissance), la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux humain apparaît comme une source cellulaire intéressante d'ingénierie tissulaire osseuse.

En effet comme décrit dans le paragraphe précédent, le potentiel vasculo-ostéogénique des cellules peut améliorer la néovascularisation et la repousse osseuse d'un défaut osseux. Et la FSV possède ce potentiel de par :

- La présence de CSM au potentiel de différenciation ostéogénique (Zuk, Zhu et al. 2001)
- La sécrétion d'un certains nombres de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF (Schubert, Xhema et al. 2011)

De précédentes études ont montré que l'association moelle osseuse totale ou les CSM de moelle pré-différenciées avec des granules de BCP induit une forte repousse osseuse en sous-cutané et en défaut de calvaria (Corre, Merceron et al. 2013, Corre, Merceron et al. 2015). Enfin, comme détaillé auparavant, la fraction stromale vasculaire possède des caractéristiques communes à la moelle osseuse (source cellulaire mixte contenant des CSM et un fort potentiel angiogénique) tout en étant prélevable en plus grande quantité et avec un traumatisme moindre.

C'est pourquoi l'association de granules de BCP à de la fraction stromale vasculaire humaine a retenu notre attention pour développer une nouvelle stratégie intra-opératoire de régénération osseuse maxillo-faciale en alternative à la greffe osseuse.

Notre première étude a été réalisée dans l'optique de replacer le potentiel de la FSV humaine par rapport aux autres techniques intra-opératoire d'ingénierie tissulaire osseuse et par rapport au gold standard actuel, la greffe osseuse.

Ainsi dans un modèle immunotolérant de rat nude, l'association de biomatériaux osseux, les BCP, avec la FSV humaine et été pour la première fois comparée à :

- l'association de Moelle Osseuse humaine et de BCP
- et à la greffe osseuse humaine

pour leur capacité à régénérer un défaut critique de calvaria (modèle orthotopique de défaut osseux maxillo-facial).

L'utilisation de cellules d'origines humaine a été choisie ici pour sa pertinence clinique. La cellularité et la proportion des différents types cellulaires au sein de la FSV est en effet variable selon les espèces. Cette étude a fait l'objet d'une publication.

B. Article: Comparing “intra operative” tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. A nude rat study.

Abstract

Background: In craniofacial reconstruction, the gold standard procedure for bone regeneration is the autologous bone graft. However, this procedure requires bone harvesting which is still a source of morbidity. Bone substitutes, such as biphasic calcium phosphate (BCP), represent an interesting alternative but they are not sufficient for bone healing in hypoplastic bone conditions. In such conditions, osteoprogenitors are essential to provide osteoinductive properties to the bone substitute. Previous animal’s studies have shown that BCP associated with total bone marrow (TBM) provides same bone reconstruction as bone graft in an autologous rat model of calvaria defect. Furthermore, stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue seems to be another promising source of osteoprogenitor cells which can be used intra-operatively. This study aimed to combine, for the first time, intra-operative BCP-based bone tissue engineering strategies with human sources of TBM and SVF.

Methods: Two symmetrical 5-mm critical size calvaria defects were performed in female nude rat. The defects were left empty or filled with intra-operative bone tissue engineering procedures: (1) BCP alone, (2) Human Bone Graft (hBG), (3) human Total Bone Marrow (hTBM) + BCP, (4) human Stromal Vascular Fraction (hSVF) + BCP, (5) rat Total Bone Marrow (rat TBM) + BCP. Animals were sacrificed 8 weeks after implantation. The calvaria specimens were processed for histological and radiological examinations (SEM and micro-CT). Implanted cells were labelled with a fluorochrome CM-DIL.

Results: Micro-CT analysis revealed partial repair of bone defect. Only hBG significantly succeeded in healing the calvaria defect (43.1%). However, low rate of newly formed bone tissue was observed in all tissue engineering conditions (hTBM, hSVF, rat TBM).

Discussion: The lack of high bone formation observed in the present study could possibly be attributed to the nude rat calvaria model. These results require further studies, possibly on different model like humanized rodent or in clinical trial.

Keywords: Tissue engineering, Bone marrow, Stromal Vascular Fraction, Biomaterials, Craniofacial surgery, Nude rat

Article: Comparing “intra operative” tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. A nude rat study.

Original article: Comparing “intra operative” tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. A nude rat study.

Grimaud F^{±1,2,3,4} and Hivernaud V^{±1,2,3,5}, Guicheux J^{1,2,3,4}, Portron S^{1,2,3}, Pace R^{1,2,3}, Pilet P^{1,2,3,4}, Sourice S^{1,2,3}, Wuillem S⁶, Longis J⁴, Roche R⁵, Espitalier F^{1,2,3,4}, Weiss P^{†1,2,3,4} and Corre P^{†1,2,3,4}

¹ INSERM, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, F-44042, France

² Université de Nantes, UMR-S 791, LIOAD, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

³ ONIRIS, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, F-44307, France

⁴ CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, F-44042, France

⁵ STEMCIS SAS, Cyclotron, 2 rue Maxime Rivière, Sainte Clotilde, 97490, La Réunion, France

⁶ CHU Nantes, Laboratoire d’Hématologie, Nantes, F-44042, France

^{±/†} authors contributed equally

Abstract

Background: In craniofacial reconstruction, the gold standard procedure for bone regeneration is the autologous bone graft (BG). However, this procedure requiring bone harvesting is a source of morbidity. Bone substitutes, such as biphasic-calcium-phosphate (BCP), represent an interesting alternative but are not sufficient for bone healing in hypoplastic conditions. In such conditions, osteoprogenitors are essential to provide osteoinduction. Previous studies have shown that BCP associated with total bone marrow (TBM) provides same bone reconstruction as bone graft in a rat model of calvaria defect. Furthermore, adipose tissue stromal vascular fraction (SVF) seems to be another promising source of osteoprogenitor cells that can be used intra-operatively. This study aimed to combine, intra-operative BCP-based bone tissue engineering strategies with TBM or SVF from human sources.

Methods: 5mm critical-size calvaria defects were performed in nude rat. The defects were filled with intra-operative bone tissue engineering procedures: human BG, human TBM+BCP, human SVF+BCP and, rat TBM+BCP. Animals were sacrificed 8 weeks after implantation and calvaria were processed for histological and radiological examinations. Implanted cells were labelled with a fluorochrome.

Results: Micro-CT analysis revealed partial repair of bone defect. Only hBG significantly succeeded in healing the defect (43.1%). However, low rate of newly formed bone tissue was observed in all tissue engineering conditions (hTBM, hSVF, ratTBM).

Discussion: The lack of bone formation observed in this study could possibly be attributed to the model.

Conclusion: This study combined with a literature analysis show the stringency of the nude rat calvaria model in term of bone regeneration.

Keywords: Tissue engineering, Bone marrow, Stromal Vascular Fraction, Craniofacial surgery, Nude rat

1 **Introduction**

2 Malformations such as facial syndromes, tumors, and facial trauma are clinical situations
3 which may require bone tissue repair at some time in their care. Autologous bone grafting
4 (BG) is considered as the reference procedure [1,2]. However, autologous bone grafting
5 requires bone harvesting which is still a source of morbidity such as pain or scarring.

6 For several years, researchers and clinicians have been trying to find an alternative solution to
7 bone grafting with less morbidity. Bone substitutes represent an interesting alternative to
8 autologous bone grafting, mainly in implantology [3] and orthopedic surgery [4]. Among
9 bone substitutes, Biphasic Calcium Phosphate (BCP) has been of particular interest due to its
10 chemical composition and mechanical properties [5,6]. The results are generally excellent
11 when the recipient site offers good healing conditions [7] which include a small size bone
12 defect, a large blood supply, a rich marrow environment, and adequate skin or mucosa
13 coverage. In contrast, a poorly vascularized recipient site, scarring, hypoplastic or irradiated
14 tissue, will significantly increase the risk of failure [8].

15 In situations with less than ideal conditions, the osteoconductive properties of BCP are not
16 sufficient to allow a complete healing of the defects. It is thus essential to combine
17 osteoprogenitor cells or osteoinductive molecules with the biomaterial to increase its healing
18 capacity. Mesenchymal Stem Cells (MSC), isolated from several tissues including bone
19 marrow and adipose tissue, have repeatedly shown their interest in bone tissue engineering
20 [9–14]. Among MSC based strategies, seeding the surface of the biomaterial with pre-
21 committed MSCs [15,16] followed by a three-dimensional culture, has shown interesting
22 results both in animal and human models. Nevertheless, this method is complex, has a
23 significant cost, and raises the risk of possible infection during the *in vitro* amplification. In
24 light of these data, and considering the clinical need to substantially simplify potential
25 procedures (i.e., remove *in vitro* culture steps), researchers aimed to develop strategies based

26 on an intra-operative combination of BCP and osteoprogenitors. In a recent study, we have
27 shown that the extemporaneous combination of total fresh rat bone marrow (rat TBM) and
28 BCP yielded results comparable to those obtained with complex MSC based strategies in rat
29 calvaria defects [17].

30 Adipose tissue is another source of osteoprogenitor cells. Like TBM, adipose tissue can be
31 harvested through a simple puncture and can be used extemporaneously, reducing strain on
32 the patient and the surgeon. Numerous studies [18–20] have been conducted on the osteogenic
33 potential of the adipose tissue Stromal Vascular Fraction (SVF), but only few have included
34 BCP in association [21,22].

35

36 It seems now essential to assess the bone regenerating potential of tissue engineering
37 techniques in a clinical context. In order to identify whether intra-operative tissue engineering
38 strategies could be a real alternative to the clinical gold standard, for the first time, this study
39 compared the association of BCP and TBM or SVF from human origin with human bone
40 graft. Those strategies were compared to previously described rat TBM based strategy in a
41 maxillofacial defect of nude rat calvaria.

42

43

44 **Materials and methods**

45

46 Ceramic particles

47

48 Biphasic calcium phosphate particles made of hydroxyapatite (20%) and beta-tri-calcium
49 phosphate (80%) with a size range of 500-1000 μ m (MBCP+TM) were provided by
50 Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France). Eppendorf tubes (Corning, New York, USA)
51 each containing 0.015g of granules were double packaged and steam sterilized at 121°C for
52 20min before implantation. This granulometry was chosen due to its current use in human
53 clinical practice.

54

55 Animals

56

57 The study was performed on eight-week old female nude rats (n=18), provided by a certified
58 breeding center (Charles River, l'Arbresle, France). In accordance with European Directive
59 86/609/CEE for conducting animal experiments, animal care was provided by the Department
60 of Experimental Therapeutics Unit in the University Hospital of Nantes, France. The Ethics
61 Committee of the Nantes University Hospital reviewed and approved the study design (CEEA
62 2012-250). The animals were acclimatized for one week to the conditions of the local
63 vivarium which was maintained at 24°C and given a 12h/12h light dark cycle. Two female
64 Lewis 1-A rats aged of 7 weeks from the same center were specially designed as rat TBM and
65 BM-MSCs donors.

66

67 Total Bone Marrow and Bone Graft harvesting

68

69 *Rat Total Bone Marrow*

70

71 Two Lewis-1-A rats were anesthetized using inhaled isoflurane (Foren; Abott, Rungis,
72 France) and sacrificed *via* intracardiac overdose of sodium thiopental (Nesdonal; Rhône-
73 Merieux, Lyon, France). Rat TBM was isolated from femurs and tibias for extemporaneous
74 grafting and rat BM-MSC isolation. Briefly, the ends of each bone were cut, and 1mL of rat
75 TBM, mixed with saline, was obtained through an intramedullary bone flush procedure
76 performed with a 26-gauge needle and alpha modified Eagle's medium (α -MEM) (Gibco-
77 Invitrogen Corporation, Saint-Aubin, France). After pooling, half of the rat TBM was used for
78 rat BM-MSC isolation and culture; the other half was seeded on BCP granules 30 minutes
79 before implantation.

80

81 *Human Total Bone Marrow and Bone Graft*

82

83 Human TBM and BG used in this study came from surgical waste following iliac bone
84 grafting in a 20 years old aged male patient presenting with cleft lip and palate sequel. The
85 tissues were obtained according to Nantes Hospital's biological tissue management protocol,
86 after information and obtaining the writing agreement of the patient. Collection and
87 implantation of the hTBM and hBG were performed the same day. A part of the hTBM was
88 used for the isolation of hBM-MSCs. Cytology and myelography were performed on this
89 bone marrow.

90

91 *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

92

93 A portion of the harvested bone marrow from rat and human sources was filtered through a
94 70µm nylon mesh filter. The TBM was then seeded in tissue cultured treated polystyrene
95 flasks (Corning, Schiphol-Rijk, Netherlands), and BM-MSCs were isolated based on their
96 adherence capacity after 24h. Cells were then cultured in proliferative medium (PM₁). Cells
97 were seeded at each passage at 5.10³ cells/cm . The proliferative medium PM₁ was composed
98 of α-MEM supplemented with 2mM L-Glutamine, 100U/ml Penicillin/streptomycin and 10%
99 Fetal Bovine Serum (FBS). BM-MSCs were subsequently incubated at 37°C in a humidified
100 atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Medium was renewed twice a week until the cells
101 were 80-90% confluent. Cells were then harvested enzymatically from the plastic by an
102 incubation of 4 minutes at 37°C with 0.25% trypsin Ethylenediaminetetraacetic acid mixture
103 (Invitrogen Corporation, Saint-Aubin, France) and counted using a Malassez hemocytometer
104 and trypan blue exclusion dye. All cells were characterized at the 3rd passage.

105

106 Human Stromal Vascular Fraction

107

108 Adipose tissue used in this study came from surgical waste following a liposuction procedure.
109 Human SVF cells were isolated by collagenase digestion of lipoaspirate obtained from a
110 patient undergoing liposuction as previously described [23]. All patients had given their
111 informed consent. All protocols were approved by the French National Ethics Committee.
112 Briefly, lipoaspirates were digested for 1h at 37°C with collagenase (NB4; Serva, Heidelberg,
113 Germany). Digested tissue was then centrifuged at 900g for 4min, and the cell pellet (stromal
114 vascular fraction) was washed three times with Ringer Lactate (B Braun Medical), and
115 filtered through a 100µm Steriflip filter (Millipore, Molsheim, France). After centrifugation,
116 cells were resuspended in a saline solution (Ringer Lactate). Cell number and viability were
117 assessed by cell counting and Trypan blue dye exclusion (Trypan solution 0.02%; Sigma-

118 Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were then suspended in Dulbecco's
119 Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen Corporation, Saint-Aubin, France)
120 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
121 Germany) and 1% antibiotic (Penicillin/Streptomycin, Life Technologies) and seeded on BCP
122 granules at 18×10^6 cells/cm³ corresponding to 3×10^5 cells/mg of BCP.

123

124 To characterize the human SVF (hSVF), a portion of cells was isolated after 24h of plastic
125 adherence. The non-adhered cells were removed leaving only the attached cells from the
126 hSVF. This population contained adipose derived human stem cells (hASCs). These cells
127 were amplified until the third passage in proliferative medium (PM₂). For hASCs, the PM₂
128 was made of DMEM medium, 100U/ml Penicillin/streptomycin and 10% FBS (PAN-Biotech
129 GmbH, Aidenbach, Germany).

130

131 Osteogenic differentiation

132

133 To demonstrate the *in vitro* osteogenic differentiation of MSCs from human adipose tissue
134 and human and murine bone marrow, cells were seeded, at 3rd passage, at a density of 1×10^4
135 cells/cm² and grown in the presence of either proliferative medium (PM) or osteogenic
136 medium (OM) for 28 days. OM was composed of PM supplemented with 10mM β -
137 glycerophosphate (Calbiochem, Darnstadt, Germany), 0.2mM sodium L-ascorbate (Sigma-
138 Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 0.1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, Saint-
139 Quentin Fallavier, France). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%
140 CO₂ and 95% air, and media were changed every 2-3 days [15].

141 Calcium deposition was detected after 28 days by Alizarin Red S staining (Sigma-Aldrich,
142 Saint-Quentin Fallavier, France). Briefly, MSCs were washed with cold phosphate buffered

143 saline (PBS) followed by staining with 2% Alizarin Red S solution for 2 minutes. Stained
144 cells were then extensively washed with deionized water to remove any nonspecific
145 precipitates. Stained layers were visualized with phase contrast microscopy using an inverted
146 microscope (Nikon Eclipse TE 2000 E, Badhoevedorp, Netherlands). Positive red staining
147 indicated the deposition of a calcified matrix on the differentiated cells.

148

149 Surgical procedure

150

151 *Anesthesia and euthanasia protocols*

152

153 All surgical procedures were performed under general anesthesia using 4% isoflurane
154 inhalation for induction and 2% for preservation. Implants were removed directly after
155 euthanasia by inhalation of carbon dioxide eight weeks after implantation.

156

157 *Preparation of the implants (table 1)*

158

159 The surgical procedure took place in two phases. Six bone regeneration procedures were
160 tested:

- 161 1) BCP granules alone (BCP)
- 162 2) Human Bone Graft (hBG)
- 163 3) Human Total Bone Marrow combined with BCP granules (hTBM+BCP)
- 164 4) Human Stromal Vascular Fraction combined with BCP granules (hSVF+BCP)
- 165 5) Rat Total bone marrow combined with BCP granules (rat TBM+BCP)
- 166 6) A control condition where defects were left unfilled.

167

Table 1

<i>Experimental condition</i>	<i>Mass of BCP material per implant</i>	<i>Seeding density of cells per mg of BCP</i>	<i>Mass of BG per implant</i>	<i>Volume of TBM per implant</i>
Empty defect	-	-	-	-
BCP	15 mg	-	-	-
hBG	-	-	≈ 15 mg	-
ratTBM + BCP	15 mg	-	-	100μL
hTBM + BCP	15 mg	-	-	100μL
hSVF + BCP	15 mg	3.10 ⁴ cells/mg	-	-

168

169 **Table 1:** Cells and materials used in the experimental groups

170

171 *Creation of the defects*

172

173 A 1.5cm longitudinal incision was performed on the head from the front to the neck. Skin and
174 periosteum were retracted to expose the calvaria. A circular critical-sized parietal bone defect
175 (5mm in diameter) was created bilaterally on each side of the sagittal suture using a circular
176 trephine (Komet Medical, Lemgo, Germany) under infusion of saline solution. Each rat
177 received two randomly assigned implants (n=6 per condition). After grafting, the defects were
178 covered by a pedicle flap isolated from the cervical-occipital muscles to prevent a
179 postoperative migration of the particles. The skin was then closed with absorbable sutures.
180 Immediate postoperative analgesia was provided through a subcutaneous injection of
181 buprenorphine hydrochloride (Buprecare[®] 0.3mg/mL, 10μg/kg, Animalcare, Dunnington,
182 UK). The following days, analgesia was provided by acetaminophen orally through a water
183 bottle (0.024‰ in water).

184 *Cell tracking*

185

186 Fluorochrome CM-DIL (CellTracker™, Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
187 tracked the implanted cells, and marked half of the samples. The fluorochrome was integrated
188 into cell membranes where it is stable for several weeks. The cell labeling was performed by
189 cells incubation with 20μM of CM-DIL for 5 minutes at 37°C and then 15 minutes on ice
190 before being mixed with the BCP granules [24]. The resin sections were then analyzed by
191 confocal microscopy on a Nikon Eclipse TE2000-E eC1confocal laser-scanning microscope
192 (Nikon France) with a laser excitation of wavelength 568nm.

193

194 Micro computed tomography (μCT) qualitative analysis

195

196 Calvaria were imaged postoperatively at 8 weeks by μCT scanning using a high resolution X-
197 ray μCT system for small animal imaging (SkyScan-1076, Kontich, Belgium). Images were
198 reconstructed and data were analyzed with the manufacturer's proprietary software (N-Recon,
199 version 1.6.6.0, Skyscan 2011, Kontich, Belgique and CT-Vox, version 2.4.0 r870, Bruker,
200 Kontich, Belgium). This imaging made possible a precise qualitative analysis of defect filling
201 but did not allow a quantitative analysis of bone growth.

202

203 Histological assessment

204

205 The explanted bone specimens were fixed for 7 days in a 4% paraformaldehyde in phosphate-
206 buffered saline, and then dehydrated through a graded series of ethanol treatments. After this
207 phase of dehydration, the samples were embedded in glycol methyl methacrylate (GMMA)
208 resin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

209 For each sample, a cranio-caudal section was performed at the maximal diameter of each
210 implant using a circular diamond saw (SP1600, Leica, Wetzlar, Germany) and serial 5μm

211 thick sections were cut using a hard tissue microtome (Polycut SM 2500, Leica, Wetzlar,
212 Germany). The sections were stained with Goldner's trichrome. New-bone formation,
213 connections with BCP and neighboring tissues, were observed under a light microscope
214 (Axioplan 2, Zeiss, Darmstadt, Germany).

215

216 Scanning electron microscopy

217

218 Samples were sanded on a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) then gold-palladium-
219 coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA). SEM micrographs were taken
220 using backscattered electrons at 15kV. The surface of the implant was divided into contiguous
221 high-resolution images, and quantitative evaluation was performed with a semiautomatic
222 image analyzer (Quantimeter 500, Leica, Cambridge, UK). First, the contours of the defects
223 were traced. Areas of newly formed mineralized bone, BCP granules, and non-mineralized
224 tissues were identified by their grey levels and expressed as a percentage of the total defect
225 surface.

226

227 Statistical analysis

228

229 Results were expressed as mean \pm SEM (Standard Error of the Mean). Results were then
230 compared using a One Way ANOVA parametric test and a Bonferroni's Multiple Comparison
231 Test. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

232

233 **Results**

234

235 Bone marrow myelography

236

237 A cytological myelographic analysis was performed to assess marrow cell lines, including
238 myeloblasts, myelocytes, proerythroblasts, erythroblasts, megakaryocytes, lymphocytes,
239 plasmocytes, and monocytes. The harvested human TBM included all of these physiological
240 cell lineages (Table 2).

241

Table 2

Granulocytic lineage			Erythroblastic lineage		Megacaryocytic lineage			
<i>Myeloblastic</i>	<i>Neutrophil promyelocytes</i>	<i>Neutrophil myelocytes</i>	<i>Metamyelocytes</i>	<i>Polynuclears</i>	<i>Lymphocytes</i>	<i>Plasmocytes</i>	<i>Monocytes</i>	<i>Megacaryocytic lineage</i>

242

243 **Table 2:** Cytological analysis of the bone marrow. Results are expressed as a percentage of
244 cells per lineage.

245

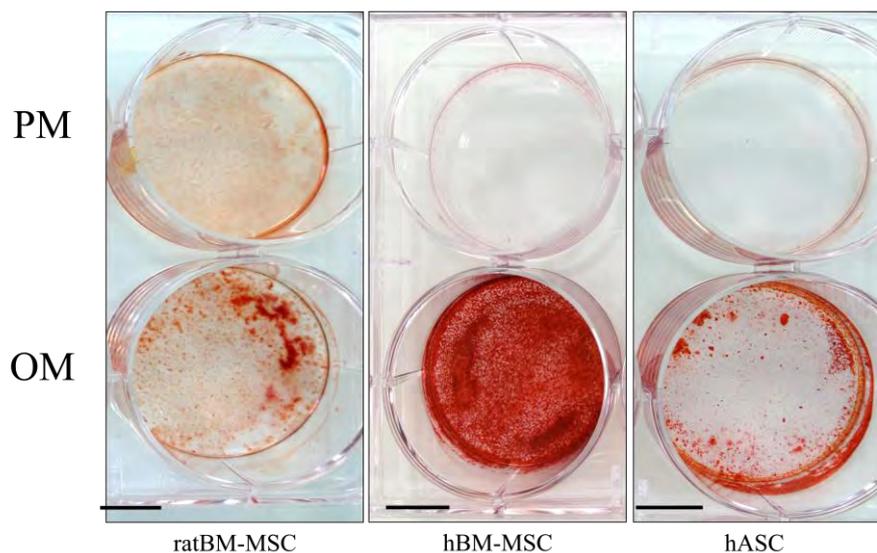
246 Cells characterization

247

248 The osteogenic potential of rat- and human BM-MSCs and human ASCs (isolated from the
249 implanted TBM and SVF), was evaluated by the mineralization of the extracellular matrix
250 using Alizarin Red staining after 28 days of culture in the presence of PM or OM. Staining of
251 the cell layer was positive for cells isolated from bone marrow and adipose tissue, and
252 cultured in the presence of OM for 28 days (Figure 1). In contrast, staining was less
253 pronounced for cells grown in the presence of a PM.

254

Figure 1



255

256 **Figure 1:** Osteogenic differentiation of bone marrow- and adipose-derived MSCs. Calcium
257 deposition was investigated by Alizarin Red staining at 28 days. Abbreviations: PM:
258 proliferative medium, OM: osteogenic medium, hBM-MSC: mesenchymal stem cells derived
259 from human bone marrow, rat BM-MSC: mesenchymal stem cell derived from rat bone
260 marrow, hASC: mesenchymal stromal cell derived from human adipose tissue. Bar = 1cm.

261

262 Analysis of new bone formation

263

264 *Micro-CT analysis*

265

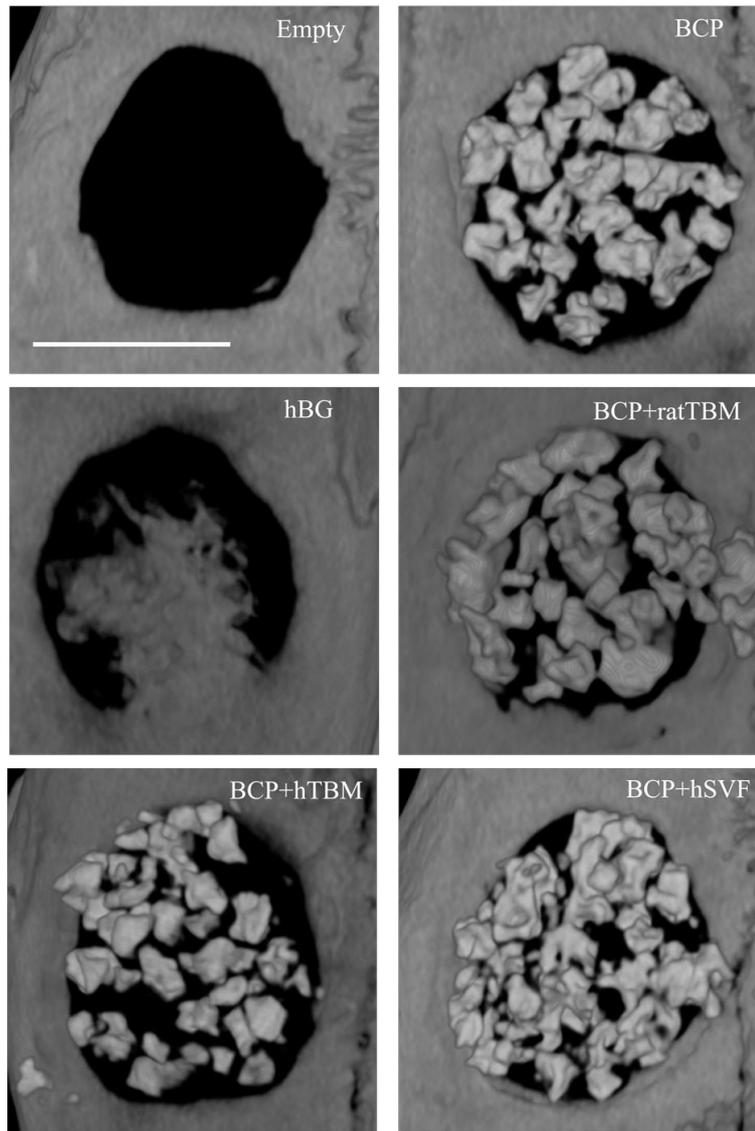
266 Three-dimensional μ CT reconstructions confirmed successful implantations and detected
267 failed implantations. Failed implantation was defined as implants in which the BCP granules
268 migrated out of the implant sites. Implantation failures were then excluded from further
269 analyses (1 BCP alone, 1 hTBM+BCP, 1 hSVF+BCP and, 1 rat TBM+BCP).

270 Micro-CT analysis revealed partial repair of the bone defect implanted with hBG where the
271 hBG remodeled and sometimes fused with the edge of the defect. In contrast, the control
272 defect which contained no BCP showed no closure. BCP-based conditions revealed non-
273 resorbed granules still presents in the defect (Figure 2).

274

275

Figure 2



276

277 **Figure 2:** Three-dimensional reconstruction built from μ CT coronal images at 8 weeks.

278 Three-dimensional reconstructions were built from coronal images for each parietal bone in

279 order to assess the success of the implantation. The results from one representative defect out

280 of six are shown. Abbreviations: hBG: human bone graft, hTBM: human total bone marrow,

281 hSVF: human stromal vascular fraction, rat TBM: rat total bone marrow, BCP: biphasic

282 calcium phosphate. Bar = 5mm.

283

284 *SEM analysis*

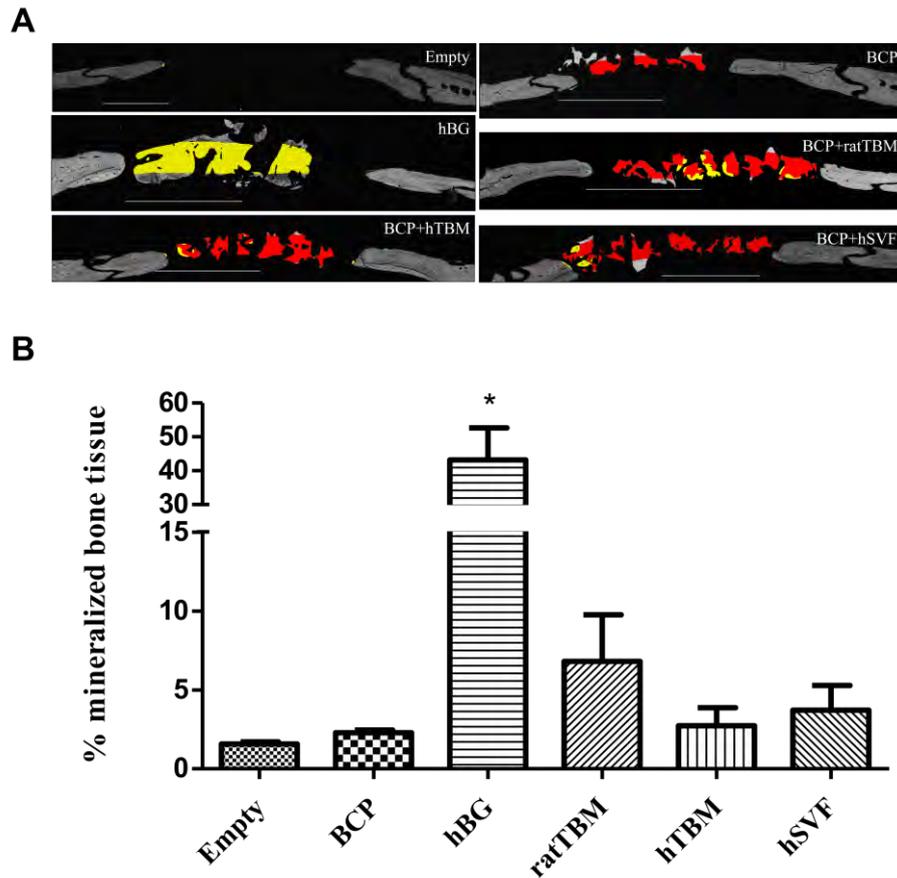
285

286 SEM analysis allowed a qualitative observation of the explants, in particular the interface
287 between newly formed bone and the BCP granules (Figure 3A), and a quantitative analysis of
288 healing of the defect through the measurement of mineralized bone tissue based on the semi-
289 automatic image analysis. Quantitative and statistical analyses are summarized in Figure 3B.
290 In our study only hBG significantly succeeded in healing the calvaria defect. However newly
291 formed bone tissue was observed in tissue engineering conditions with rat TBM, hTBM, and,
292 hSVF.

293

294

Figure 3



295

296 **Figure 3:** A. Bone formation scoring at 8 weeks using SEM semi-quantitative analysis.

297 Newly formed bone was assessed by SEM. BCP granules are shown in red, non-calcified

298 tissues in black, native bone in grey, and new bone inside the region of interest in yellow. Bar

299 = 1mm.

300 B. Quantitative analysis of the bone formation in the defect (* $p < 0.05$). Abbreviations: hBG:

301 human bone graft, hTBM: human total bone marrow, hSVF: human adipose tissue stromal

302 vascular fraction, rat TBM: rat total bone marrow, BCP: biphasic calcium phosphate.

303

304 *Histological analysis*

305

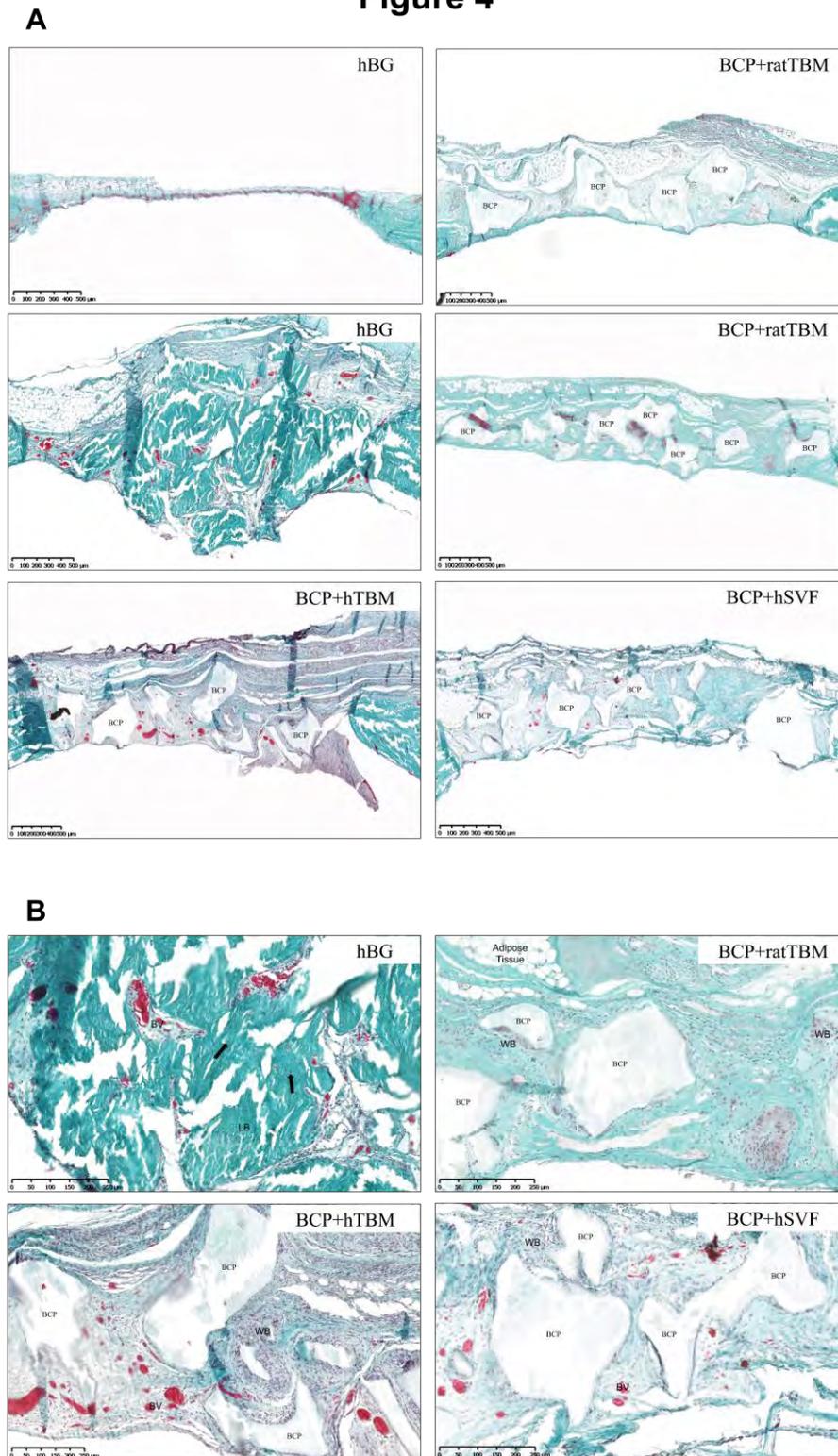
306 Figure 4A shows representative histological examples of each conditions. Red squares are
307 areas magnified in figure 4B.

308 No inflammatory reaction or encapsulation reaction between the granules and new bone was
309 observed at any time point. In the empty control group, there was only a thin layer of fibrous
310 tissue above the *dura matter* (in red). In the group filled with BCP granules alone, we
311 observed a fibrous tissue surrounding the biomaterials. In the hBG group, we observed a
312 massive filling of the defect with mineralized lamellar bone (LB). In this group, there was
313 also presence of osteocytes like cells (black arrows) suggesting the graft is still composed of
314 living tissue. However, hBG did not always show signs of remodeling and often did not fuse
315 with the edges of the defect (as seen in figure 4B). For BCP combined with rat TBM, hTBM
316 or hSVF, cellularized woven bone tissue was present in contact with the granules. However,
317 presence of mineralized lamellar bone was absent most of the time. In the two groups with
318 human cells (hTBM/hSVF) the presence of red blood vessel-like structure (BV) were
319 commonly seen.

320

321

Figure 4



322

323 **Figure 4:** Histological analysis of bone formation at 8 weeks. Histological study of newly
324 formed tissue was assessed with Goldner Trichrome staining. Mineralized bone is shown in
325 dark green and BCP granules are presented in white. (A) Overview of defects histological

326 aspect 8 weeks after implantation. Bar = 500 μ m. (B) Magnification of red squares from figure
327 4A. Bar = 250 μ m. Abbreviations: BCP: biphasic calcium phosphate, BV: blood vessel, hBG:
328 human bone graft, hSVF: human stromal vascular fraction, hTBM: human total bone marrow,
329 LB: lamellar bone, rat TBM: rat total bone marrow, WB: woven bone.

330

331 *Cell tracking*

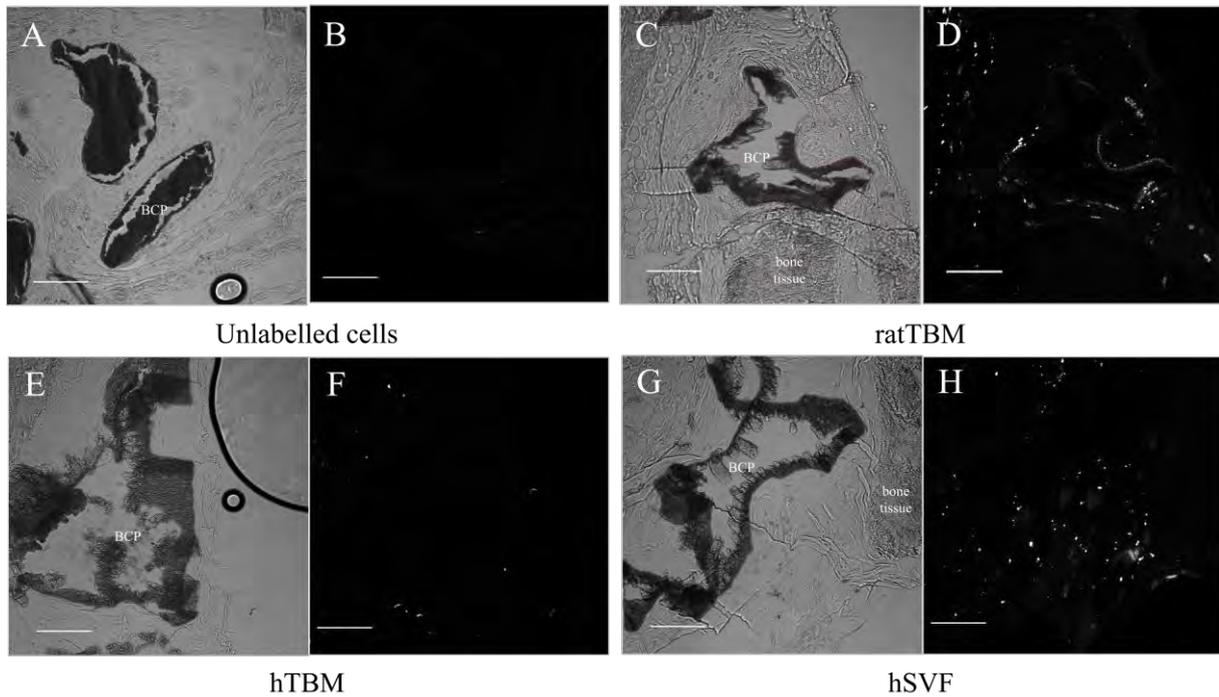
332

333 Before implantation, rat and human TBM and human SVF cells were labelled with CM-DIL
334 in half of the defects (n=3). The remaining fluorescence was investigated by fluorescent
335 microscopy after explantation. In all condition with cells from rat or human origins, signal
336 was present after 8 weeks. Signal can be seen in contact with the BCP, but also in surrounding
337 tissue (Figure 5). Red signal was converted to white to make it easier to read.

338

339

Figure 5



340

341 **Figure 5:** Fluorescent microscopy at 8 weeks of CM-DIL labelled cells. Cells were labelled
342 with CM-DIL before implantation and observed 8 weeks later. The presence of fluorescence
343 signal was assessed by fluorescent microscopy in transmitted light (A, C, E and, G) then with
344 the red laser 568nm (B, D, F and, H) in the different tissue engineering conditions.
345 Abbreviations: hTBM: human total bone marrow, rat TBM: rat total bone marrow, hSVF:
346 human stromal vascular fraction. Bar = 100 μ m. Red signal was converted to white to make it
347 easier to read.

348

349 **Discussion**

350

351 The aim of this study was to evaluate the bone regenerating potential of BCP combined with
352 hSVF and hTBM. These two intra-operatively isolated MSCs sources could act as an
353 alternative to bone graft which is the current gold standard for maxillofacial bone
354 reconstruction [25]. Previous studies in a syngenic model of rat critical-sized calvaria defect
355 have highlighted the promising use of TBM combined with biphasic calcium phosphate
356 granules[17].

357

358 In our study, human TBM, human SVF and rat TBM, all in association with BCP granules,
359 were compared to the current standard (hBG) in a critical-sized calvaria defect in the rat. The
360 use of an immunotolerant animal (NIH-Foxn1 nude) was required, in an attempt to study
361 clinically relevant cell sources of human origin.

362 The absence of bone regeneration in the empty defect at 8 weeks confirmed that the model we
363 used was a critical-size one. Moreover, the implantation of BCP alone did not produce a
364 significant amount of bone compared to the empty control defect, confirming the lack of
365 osteoinductive properties of BCP alone in hypoplastic bone defects [26].

366 The bone graft showed the best results in terms of mineralized tissue filling the defect 8
367 weeks after implantation with 43.2% of defect filling. The amount of mineralized tissue in
368 this condition was significantly higher than in defect filled with bone tissue engineering
369 procedures. Histological analyses confirmed the presence of partly remodelled living bone
370 containing osteocyte-like cells. However, it is important to note that the SEM analysis does
371 not allow differentiating implanted bone graft from newly formed bone tissue. Consequently,
372 the percentage of mineralized tissue obtained with human bone graft condition might be
373 overstated. In addition, SEM and histological analyses showed several bone graft samples

374 where there was no coalescence between the graft and the edges of the defect, suggesting a
375 low remodeling of the implanted bone compared to our expectation.

376

377 Concerning, intra-operative bone tissue engineering strategies with hTBM and hSVF, only
378 little bone formation occurred around the granules, even though the presence of fluorescence
379 signal could suggest that cells were still present 8 weeks after implantation. Woven bone
380 tissue with a fibrous matrix was observable, but no statistically significant mineralized bone
381 formation occurred. There seemed to be a tendency for rat TBM combined with BCP to form
382 more mineralized tissue (6.8%) compared to BCP alone (2.3%). Then, the lack of statistical
383 significance could possibly be attributed to a small number of samples.

384 Several studies have investigated the osteogenic potential of hSVF [18,21,22,27–30] while
385 only one study tested it in orthotopic model [31]. The ability of hSVF to form bone is still
386 controversial and under debate. Rhee *et al.* had recorded some osteogenic potential of rat SVF
387 in calvaria defects after 8 weeks using demineralized bone matrix [20], while Müller *et al.* and
388 Scherberich *et al.* observed only a slight amount of bone in an ectopic site with hSVF and
389 hydroxyapatite cylinders [21,22]. The present study agrees with these later findings. Thus,
390 some authors have suggested that hSVF's osteogenic potential can be stimulated by adding
391 growth factors or cytokines [28]. However, the use of growth factor in human maxillofacial
392 surgery is debatable as far as adverse effects has been reported, such as inflammatory
393 reactions, graft failure and infections [32,33].

394 Like SVF, extemporaneous TBM, does not require an *in vitro* culture step, which would make
395 its potential use in the clinical setting much more likely. This technique has rarely been
396 considered for craniofacial bone repair in human [34,35]. In a recent study, rat TBM
397 combined with BCP led to efficient bone formation in calvaria defects similar to bone
398 formation observed in treatments with committed BM-MSC cultured on BCP granules [17].

399 To our knowledge, the osteogenic properties of hTBM in hypoplastic bone have yet to be
400 validated. Unexpectedly, in the present study, BCP granules mixed with rat- or hTBM did not
401 demonstrate a significant bone formation. It has been reported that the main limitation of
402 TBM-based strategies is donor-to-donor variability, which cannot be predicted *a priori*. In our
403 study, rat- and human TBM were isolated from only one donor for each experimental
404 condition, which could explain our results. However, a marrow rich in different type of cells
405 was observed in the myelography both for the human patient (table 1), and the donor rat (data
406 not shown).

407 The results obtained with rat TBM remain peculiarly disturbing as this strategy was recently
408 evaluated in different autologous bone defect model, including irradiated bone in dog, rat, or
409 rabbit and consistently demonstrated a similar ability to form bone as compared to other
410 strategies [17,36–38]. The same source of rat TBM (Lewis rats) also gave great results in
411 another rat calvarial model at 8 weeks [17]. In the later study, the same biomaterial was used
412 making it hard to blame the choice of BCP granules.

413

414 We thus hypothesize that the low rate of mineralized tissue observed in the present study
415 could possibly be attributed to the maxilla-facial bone physiology of nude rat model.

416 To answer that hypothesis, a review of the literature concerning that model was conducted. A
417 Pubmed research with the keywords, “nude rat bone” gave 743 results. Among those, 150
418 concerned bone regeneration studies in the nude rat model. Twenty-six of those studies were
419 using a calvarial defect. A closer look to the previous reported studies is summarized in table
420 3 [12,19,20,39–61].

421

Author/Year	Defect size (diameter)	Implantation (weeks)	Biomaterial	Use of BMP (or DBM)	% of bone tissue	Histological or MicroCT evidence of bone formation
<i>Chesmel 1998</i>	8mm	8	DBM	YES	4.9-6.1% Empty 19.5-28.1% hDBM in gel form 29.4-46.1% Autograft	+/-
<i>Winn 1999</i>	8mm	2-4	PCL	YES	22% PLC ~80% PLC/rhBMP2	++
<i>Akita 2004</i>	4mm	2-4-8	Gelatin	YES	-	+/-
<i>Kaigler 2006</i>	8.5mm	6-12	PLGA	NO	6% PLGA 33% PLGA/BMSC/EC	++
<i>Acarturk 2006</i>	8mm	2-4-8	DBM	YES	-	++
<i>Chim 2006</i>	6mm	6	PCL	NO	-	+/-
<i>Shimizu 2007</i>	5mm	2	-	NO	-	+/-
<i>Yoon 2007</i>	8mm	12	PLGA	NO	0% PLGA 72% PLGA+differentiated ASC	+
<i>Roussy 2007</i>	3mm	2-4	PRP/Collagen	NO	50% Collagen 45% PRP	+/-
<i>Mhawi 2007</i>	5mm					
<i>Qiu 2007</i>	5mm	4-8	DBM/AM	YES	32% Empty 84% DBM/AM	++

<i>Park 2008</i>	8mm	8	PGA/PRP	YES	-	+
<i>Plachokova 2009</i>	8mm	2-4	BCP/PRP	NO	14% BCP+PRP 14% BG 18% BG+PRP	+
<i>Rhee 2011</i>	8mm	8	DBM/PLA	YES	13% Empty 40% DBM 58% DBM+SVF	++
<i>Gardin 2012</i>	5mm	3	HA	NO	-	+/-
<i>Tremoleda 2012</i>	6mm	1-2	DBM	YES	-	+
<i>Kim 2012</i>	5mm	4-8	AM	NO	-	++
<i>Ji 2013</i>	8mm	8	PCL/gelatin	NO	-	+
<i>Li 2014</i>	5mm	6	PRF	NO	17% Empty 62% L-PRF	++
<i>Annibali 2014</i>	5mm	2-4-8-12	GDPB/ β -TCP	NO	-	+/-
<i>Ma 2014</i>	5mm	8	Titanium fiber mesh	NO	-	+
<i>Choi 2014</i>						
<i>Pippenger 2015</i>	4mm	12	CaP granules+fibrin gel	NO	-	+
<i>Suenaga 2015</i>	8mm	8	β -TCP	NO	-	++
<i>Wang 2015</i>	8mm	12	CaP cement	NON	11% CPC 30,4% hiPSC-MSC	++
<i>Wang 2015</i>	8mm	12	CaP cement	YES	22,5% CPC+iPS-MSCs 44,7% CPC+BMP2-iPSMSCs	++

423 **Table 3:** Literature review of english writing articles using the nude rat model of calvarial
424 defect using PubMed database. Abbreviations: AM: Acellular Matrix, ADM: Acellular human
425 Dermal Matrix, β -TCP: TriCalcium Phosphate beta, CaP: Calcium Phosphate, CPC: Calcium
426 Phosphate Cement, DBM: Demineralized Bone Matrix, EC: Endothelial Cells, GDPB:
427 Granular DeProteinized bovine Bone, HA: HydroxyApatite, iPSMSCs:induced Pluripotent
428 Stem cell-derived Mesenchymal Stem Cells, MSC: Mesenchymal Stem Cells, PCL:
429 PolyCaproLactone, PGA: Polyglycolic Acid, PLA: PolyLactic Acid, PLGA: Poly(Lactic-co-
430 Glycolic) Acid, PRP: Platelet Rich Plasma, rhBMP2: recombinant human Bone
431 Morphogenetic Protein 2.

432 Level of evidence based on histological and imaging illustrations: - no illustrated evidence of
433 bone formation, +/- little evidence of bone formation, + slight evidence of bone formation, ++
434 strong evidence of bone formation

435
436 The previous works in this model are using a large variety of biomaterials. The time points of
437 analyses were from one to twelve weeks after defect creation/implantation. Otherwise, we can
438 observe that the higher results in mineralized bone formation rates were obtained while using
439 Demineralized Bone Matrix (DBM) or other sources of bone morphogenetic proteins were
440 used. Studies with quantification, computed tomography or histological results available,
441 reported a relatively lower bone formation before 2 months when no osteogenic proteins were
442 used. However, some studies evaluating the bone formation at a 12 weeks' time-point
443 reported consequent mineralized tissue formation. It might then be interesting to look our
444 conditions at a 3 months' time-point.

445
446 The lack of a competent immune system in these rats could explain the low bone formation
447 rates obtained when no growth factor were used. However, literature results showing higher

448 bone formation rates in non-calvarial defects (*ie* limb bones) suggest that the implication of
449 the immune system in bone formation can not alone explain this observation.

450 Those findings from literature and from the present study tend to show that nude rat calvarial
451 defect resembles the situation found in the most hypoplastic cases of maxillofacial bone
452 defects in human where human bone grafts often fail. The nude rat calvarial defect might then
453 be of great interest when assessing these types of afflictions. However to assess cell-based
454 tissue engineering in other, less hypoplastic, maxillo-facial applications the use of another
455 model can be suggested.

456 An immunosuppressive drug in immunocompetent animal could allow the investigation of
457 human cell-based bone tissue engineering for maxillofacial application in less stringent
458 conditions. Although, it will not allow investigating the potential role of the immune system
459 in bone regeneration. To answer this issue, the humanized rat model could be used to assess
460 human cells tissue engineering strategies in an “autologous immune” recipient.

461

462 **Conclusion**

463

464 In conclusion, in this study the bone regenerating potential of human-based intra-operative
465 tissue engineering strategies was evaluated. To assess the osteogenic potential of human SVF
466 and human TBM the nude rat model of calvaria defect was used. In this study, only the
467 clinical gold standard of freshly harvested human bone graft was able to achieve a significant
468 filling of the defect. Our results and the literature analysis we conducted on the nude rat
469 calvaria model highlighted the high hypotrophic nature of this model.

470

471 **Acknowledgements**

472

473 The authors are grateful to Severine Battaglia for μ CT analysis, Caroline Vignes and Greig
474 Couasny for CM-DIL images and Biomatlante Company for providing the biomaterials. This
475 work was supported the association “Les Gueules Cassées”. An author, Vincent Hivernaud
476 received a scholarship grant by the French National Association of Research and Technology
477 and by the STEMCIS company.

478 **Bibliography**

479

480 [1] G.A. Helm, H. Dayoub, J.A. Jane Jr, Bone graft substitutes for the promotion of spinal
481 arthrodesis, *Neurosurg. Focus.* 10 (2001) E4.

482 [2] P. Tessier, H. Kawamoto, D. Matthews, J. Posnick, Y. Raulo, J.F. Tulasne, et al.,
483 Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case
484 experience in maxillofacial and craniofacial surgery, *Plast. Reconstr. Surg.* 116 (2005) 6S–
485 24S; discussion 92S–94S.

486 [3] J.H. Assaf, F.B. Zanatta, R.B. de Brito Jr, F.M.G. França, Computed tomographic
487 evaluation of alterations of the buccolingual width of the alveolar ridge after immediate
488 implant placement associated with the use of a synthetic bone substitute, *Int. J. Oral*
489 *Maxillofac. Implants.* 28 (2013) 757–763.

490 [4] R. Cavagna, G. Daculsi, J.M. Bouler, Macroporous calcium phosphate ceramic: a
491 prospective study of 106 cases in lumbar spinal fusion, *J. Long. Term Eff. Med. Implants.* 9
492 (1999) 403–412.

493 [5] D. Le Nihouannen, G. Daculsi, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, S. Delplace, P. Pilet, et
494 al., Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep
495 muscles, *Bone.* 36 (2005) 1086–1093. doi:10.1016/j.bone.2005.02.017.

496 [6] T. Miramond, P. Corre, P. Borget, F. Moreau, J. Guicheux, G. Daculsi, et al.,
497 Osteoinduction of biphasic calcium phosphate scaffolds in a nude mouse model, *J. Biomater.*
498 *Appl.* 29 (2014) 595–604. doi:10.1177/0885328214537859.

499 [7] M. Khashan, S. Inoue, S.H. Berven, The use of cell based therapies as compared to
500 autologous bone grafts for spinal arthrodesis. A systematic review, *Spine.* (2013).
501 doi:10.1097/BRS.0b013e3182a3d7dc.

502 [8] P. Corre, R.-H. Khonsari, B. Laure, K. Elamrani, P. Weiss, J.-M. Mercier, [Synthetic
503 calcium phosphate ceramics in secondary alveoloplasty], *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*
504 113 (2012) 131–135. doi:10.1016/j.stomax.2011.12.012.

505 [9] S. Agacayak, B. Gulsun, M.C. Ucan, E. Karaoz, Y. Nergiz, Effects of mesenchymal
506 stem cells in critical size bone defect, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16 (2012) 679–686.

507 [10] T.L. Arinzeh, T. Tran, J. Mcalary, G. Daculsi, A comparative study of biphasic
508 calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation,
509 *Biomaterials.* 26 (2005) 3631–3638. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.035.

510 [11] D. Ben-David, T.A. Kizhner, T. Kohler, R. Müller, E. Livne, S. Srouji, Cell-scaffold

511 transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration, *J.*
512 *Cranio-Maxillo-Fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Fac. Surg.* 39 (2011) 364–
513 371. doi:10.1016/j.jcms.2010.09.001.

514 [12] D. Kaigler, P.H. Krebsbach, Z. Wang, E.R. West, K. Horger, D.J. Mooney,
515 Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration, *J. Dent. Res.* 85 (2006)
516 633–637.

517 [13] A. Khadka, J. Li, Y. Li, Y. Gao, Y. Zuo, Y. Ma, Evaluation of hybrid porous
518 biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide 6 and bone marrow-derived stem cell construct in
519 repair of calvarial critical size defect, *J. Craniofac. Surg.* 22 (2011) 1852–1858.
520 doi:10.1097/SCS.0b013e31822e8274.

521 [14] A. Matsushima, N. Kotobuki, M. Tadokoro, K. Kawate, H. Yajima, Y. Takakura, et
522 al., In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and
523 on beta-tricalcium phosphate, *Artif. Organs.* 33 (2009) 474–481. doi:10.1111/j.1525-
524 1594.2009.00749.x.

525 [15] P. Corre, C. Merceron, C. Vignes, S. Sourice, M. Masson, N. Durand, et al.,
526 Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an “all-in-one” study in
527 nude mice, *PloS One.* 8 (2013) e81599. doi:10.1371/journal.pone.0081599.

528 [16] M.H. Mankani, S.A. Kuznetsov, P.G. Robey, Formation of hematopoietic territories
529 and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density,
530 *Exp. Hematol.* 35 (2007) 995–1004.

531 [17] P. Corre, C. Merceron, J. Longis, R.H. Khonsari, P. Pilet, T.N. Thi, et al., Direct
532 comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial
533 bone defects - A preclinical study, *Acta Biomater.* (2015). doi:10.1016/j.actbio.2015.08.013.

534 [18] S. Güven, A. Mehrkens, F. Saxer, D.J. Schaefer, R. Martinetti, I. Martin, et al.,
535 Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal
536 and endothelial progenitors from human adipose tissue, *Biomaterials.* 32 (2011) 5801–5809.
537 doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.064.

538 [19] H.J. Kim, S.S. Park, S.Y. Oh, H. Kim, O.-K. Kweon, H.M. Woo, et al., Effect of
539 acellular dermal matrix as a delivery carrier of adipose-derived mesenchymal stem cells on
540 bone regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 100 (2012) 1645–1653.
541 doi:10.1002/jbm.b.32733.

542 [20] S.C. Rhee, Y. Ji, N.A. Gharibjanian, E.S. Dhong, S.H. Park, E.-S. Yoon, In vivo
543 evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and
544 demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect

545 model, *Stem Cells Dev.* 20 (2011) 233–242. doi:10.1089/scd.2009.0525.

546 [21] A.M. Müller, A. Mehrkens, D.J. Schäfer, C. Jaquierey, S. Güven, M. Lehmicke, et al.,
547 Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal
548 vascular fraction of human adipose tissue, *Eur. Cell. Mater.* 19 (2010) 127–135.

549 [22] A. Scherberich, R. Galli, C. Jaquierey, J. Farhadi, I. Martin, Three-dimensional
550 perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors
551 generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity, *Stem Cells* 25 (2007)
552 1823–1829. doi:10.1634/stemcells.2007-0124.

553 [23] A.-C. Girard, M. Atlan, K. Bencharif, M.K. Gunasekaran, P. Delarue, O. Hulard, et
554 al., New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells, *Aesthetic*
555 *Plast. Surg.* 37 (2013) 144–152. doi:10.1007/s00266-012-9988-9.

556 [24] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, et al.,
557 Tissue-engineered bone regeneration, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 959–963.
558 doi:10.1038/79449.

559 [25] G.F. Rogers, A.K. Greene, Autogenous bone graft: basic science and clinical
560 implications, *J. Craniofac. Surg.* 23 (2012) 323–327. doi:10.1097/SCS.0b013e318241dcba.

561 [26] N. Shirasu, T. Ueno, Y. Hirata, A. Hirata, T. Kagawa, M. Kanou, et al., Bone
562 formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with
563 beta-tricalcium phosphate, *Acta Histochem.* 112 (2010) 270–277.
564 doi:10.1016/j.acthis.2009.01.003.

565 [27] L.A. Tchang, B.E. Pippenger, A. Todorov, F. Wolf, M.G. Burger, C. Jaquierey, et al.,
566 Pooled thrombin-activated platelet-rich plasma: a substitute for fetal bovine serum in the
567 engineering of osteogenic/vasculogenic grafts, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2015).
568 doi:10.1002/term.2054.

569 [28] A. Mehrkens, F. Saxer, S. Güven, W. Hoffmann, A.M. Müller, M. Jakob, et al.,
570 Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-
571 derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2, *Eur. Cell. Mater.* 24
572 (2012) 308–319.

573 [29] A.M. Müller, M. Davenport, S. Verrier, R. Drosier, M. Alini, C. Bocelli-Tyndall, et
574 al., Platelet lysate as a serum substitute for 2D static and 3D perfusion culture of stromal
575 vascular fraction cells from human adipose tissue, *Tissue Eng. Part A.* 15 (2009) 869–875.
576 doi:10.1089/ten.tea.2008.0498.

577 [30] A. Papadimitropoulos, A. Scherberich, S. Güven, N. Theilgaard, H.J.A. Crooijmans,
578 F. Santini, et al., A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells, *Eur. Cell.*

579 Mater. 21 (2011) 445–458; discussion 458.

580 [31] A.W. James, J.N. Zara, M. Corselli, M. Chiang, W. Yuan, V. Nguyen, et al., Use of
581 human perivascular stem cells for bone regeneration, *J. Vis. Exp. JoVE*. (2012) e2952.
582 doi:10.3791/2952.

583 [32] E.J. Woo, Adverse events reported after the use of recombinant human bone
584 morphogenetic protein 2, *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*
585 70 (2012) 765–767. doi:10.1016/j.joms.2011.09.008.

586 [33] E. Neovius, M. Lemberger, A.C. Docherty Skogh, J. Hilborn, T. Engstrand, Alveolar
587 bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone
588 morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel, *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS*. 66
589 (2013) 37–42. doi:10.1016/j.bjps.2012.08.015.

590 [34] C. Wongchuensoontorn, N. Liebehenschel, U. Schwarz, R. Schmelzeisen, R. Gutwald,
591 E. Ellis, et al., Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem
592 cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report, *J.*
593 *Cranio-Maxillo-Fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Fac. Surg.* 37 (2009) 155–
594 161. doi:10.1016/j.jcms.2008.11.002.

595 [35] P.H. Warnke, I.N.G. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, H. Eufinger, M. Wehmöller, et al.,
596 Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man, *Lancet Lond. Engl.*
597 364 (2004) 766–770. doi:10.1016/S0140-6736(04)16935-3.

598 [36] P. Bléry, P. Corre, O. Malard, S. Sourice, P. Pilet, Y. Amouriq, et al., Evaluation of
599 new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total
600 fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25
601 (2014) 2711–2720. doi:10.1007/s10856-014-5282-5.

602 [37] O. Malard, J. Guicheux, J.-M. Bouler, O. Gauthier, C.B. de Montreuil, E. Aguado, et
603 al., Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a
604 dog study, *Bone*. 36 (2005) 323–330. doi:10.1016/j.bone.2004.07.018.

605 [38] F. Espitalier, C. Vinatier, E. Lerouxel, J. Guicheux, P. Pilet, F. Moreau, et al., A
606 comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and
607 total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone,
608 *Biomaterials*. 30 (2009) 763–769. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.051.

609 [39] K.D. Chesmel, J. Branger, H. Wertheim, N. Scarborough, Healing response to various
610 forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects, *J. Oral Maxillofac.*
611 *Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 56 (1998) 857–863; discussion 864–865.

612 [40] S.R. Winn, J.M. Schmitt, D. Buck, Y. Hu, D. Grainger, J.O. Hollinger, Tissue-

613 engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats, J.
614 Biomed. Mater. Res. 45 (1999) 414–421.

615 [41] S. Akita, M. Fukui, H. Nakagawa, T. Fujii, K. Akino, Cranial bone defect healing is
616 accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic
617 protein-2 and basic fibroblast growth factor, Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal.
618 Soc. Eur. Tissue Repair Soc. 12 (2004) 252–259. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012118.x.

619 [42] T.O. Acarturk, J.O. Hollinger, Commercially available demineralized bone matrix
620 compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects, Plast. Reconstr. Surg. 118
621 (2006) 862–873. doi:10.1097/01.prs.0000232385.81219.87.

622 [43] H. Chim, J.-T. Schantz, Human circulating peripheral blood mononuclear cells for
623 calvarial bone tissue engineering, Plast. Reconstr. Surg. 117 (2006) 468–478.
624 doi:10.1097/01.prs.0000201489.65811.e7.

625 [44] K. Shimizu, A. Ito, T. Yoshida, Y. Yamada, M. Ueda, H. Honda, Bone tissue
626 engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite
627 nanoparticles and magnetic force, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 82 (2007) 471–
628 480. doi:10.1002/jbm.b.30752.

629 [45] E. Yoon, S. Dhar, D.E. Chun, N.A. Gharibjanian, G.R.D. Evans, In vivo osteogenic
630 potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for
631 bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model, Tissue Eng. 13 (2007) 619–
632 627. doi:10.1089/ten.2006.0102.

633 [46] Y. Roussy, M.-P. Bertrand Duchesne, G. Gagnon, Activation of human platelet-rich
634 plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation, Clin. Oral
635 Implants Res. 18 (2007) 639–648. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01385.x.

636 [47] A.A. Mhawi, S.A.F. Peel, T.C.-O. Fok, C.M.L. Clokie, Bone regeneration in athymic
637 calvarial defects with Accell DBM100, J. Craniofac. Surg. 18 (2007) 497–503.
638 doi:10.1097/scs.0b013e318052e2b1.

639 [48] Q.-Q. Qiu, M.-S. Shih, K. Stock, T. Panzitta, P.A. Murphy, S.C. Roesch, et al.,
640 Evaluation of DBM/AM composite as a graft substitute for posterolateral lumbar fusion, J.
641 Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 82 (2007) 239–245. doi:10.1002/jbm.b.30726.

642 [49] E.-J. Park, E.-S. Kim, H.-P. Weber, R.F. Wright, D.J. Mooney, Improved bone healing
643 by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone
644 morphogenetic protein-2, Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 23 (2008) 818–826.

645 [50] A.S. Plachokova, J. van den Dolder, J.J.J.P. van den Beucken, J.A. Jansen, Bone
646 regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma, Int. J. Oral Maxillofac.

647 Surg. 38 (2009) 861–869. doi:10.1016/j.ijom.2009.04.009.

648 [51] C. Gardin, E. Bressan, L. Ferroni, E. Nalesso, V. Vindigni, E. Stellini, et al., In vitro
649 concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their
650 genetical analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to
651 increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts, *Stem Cells Dev.* 21
652 (2012) 767–777. doi:10.1089/scd.2011.0147.

653 [52] J.L. Tremoleda, N.S. Khan, V. Mann, S.N. Racey, A.J. Martin, A.H.W.R. Simpson, et
654 al., Assessment of a preclinical model for studying the survival and engraftment of human
655 stem cell derived osteogenic cell populations following orthotopic implantation, *J.*
656 *Musculoskelet. Neuronal Interact.* 12 (2012) 241–253.

657 [53] W. Ji, F. Yang, J. Ma, M.J. Bouma, O.C. Boerman, Z. Chen, et al., Incorporation of
658 stromal cell-derived factor-1 α in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone
659 regeneration, *Biomaterials.* 34 (2013) 735–745. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.016.

660 [54] S. Annibali, D. Bellavia, L. Ottolenghi, A. Cicconetti, M.P. Cristalli, R. Quaranta, et
661 al., Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as
662 carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary
663 data, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102 (2014) 815–825.
664 doi:10.1002/jbm.b.33064.

665 [55] J. Ma, S.K. Both, W. Ji, F. Yang, H.-J. Prins, M.N. Helder, et al., Adipose tissue-
666 derived mesenchymal stem cells as monocultures or cocultures with human umbilical vein
667 endothelial cells: performance in vitro and in rat cranial defects, *J. Biomed. Mater. Res. A.*
668 102 (2014) 1026–1036. doi:10.1002/jbm.a.34775.

669 [56] B.E. Pippenger, M. Ventura, K. Pelttari, S. Feliciano, C. Jaquierey, A. Scherberich, et
670 al., Bone-forming capacity of adult human nasal chondrocytes, *J. Cell. Mol. Med.* 19 (2015)
671 1390–1399. doi:10.1111/jcmm.12526.

672 [57] H. Suenaga, K.S. Furukawa, Y. Suzuki, T. Takato, T. Ushida, Bone regeneration in
673 calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal
674 stromal cell spheroids, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 254. doi:10.1007/s10856-015-
675 5591-3.

676 [58] J.W. Choi, E.J. Park, H.S. Shin, I.S. Shin, J.C. Ra, K.S. Koh, In vivo differentiation of
677 undifferentiated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in critical-sized
678 calvarial bone defects, *Ann. Plast. Surg.* 72 (2014) 225–233.
679 doi:10.1097/SAP.0b013e31825f70f5.

680 [59] Q. Li, D.A. Reed, L. Min, G. Gopinathan, S. Li, S.J. Dangaria, et al., Lyophilized

681 platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2, *Int. J. Mol.*
682 *Sci.* 15 (2014) 8509–8525. doi:10.3390/ijms15058509.

683 [60] P. Wang, X. Liu, L. Zhao, M.D. Weir, J. Sun, W. Chen, et al., Bone tissue engineering
684 via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in
685 rat cranium, *Acta Biomater.* 18 (2015) 236–248. doi:10.1016/j.actbio.2015.02.011.

686 [61] P. Wang, Y. Song, M.D. Weir, J. Sun, L. Zhao, C.G. Simon, et al., A self-setting
687 iPSMSC-alginate-calcium phosphate paste for bone tissue engineering, *Dent. Mater. Off.*
688 *Publ. Acad. Dent. Mater.* (2015). doi:10.1016/j.dental.2015.11.019.

689

C. Discussion sur l'étude de comparaison des stratégies intra-opératoire d'ingénierie tissulaire osseuse

Cette première étude avait pour but de déterminer la place de l'utilisation de la FSV parmi les stratégies intra-opératoire envisageable en ingénierie tissulaire osseuse en contexte maxillo-facial.

Pour se placer dans un contexte de clinique humaine, des cellules/tissus d'origine humaine ont donc été comparés dans un modèle immunotolérant de défaut osseux maxillo-facial : le défaut de calvaria de rat nude.

Des études préliminaires ont permis de déterminer qu'une quantité de 20mg de granules de BCP servait à combler un défaut de calvaria de 5mm de diamètre.

- Concernant la MOT (moelle osseuse totale), la quantité de MOT à mettre au contact des BCP a été déterminée dans une étude précédente comme étant de 100 μ L pour 20mg de BCP.
- Concernant la FSV, la quantité de cellules nucléées utilisée dans les études publiées est très variable. Une seule avait été publié avec de la FSV humaine en modèle de calvaria (calvaria de souris James 2012).

	Etudes	Cellules	Modèle	Concentration cellulaire
Etudes <i>in vitro</i>	<i>Papadimitropoulos 2011</i>	FSV humaine	Culture 3D	10.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
	<i>Tchang 2015</i>	FSV humaine	Culture 3D	25.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
Etudes ectopiques	<i>Scherberich 2007</i>	FSV humaine	Sous-cutanée de souris	15.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
	<i>Müller 2009</i>	FSV humaine	Sous-cutanée de souris	15.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
	<i>Müller 2010</i>	FSV humaine	Sous-cutanée de souris	2.10 ⁶ CFU-F de FSV/cm ³
	<i>Güven 2011</i>	FSV humaine	Sous-cutanée de souris	15.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
	<i>Mehrkens 2012</i>	FSV humaine	Sous-cutanée de souris	10 ou 40.10 ⁶ cellules de FSV/cm ³
Etudes orthotopiques	<i>James 2012</i>	FSV humaine	Défaut calvaria de souris	0,250.10 ⁶ cellules de FSV dans un défaut de calvaria de 3mm

Tableau 17: Concentrations cellulaires utilisées dans les différentes études sur la FSV humaine en ingénierie tissulaire osseuse

Dans notre étude de comparaison nous avons choisi une concentration intermédiaire de :

- 3.10⁴ cellules par milligramme de BCP

- 15.10⁶ cellules/cm³

- soit l'équivalent de 0,5.10⁶ cellules de FSV dans un défaut de calvaria de 5mm.

La clonogénicité du prélèvement de FSV a été évaluée par CFU-F (colony forming unit – fibroblast) après isolation des cellules adhérentes cultivées pendant 3 passages et est de 26%. Cette valeur de clonogénicité est supérieure à 5% pour les CSA (Bourin et al. Cytotherapy 2013) qui représentent environ 10% des cellules de la FSV.

Il est important de noter que le comptage cellulaire est effectué au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez par un seul opérateur. Cette limite de contrôle qualité peut être résolue lors d'un éventuel passage en clinique par l'utilisation de compteurs cellulaires automatisés disponible sur le marché et déjà utilisé dans de nombreuses études cliniques.

Comme décrit dans l'article, les résultats sont en dessous de ceux espérés, notamment pour la greffe osseuse et l'association moelle osseuse totale/BCP, deux stratégies ayant donné de bons résultats dans un modèle similaire autologue chez le rat Lewis (Corre, Merceron et al. 2015). Ces résultats peuvent sans doute être imputés à la stringence du modèle de calvaria de rat nude.

Toutefois il est intéressant de remarquer que dans ce modèle de faible repousse osseuse, la FSV humaine donne des résultats similaires à la moelle osseuse humaine :

- de manière qualitative : os immature et légèrement minéralisé au contact des granules et présence de tissu médullaire visible en histologie
- de manière quantitative : 3.70% de tissu minéralisé au sein du défaut avec la FSV humaine et 2.74% avec la moelle osseuse totale humaine

Il serait donc intéressant de tester cette condition dans un modèle moins stringent.

D'un point de vue mécanistique, la présence de marquage DIL après 7 semaines au contact des granules semble indiquer une survie d'une partie au moins des cellules implantées dans ce modèle. Ce point reste à éclaircir pour valider ces résultats avec une technique plus spécifique (détection de séquences Alu spécifique des cellules humaines) et si possible déterminer si ces cellules vivantes ont été capable de se différenciés en cellules osseuse.

Résultats complémentaires :

En addition des stratégies comparées dans l'article (greffe osseuse humaine, moelle osseuse murine et humaine et FSV humaine), nous nous sommes aussi intéressés à l'association des mêmes BCP avec des CSM de moelle osseuse murine et humaine (CSM-MO), cultivées au contact des BCP pendant 15 jours en milieu ostéogénique.

En effet cette stratégie a démontré de bons résultats dans des études précédentes (Corre, Merceron et al. 2013, Corre, Merceron et al. 2015), à condition de respecter une concentration minimum de CSM sur les granules de BCP (Mankani, Kuznetsov et al. 2007).

Dans notre cas, les CSM-MO proviennent des moelles osseuses totales (murines et humaines) préalablement implantées. Les cellules sont cultivées à une concentration de 9.10^4 cellules/cm² soit $7.5.10^3$ cellules/mg de BCP (concentration critique décrite dans l'étude de Mankani et utilisée dans les précédentes études).

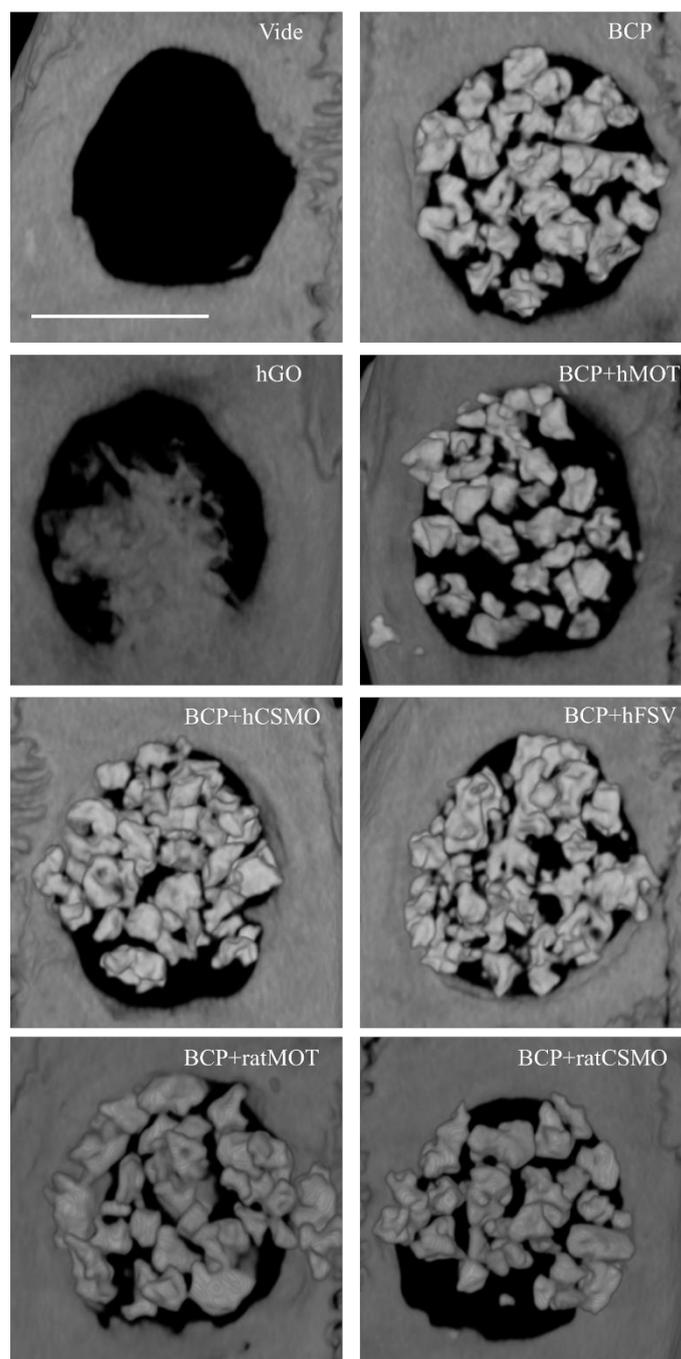
Cette étude a été réalisée sous la direction du Dr Pierre Corre, qui avait déjà étudié les CSM-MO de rat cultivées dans les mêmes conditions. Il était donc intéressant de comparer nos résultats avec les CSM-MO humaines à ceux précédemment obtenus.

Concernant les CSA humaines qui sont isolables de la FSV, même si leur étude aurait pu être intéressante, le but de notre travail était avant tout :

- de tester des stratégies intra-opératoires de régénération osseuse
- de comparer les résultats obtenus avec des cellules humaines à ceux précédents obtenus avec des cellules de rat Lewis.

Ainsi, dans les résultats complémentaires qui suivent se trouvent les CSM-MO (de rat et humaines) mais pas les CSA.

Les résultats obtenus avec ces CSM-MO sont résumés dans les figures suivantes :



*Figure 30: Microscanner des défauts de calvaria
7 semaines après implantation*

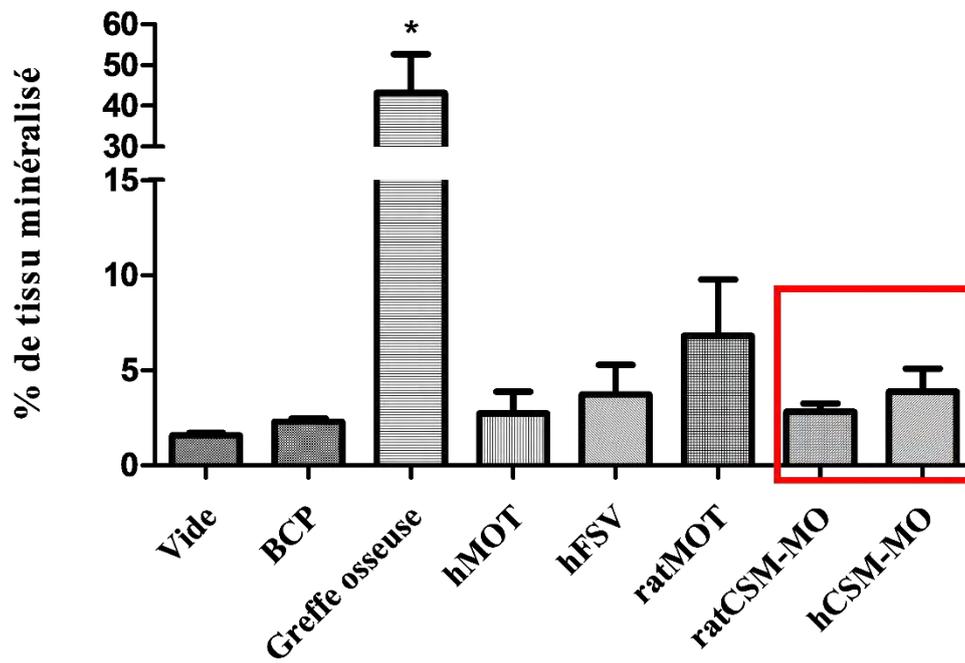
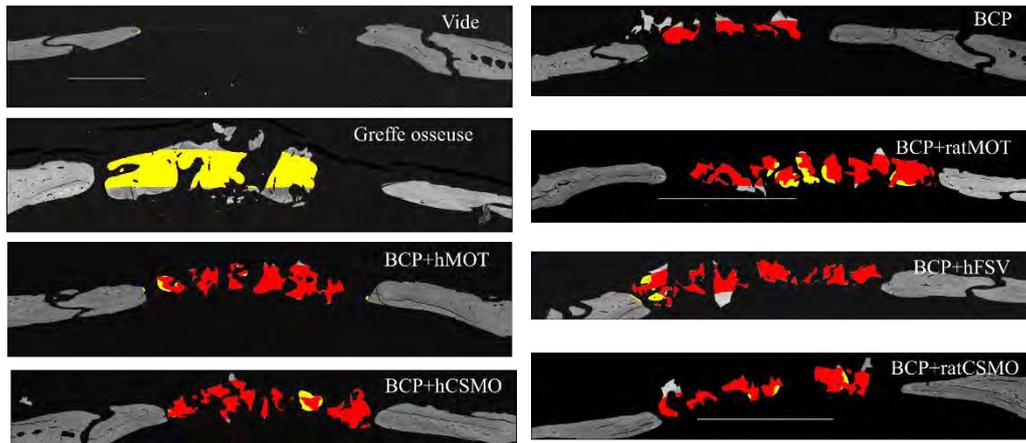


Figure 31: Analyse des défauts de calvaria en microscopie électronique à balayage et quantification du comblement en tissu minéralisé

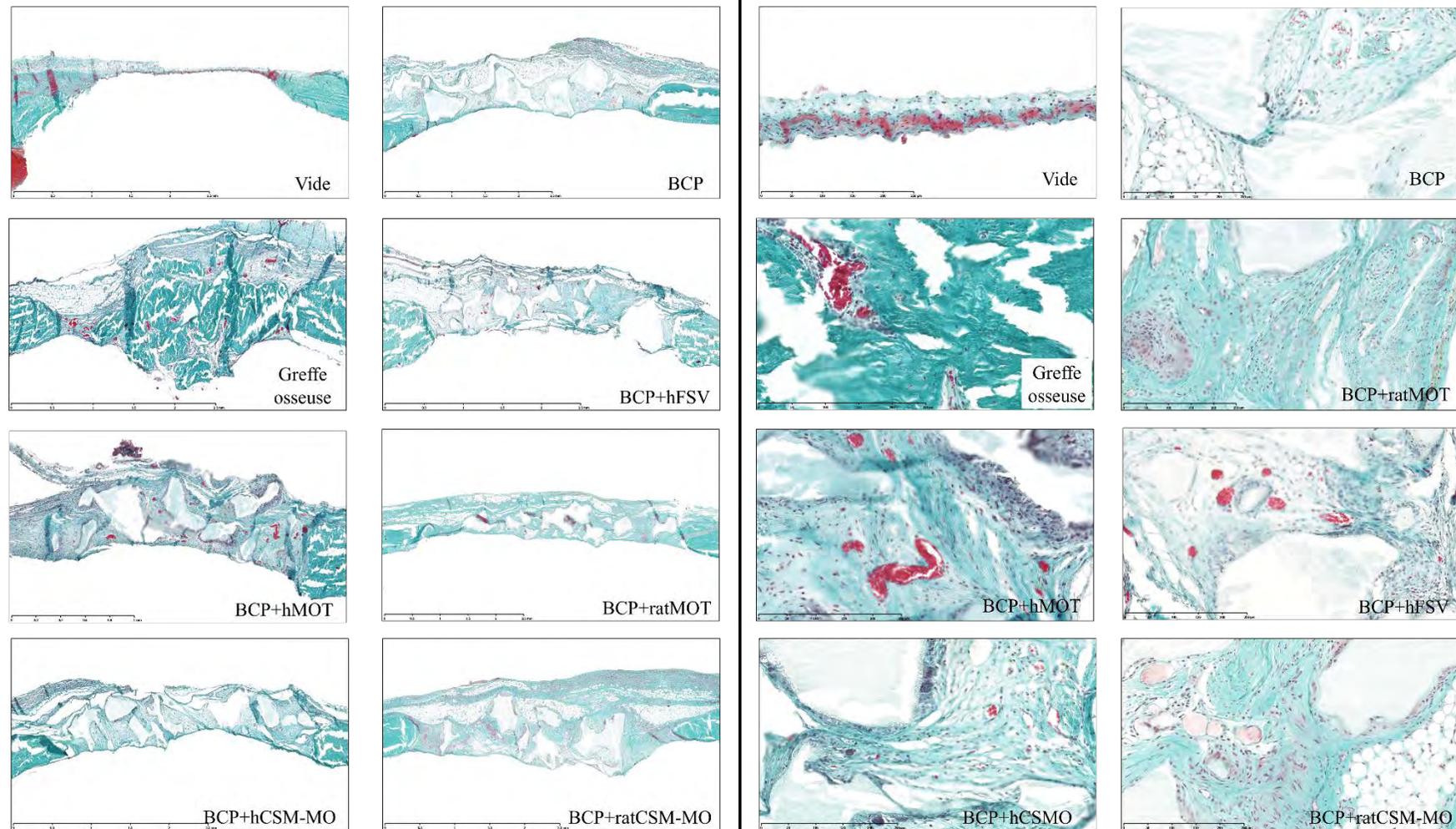


Figure 32: Analyse histologique des défauts de calvaria (Trichrome de Goldner),
Gauche: échelle=2,5mm, Droite: échelle=250µm

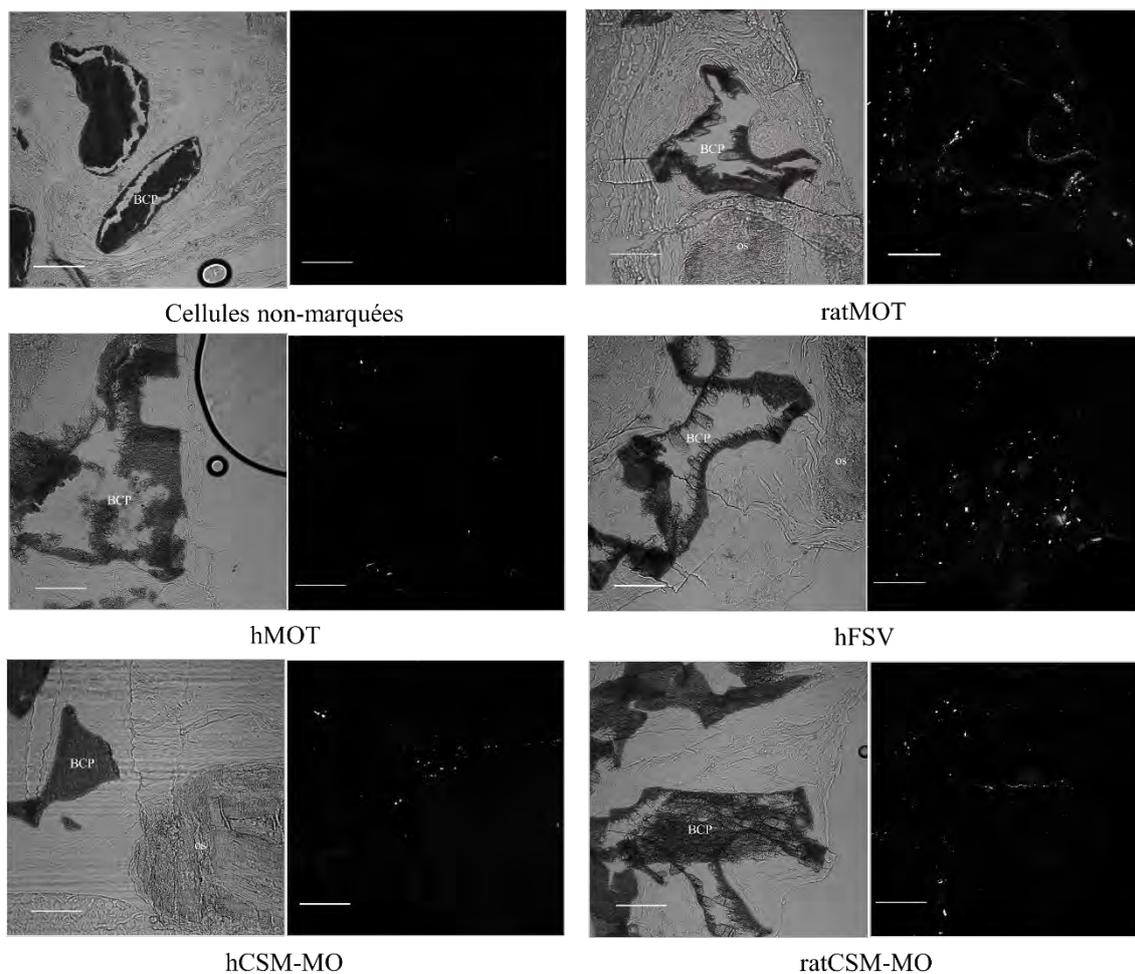


Figure 33: Observation microscopique des cellules implantées marquées au CM-DIL, Gauche: lumière transmise Droite: fluorescence

De manière générale, les résultats obtenus avec les CSM-MO murines ou humaines sont similaires à ceux obtenus avec la moelle osseuse totale dont les cellules ont été isolées :

- faible repousse osseuse
- marquage fluorescent CM-DIL suggérant la survie d'une partie des cellules après 7 semaines

Toutefois d'un point de vue histologique, il semble y avoir moins de tissu médullaire avec les CSM-MO qu'avec les MOT (moelle osseuse totale).

En conclusion, cette étude préliminaire avait pour but de comparer pour la toute première fois, en site osseux maxillo-facial, 3 stratégies intra-opératoire de régénération osseuse à partir de prélèvements d'origine humaine :

- La greffe osseuse humaine
- L'association de BCP avec de la moelle osseuse totale humaine
- L'association de BCP avec de la fraction stromale vasculaire de tissu adipeux humain

Nous avons dans notre modèle confirmé le fort potentiel du gold standard clinique : la greffe osseuse humaine.

Toutefois, malgré des résultats précédents encourageants avec la moelle osseuse totale de rat, son équivalent humain dans notre modèle de calvaria de rat nude a donné lieu à une faible repousse osseuse.

Comme discuté dans l'article, le modèle de calvaria de rat nude est un modèle très stringent donnant lieu à une faible repousse osseuse si aucun facteur de croissance (*i.e.* BMP2) n'est utilisé.

Les résultats obtenus avec la FSV humaine sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus avec la MOT humaine.

Avant de conclure sur le potentiel de la FSV, il nous a paru nécessaire d'étudier plus en détail celui-ci dans différents modèles (éctopique et en site osseux).

C'est pourquoi l'étude suivante nous avons détaillé le potentiel ostéoinducteur de la FSV en association à différents biomatériaux. Nous nous sommes placés dans un modèle ectopique d'implantation sous-cutané et dans un modèle orthotopique de défaut de calvaria dans une souche différente : les rats Wistar.

Cette étude est résumée dans le premier jet de publication suivante. Cette publication n'est pas totalement complète puisque les dernières analyses sont encore en cours.

D. Article: Bone regenerating potential of adipose tissue stromal vascular fraction for intraoperative bone tissue engineering

Abstract

Background: In craniofacial reconstruction, the gold standard procedure for bone regeneration is the autologous bone graft. However, this procedure requires bone harvesting which is still a source of morbidity. Bone tissue engineering strategies, combining bone substitutes with an osteogenic cell source might be a good alternative to this bone graft. The adipose tissue Stromal Vascular Fraction (SVF) can be used in a one-step procedure and have already been described as a potential osteo-vasculogenic cell source for tissue engineering. However there is currently not enough data of the bone regenerating potential of human SVF (hSVF). This study investigates the bone tissue engineering potential of hSVF for intra-operative bone tissue engineering strategies.

Methods: hSVF cells were implanted, in combination with biomaterials, in an ectopic model of subcutaneous implantation as well as in a calvaria model of critical-sized bone defect. hSVF cells were first used alone with the biomaterials. Then, the osteogenic potential of hSVF cells was stimulated by the addition of human PRP or different concentrations of human recombinant BMP2 (rhBMP2).

Results: The association of hSVF with either BCP granules or collagen sponge resulted in a small new bone formation. When PRP or decreasing concentrations of rhBMP2 was added to hSVF cells, the bone formation was slightly stimulated but did not reach a clinically relevant bone formation that can be obtained with clinical concentrations of rhBMP2.

Discussion: For the first time, the bone formation potential of hSVF cells was investigated in two pre-clinical models and compared to a relevant positive control (*ie* rhBMP2). We here show that hSVF present a slight osteoinduction potential. However, a better stimulation of SVF-based bone formation is yet to be obtained to represent an efficient alternative to the autologous bone graft.

Keywords: Tissue engineering, Stromal Vascular Fraction, Biomaterials, Craniofacial surgery, Platelet Rich Plasma, Bone Morphogenetic Protein

Original Article: Bone regenerating potential of adipose tissue stromal vascular fraction for intraoperative bone tissue engineering

Vincent Hivernaud^{1,2,3,5} Pierre Corre^{1,2,3,4} Guillaume Mouallem^{1,2,3,4} Paul Pilet^{1,2,3,4} Joëlle Véziers^{1,2,3,4} Sophie Sourice^{1,2,3} Régis Roche⁵ Jérôme Guicheux^{1,2,3,4} Pierre Weiss^{1,2,3,4}

Affiliations

¹ INSERM, LIOAD, UMR-S 791, Nantes, F-44042, France

² Université de Nantes, UMR-S 791, LIOAD, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

³ ONIRIS, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, F-44307, France

⁴ CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, F-44042, France

⁵ STEMCIS SAS, Cyclotron, 2 rue Maxime Rivière, Sainte Clotilde, 97490, La Réunion, France

Abstract

Background: In craniofacial reconstruction, the gold standard procedure for bone regeneration is the autologous bone graft. However, this procedure requires bone harvesting, a source of morbidity. Bone tissue engineering strategies might be a good alternative to bone graft. The adipose tissue Stromal Vascular Fraction (SVF) can be used in a one-step procedure and have already been described as a potential osteo-vasculogenic cell source for tissue engineering. However there is currently not enough data of the bone regenerating potential of human SVF (hSVF). This study investigates the bone tissue engineering potential of hSVF for intra-operative bone tissue engineering strategies.

Methods: hSVF cells were implanted, in combination with biomaterials, in an ectopic model as well as in a calvaria model of bone defect. hSVF cells were used alone and then combined with autologous human PRP in an attempt to enhance the cells osteogenic capabilities.

Results: The association of hSVF with either BCP granules or collagen sponge resulted in a small bone formation. When PRP was added to hSVF cells and BCP, the bone formation was slightly simulated but did not reach a clinically relevant regeneration that can be obtained with clinical concentrations of rhBMP2.

Discussion: For the first time, the osteoinduction potential of hSVF cells was investigated in two pre-clinical models and compared to a relevant positive control (rhBMP2). We here show that hSVF present a slight osteoinduction potential. However, a better stimulation of SVF-based bone formation is yet to be obtained to represent an efficient alternative to the autologous bone graft.

Keywords: Tissue engineering, Stromal Vascular Fraction, Biomaterials, Craniofacial surgery, Platelet Rich Plasma, Bone Morphogenetic Protein

1 *Introduction*

2

3 Autologous bone grafting (BG) is the current gold standard for all bone reconstruction in
4 cranio-maxillofacial surgery such as facial deformities, tumors or traumas[1]. Considering
5 morbidity of bone harvesting (pain, infections, scars, etc.) and non-negligible risk of bone
6 grafting failure (nasal and oral closeness, hypoplastic bone such as cleft palate or irradiated
7 areas), researches have been focused on finding an alternative to bone graft that can be used
8 intraoperatively. Bone tissue engineering using a bone substitute coupled with an osteogenic
9 cell source is of great interest in those situations where biomaterial alone is not sufficient to
10 induce bone formation.

11 Biphasic calcium phosphate (BCP) materials, due to their chemical composition and
12 mechanical properties, represent an interesting alternative to autologous bone grafting and is
13 already used mainly in oral and orthopedic surgery.

14 Mesenchymal Stromal Cells (MSC) are found in bone marrow or adipose tissue among other
15 tissues. The osteogenic differentiation potential of the MSC make them candidates for bone
16 tissue engineering. In this strategy, the osteogenic potential of MSC can be increased by
17 seeding the surface of the biomaterial, followed by a three-dimensional culture compared to
18 2D culture of MSC [2-4]. The use of MSC is complex, time consuming, needs two different
19 surgical procedures, has a significant cost and raises the problem of possible infection or cell
20 mutations during the *in vitro* amplification.

21 Unprocessed Total Bone Marrow (TBM) and Stromal Vascular Fraction of adipose tissue
22 (SVF) as sources of MSC [5, 6], vascular progenitor cells and growth factors are also possible
23 candidates for BTE [2, 7-9]. Moreover their harvesting and utilization is possible in a one-step
24 procedure.

25 Stromal Vascular Fraction (SVF) contains a greater proportion of MSC than TBM [10]. In
26 addition, numerous studies have been carried out on the osteogenic potential of the SVF but
27 only few dealt with human SVF or the association with BCP.

28 In this study the potential of human SVF in bone tissue engineering was assessed in two
29 animal models. In the first part the association of human SVF and BCP granules was
30 evaluated in a subcutaneous model in nude mice then in a rat calvaria defects. In the same
31 models, the same association was stimulated by the addition of Platelet Rich Plasma (L-PRP).
32 The SVF-based tissue engineering strategy was compared to BCP alone and to a positive
33 control (BCP+rhBMP2). The role of carrier was evaluated by comparing BCP granules to
34 collagen sponge, clinically used in combination with rhBMP2 in orthopedic surgery. The
35 bone reconstruction was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM), high resolution
36 Microcomputed Tomography and histological analysis.

37

38

39 *Material and Methods*

40

41 **Biomaterials**

42

43 Biphasic CaP particles made of hydroxyapatite (20%) and beta-tricalcium phosphate (80%)
44 with a size between 500 and 1000 μ m (MBCP⁺) were provided by Biomatlante (Vigneux de
45 Bretagne, France). Granules were sterilized at 121°C for 20 min in an autoclave.

46 Bovine type I collagen sponges were obtained from Truscient, Diboterminalfa (rhBMP-2) kit
47 (Pfizer, Paris, France).

48

49 **Animals**

50

51 All procedures were approved by the National French Comity for animal experimentations.

52 For subcutaneous implantations, eight weeks old female nude mice (Swiss nu/nu) were
53 obtained from a certified breeding center (Charles River, L'Arbresle, France).

54 For Wistar rat calvaria defects, eight weeks old female (RjHAN:WI) were obtained from a
55 certified breeding center (Janvier Labs, St Berthevin, France).

56 All animals were acclimatized for two weeks to the conditions of the local vivarium (24°C
57 and a 12/12h light/dark cycle) before the experimentations.

58

59 **Immunosuppressive treatment in Wistar rat study**

60

61 To prevent complications (transplant rejection or graft versus host disease) due to the
62 xenotransplantation of human SVF cells, an immunosuppressive therapy with cyclosporin-A

63 was administered. The model was previously validated and described[11]. This oral therapy
64 started the day of implantation and administered daily (15 mg/kg/day) until euthanasia.

65

66 **Stromal Vascular Fraction cells isolation**

67

68 Human SVF cells and blood samples were obtained from 7 female patients undergoing
69 liposuction. All patients had given their informed consent. All protocols were approved by the
70 French national ethical committee. Human SVF cells were isolated by collagenase digestion
71 of lipoaspirate as previously described [12]. Briefly, lipoaspirates were digested for 1h at
72 37°C with collagenase (NB4; Serva, Heidelberg, Germany). Digested tissue then was
73 centrifuged at 900g for 4min, and the cell pellet (stromal vascular fraction) was washed three
74 times with Ringer Lactate (B Braun Medical), then filtered through Steriflip 100µm
75 (Millipore, Molsheim, France). After centrifugation, cells were resuspended in saline solution
76 (Ringer Lactate). Cell number and viability were assessed by Trypan blue dye exclusion
77 (Trypan solution 0.02%; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

78

79 **rhBM P2 preparation**

80

81 A total of 0.66mg of rhBMP2 powder (TruScient, Pfizer) was resuspended in 3.2mL of
82 solvent (Pfizer) according to the manufacturer's instructions. This stock solution of 0.2mg/mL
83 was diluted to the working concentration for a final volume of 100µL for the hydration of
84 20mg (calvaria model) of BCP. For the hydration of type I collagen sponge, the final volume
85 was 100µL per disk of 5mm diameter.

86

87 **PRP preparation**

88

89 The Platelet Rich Plasma was prepared according to the manufacturer's instructions
90 (RegenLab, Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Briefly, whole blood was collected by a
91 venous puncture in two tube, the first one (BCT) contains an anti-coagulant (sodium citrate)
92 and the second tube (ATS) does not. Each tube contains a gel to separate red blood cells by
93 centrifugation. The BCT tube is centrifuged once at 1500g for 5min. The ATS tube is
94 centrifuged twice at 1500g for 5min. The cellular deposit contained in the upper phase of the
95 BCT tube is resuspended in the supernatant to obtain PRP. The upper phase of the ATS tube
96 contains the activated thrombin serum. To obtain a PRP gel, a mix is done with 80% PRP,
97 10% activated thrombin serum and 10% calcium gluconate.

98

99 ***In vitro* constructs analysis**

100

101 Eight milligram of BCP or small cuts of collagen sponges where associated with $0.5 \cdot 10^6$
102 freshly isolated hSVF cells. Cells were resuspended in PRP (final volume: 100 μ L) and the
103 constructs were cultured in ultra-low attachment multiwells to promote the adhesion to the
104 biomaterials. Constructs were then cultured in an osteogenic medium (DMEM medium
105 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 1%
106 penicillin/streptomycin, β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich) 10mM, sodium-L-ascorbate
107 (Sigma-Aldrich), 50 μ M and dexamethasone (Sigma-Aldrich) 10^{-8} M) for 60 days at 37°C,
108 21% O₂ and 5% CO₂. For histological studies, construct were fixed in 4% paraformaldehyde,
109 decalcified in PBS, 4% EDTA in a microwave automat (KOS Milestone) at 46°C during 36
110 hours. After multiple rinses in PBS, sample were dehydrated and embedded in paraffin, 5 μ m
111 sections were cut and histological coloration were performed.

112

113 **DNA quantification assay**

114

115 To test whether the hSVF cells can adhere to BCP granules, $0.5 \cdot 10^6$ freshly isolated hSVF
116 cells were added to 8 milligrams of BCP granules in low-adherence plastic plates. Cells were
117 cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1%
118 penicillin/streptomycin. Culture was stopped at 30min, 2h and 24hours and wells were rinsed
119 several times with a PBS solution. The DNA content of adherent cells was assessed with a
120 PicoGreen assay kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Fontenay-sous-Bois, France).
121 Briefly, cells were froze in the lysis buffer at -80°C . Upon thaw, the working solution of
122 Quant-iT™ PicoGreen® was added to each wells and incubated at room temperature, protected
123 from light, for 2 to 5 min. The fluorescence was measured by a spectrophotometer (Viktor³,
124 PerkinElmer, Boston, USA) (485nm excitation, 520nm emission) and results were compared
125 to a DNA standard curve.

126

127 **Scanning Electron Microscopy of BCP granules**

128

129 To confirm that hSVF cells can be found at the surface of BCP granules after several weeks,
130 hSVF were cultured for 21 days on BCP granules in an osteogenic medium for 3 weeks at
131 37°C , 21% O_2 and 5% CO_2 . After 21 days, BCP granules were rinsed, harvested and fixed
132 with acetone. Then acetone was replaced by supercritical carbon dioxide to preserve living
133 tissue structure. Samples were then observed by scanning electron microscopy. SEM
134 micrographs were taken using backscattered electrons at 15kV

135

136 **Mitochondrial activity MTS assay**

137

138 To test whether BCP granules or PRP influenced the viability of hSVF cells, these cells were
139 cultured with or without BCP granules and with or without autologous PRP for 24 hours.
140 Mitochondrial activity was measure by a MTS assay. Briefly, cells were culture without BCP
141 in cultured treated plastic or with BCP in low adhesion plastic plates, with or without
142 autologous PRP. A control of cells cultured with actinomycin D (5mg/mL), an inhibitor or
143 RNA polymerase which was used to induce cell death. After 24h of culture, medium was
144 replaced by MTS solution. Finally, formazan salt formation was measured by
145 spectrophotometer at 490nm.

146

147 **Conditions of bone tissue engineering with SVF cells**

148

149 *Non-stimulated SVF:*

150 - BCP+hSVF: BCP granules (50mg for subcutaneous implantation and 20mg for calvaria
151 defects) were mixed with human SVF cells at a concentration of 40×10^6 cells/cm³ (3.6×10^6
152 and 1.5×10^6 in subcutaneous pocket and in calvaria defect respectively).

153 *Stimulated SVF*

154 - BCP+hSVF/PRP: To mix the cells with the PRP gel, the cell pellet is resuspended in the
155 PRP phase first, then the activated thrombin serum and the calcium gluconate are added. The
156 obtained solution is mixed with BCP granules before gelification that happens in a few
157 minutes.

158

159 **Surgical procedure**

160

161 All surgical procedures were performed under general anesthesia (4% isoflurane inhalation
162 for induction and 2% for preservation). For cell-based procedures, cell preparations were put

163 in contact with the biomaterial (BCP or Collagen sponge) for at least 30 min at room
164 temperature prior to implantation.

165

166 *Subcutaneous implantations*

167 The samples were implanted subcutaneously in the backs of nude mice. Briefly, a 1cm
168 transverse incision was made bilaterally along the dorsum of the back. Blunt dissection was
169 performed to separate the skin from the subcutaneous connective tissues and to form several
170 pockets under the skin into which implants were inserted. Each mouse received 3 randomly
171 assigned implants (n = 6 per condition). Implants were removed right after sacrifice via CO₂
172 overdose, eight weeks after implantation.

173

174 *Critical sized calvaria defects*

175 A 1.5cm longitudinal incision was performed on the head from the front to the neck. Skin and
176 periosteum were retracted to expose the calvaria. A circular critical-sized parietal bone defect
177 (5mm in diameter) was created bilaterally on each side of the sagittal suture using a circular
178 trephine (Komet Medical, Lemgo, Germany) under infusion of normal saline solution until
179 the dura was reached. Each rat received two randomly assigned implants (n=8 per condition).
180 After grafting, the defects were covered by a bovine pericardial patch (Edwards Lifesciences,
181 Irvine USA) to prevent a postoperative migration of the particles. Then the skin was closed
182 with absorbable sutures. Immediate postoperative analgesia was provided through
183 intramuscular injection of buprenorphine hydrochloride (Buprecare® 0.3mg/mL, 10µg/kg,
184 Animalcare, Dunnington, UK). Empty defects and defects filled with BCP only were used as
185 negative control. For positive control type I collagen sponge, or BCP granules soaked with
186 rhBMP2 (TruScient®, Pfizer) was used. Type I collagen sponge were cut into disks of 5mm
187 diameter and soaked with rhBMP2 (26.4µg/cm³) according to manufacturer instruction. For

188 BCP granules, 20mg of BCP were soaked with rhBMP2 (30 μ g/cm³). Implants were removed
189 right after sacrifice via CO₂ overdose, eight weeks after implantation.

190

191 **Micro-computed tomography and 3D image analysis**

192

193 Explants from subcutaneous studies and calvaria studies were fixed 24h and 7 days
194 respectively in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline. After fixation, PFA was
195 replaced by 70° ethanol and analyzed by micro-computed tomography using the high
196 resolution X-ray micro-CT imaging SkyScan-1272 (SkyScan, Aartselaar, Belgium). The
197 acquisitions were made at 70kV, 166mA with an image pixel size of 5 μ m (image with 1337
198 rows and 3840 columns). Three-dimensional reconstructions were built with NRecon software
199 and region of interest and 3D volume calculs were made with CTan software to assess 3D
200 bone regeneration and neovascularization.

201

202 **Histological preparation**

203

204 Samples were dehydrated through graded series of ethanol treatments then defatted in xylene
205 for 24h. All samples were embedded in Technovit 9100N (Heraeus-Kulzer, Friedrichsdorf,
206 Germany) as described previously [11]. For each sample, a section was performed at the
207 center of each implant using a circular diamond saw (SP1600, Leica, Wetzlar, Germany) and
208 serial 5 μ m thick sections were cut using a hard tissue microtome (Polycut SM 2500, Leica,
209 Wetzlar, Germany).

210

211 **Cell tracking – In Situ Hybridization Alu sequence**

212

213 **Scanning electron microscopy (SEM) and 2D image analysis**

214

215 Samples were sanded on a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) then gold-palladium-
216 coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA). SEM micrographs were taken
217 using backscattered electrons at 15 kV. The surface of the implant was divided into
218 contiguous high-resolution images, and quantitative evaluation was performed with a
219 semiautomatic image analyzer (Quantimeter 500, Leica, Cambridge, UK). First, the area of
220 interest was traced. Areas of newly formed mineralized bone, BCP granules, and non-
221 mineralized tissues were identified by their grey levels and expressed as a percentage of the
222 total defect surface.

223

224 **Statistical analysis**

225

226 Results were expressed as mean \pm SEM (Standard Error of the Mean). Results were then
227 compared using a One Way ANOVA parametric test and a Bonferroni's Multiple Comparison
228 Test. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

229 *Results*

230

231 ***In vitro* study of tissue engineering constructs**

232

233 *Adhesion of adipose stromal cells on BCP*

234

235 The use of BCP with different cell sources (Bone Marrow-MSC, Total Bone Marrow and,
236 Stromal Vascular Fraction) has already been described by our team [2, 13]. In this study we
237 confirmed that human SVF cells, isolated from 2 donors, can adhere to granules if left in
238 contact with BCP for several hours. Figure 1A shows the DNA content of cells plated and
239 washed on treated plastic culture (white bars) or on BCP granules in untreated plastic wells
240 (black bars).

241 The SEM analysis of hSVF cells cultured on BCP for 21 days shows cells adhesion to the
242 granules with visible cytoplasmic extensions (Figure 1B).

243

244 *Viability of SVF cells with BCP and PRP*

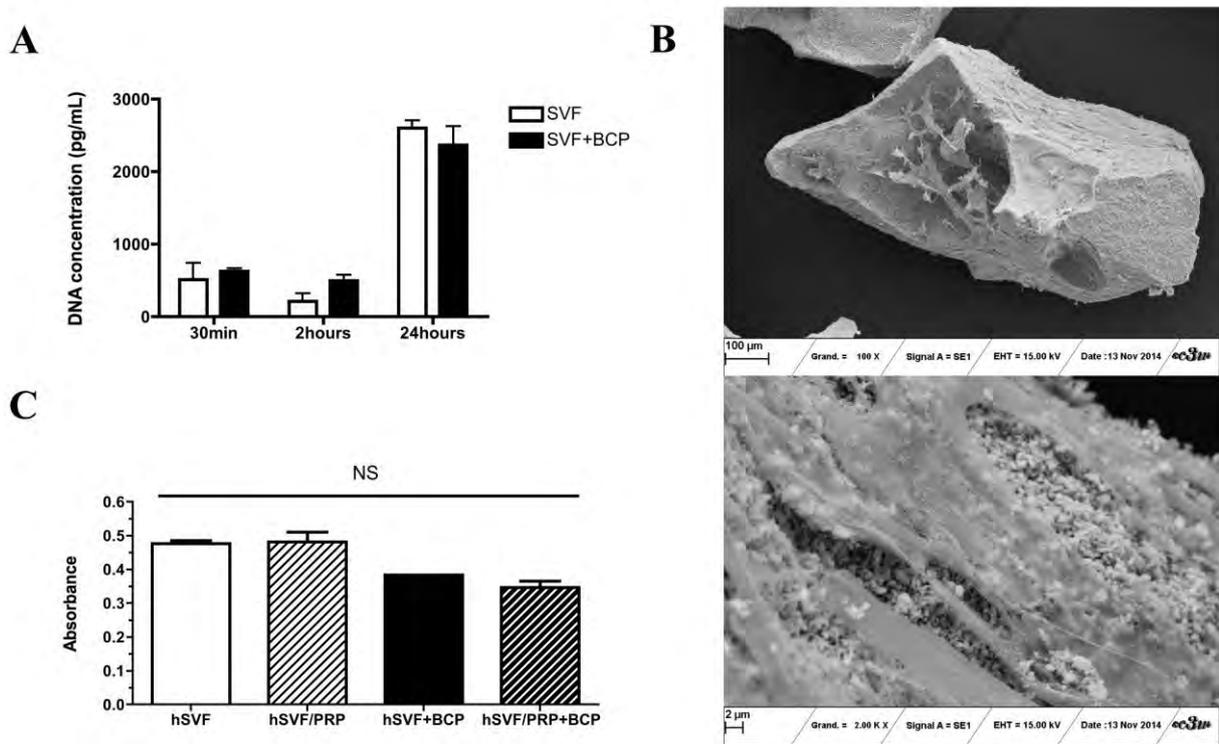
245

246 The short term viability of hSVF cells in contact with BCP granules and autologous PRP was
247 assessed at 24 hours with a mitochondrial activity assay. In Figure 1C the results indicates no
248 decrease in mitochondrial activity when cells were cultured in contact with BCP or PRP.

249

250

Figure 1



251

252 **Figure 1:** A, DNA content after culture of hSVF cells in two dimensions or in contact with
253 BCP for 30min, 2hours or 24hours. B, SEM analysis of hSVF cultured on BCP granules for
254 21 days. C, Mitochondrial activity (MTS) assay of hSVF cells cultured for 24 hours with PRP
255 or/and BCP granules. NS: non-significant.

256

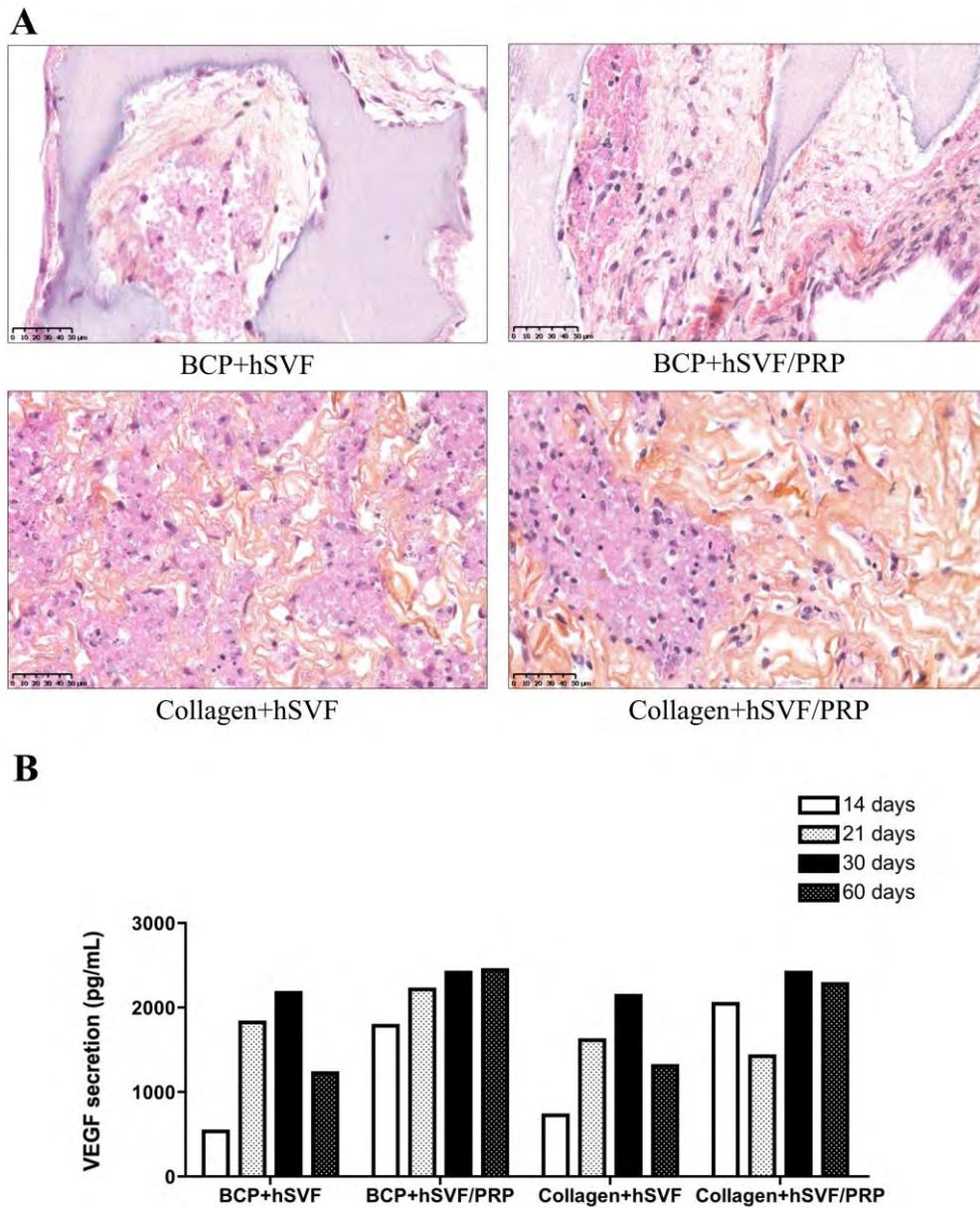
257 *In vitro* culture of biomaterial/SVF cells constructs

258

259 As an *in vitro* model of our implanted conditions, SVF cells were cultured during 60 days on
260 BCP granules or collagen sponge in an osteogenic medium. Histological analysis (Figure 2A)
261 show cells all over the construct and dense matrix deposition with no sign of calcification.
262 ELISA assay of culture's supernatant (Figure 2B) shows VEGF secretion from 14 to 60 days
263 in all conditions and a more continuous secretion at 60 days when SVF cells are associated
264 with PRP.

265

Figure 2



266

267 **Figure 2:** A, Histological staining (HES) of an *in vitro* model of hSVF cells culture. Cells
268 were cultured during 60 days on BCP granules or on collagen sponges with or without
269 autologous PRP. Bar = 50µm. B, VEGF secretion in supernatant of hSVF cultured on BCP
270 granules or collagen sponge with or without autologous PRP was quantified by ELISA.

271

272 **In vivo study of SVF-based bone tissue engineering**

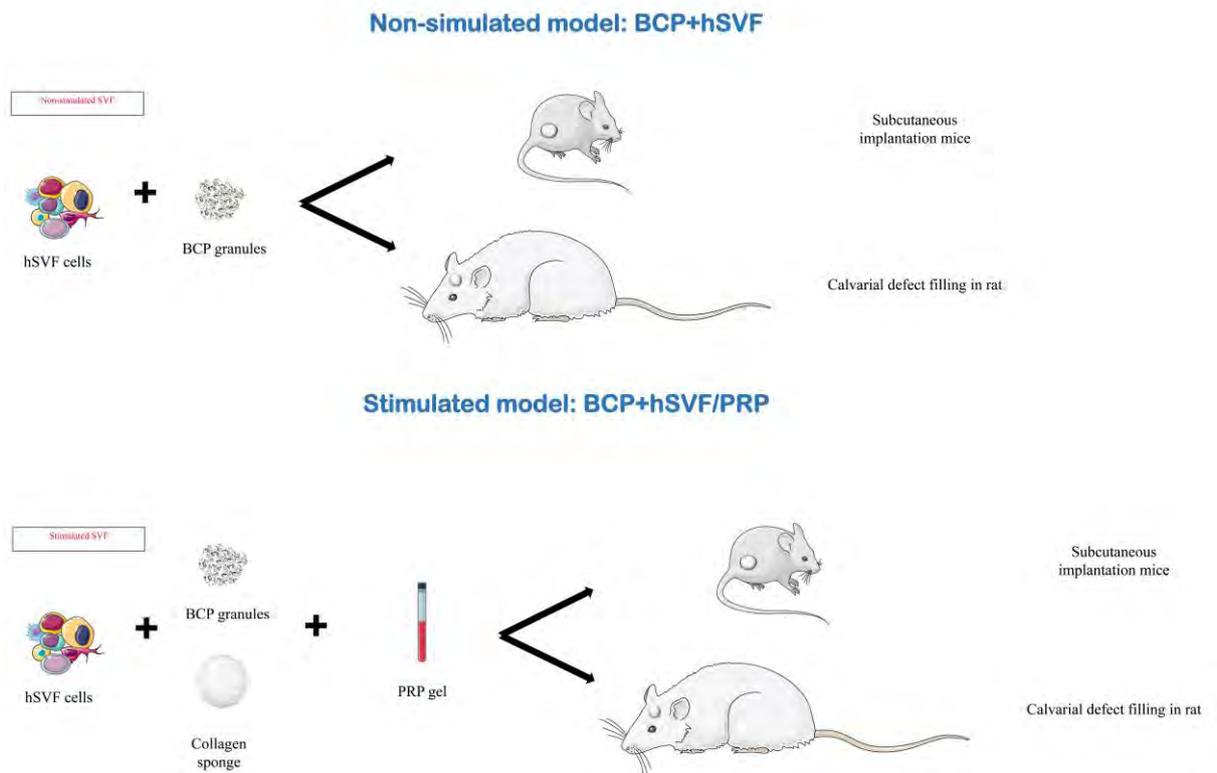
273

274 The Figure 3 is a schematic representation of the SVF-based BTE procedures used in this

275 study.

276

Figure 3



277

278 **Figure 3:** Schematic representation of *in vivo* studies to determine the bone regeneration

279 potential of hSVF cells used in intra-operative bone tissue engineering strategies.

280

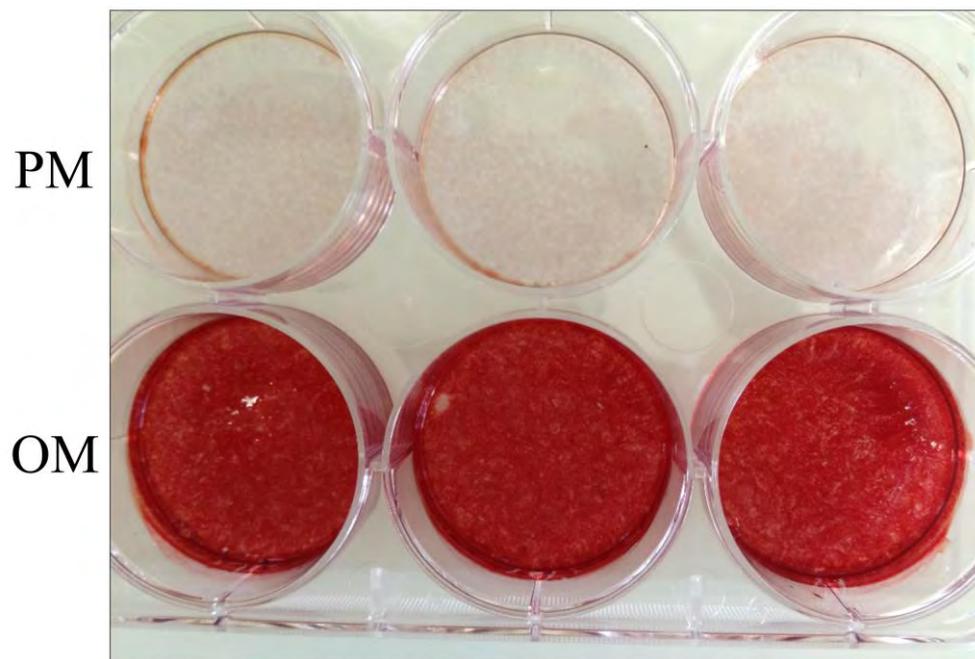
281 *Characterization of hSVF adherent cells*

282

283 In the *in vivo* study, hSVF cells were isolated from 5 donors. After 24 hours of adhesion on
284 plastic, Adipose Stromal Cells (ASC) were isolated. The matrix calcification potential of
285 these cells cultured in an osteogenic medium for 28 days was assessed by alizarin red staining
286 (Figure 4). The average clonogenicity rate was $17.3\% \pm 5.3$ (assessed by Colony Forming
287 Unit – Fibroblast assay).

288

Figure 4



289

290 **Figure 4:** Representative osteogenic potential of hSVF adherent cells assessed by alizarin red
291 staining after 28 days of cell culture in proliferation (PM) or osteogenic (OM) medium.

292

293 **SVF bone tissue engineering**

294

295 *Subcutaneous study*

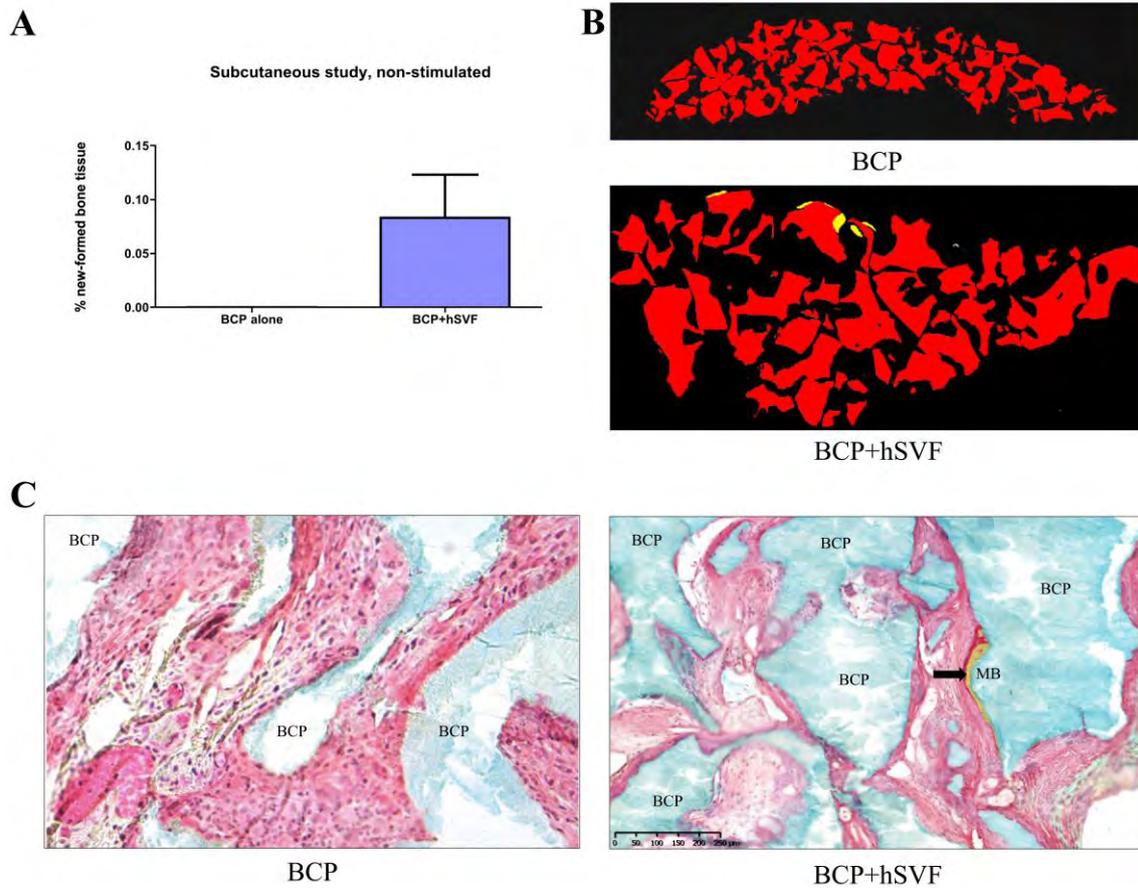
296

297 The association of BCP with hSVF cells was compared to BCP alone in an ectopic model of
298 subcutaneous implantation. In addition we compared the association of BCP with rat
299 total/unprocessed bone marrow, strategy already described for its osteoinduction potential.

300 The bone neoformation rate, assessed by SEM quantification was 0.083% for hSVF and no
301 mineralized tissue was found in the BCP alone condition. Histological analysis displays a
302 dense collagenous matrix surrounding the granules with some mineralization bone (MB) areas
303 for the hSVF condition (Figure 5).

304

Figure 5



305

306 **Figure 5:** Non-simulated hSVF based bone tissue engineering in an ectopic model of
307 subcutaneous implantation. A, Newly formed bone quantification by SEM analysis. * $p < 0.05$
308 compared to empty and BCP alone, # $p < 0.05$ compared to BCP+rhBMP2. B, SEM imaging of
309 subcutaneous implants showing the BCP in red and the newly formed bone in yellow. C,
310 Histological staining (MOVAT) of subcutaneous implants, black arrow showing an osteoid
311 border structure. Abbreviations: BCP: biphasic calcium phosphate granules, BM: bone
312 marrow, MB: mineralized bone. Bar = $250\mu\text{m}$.

313

314 *Rat calvaria study*

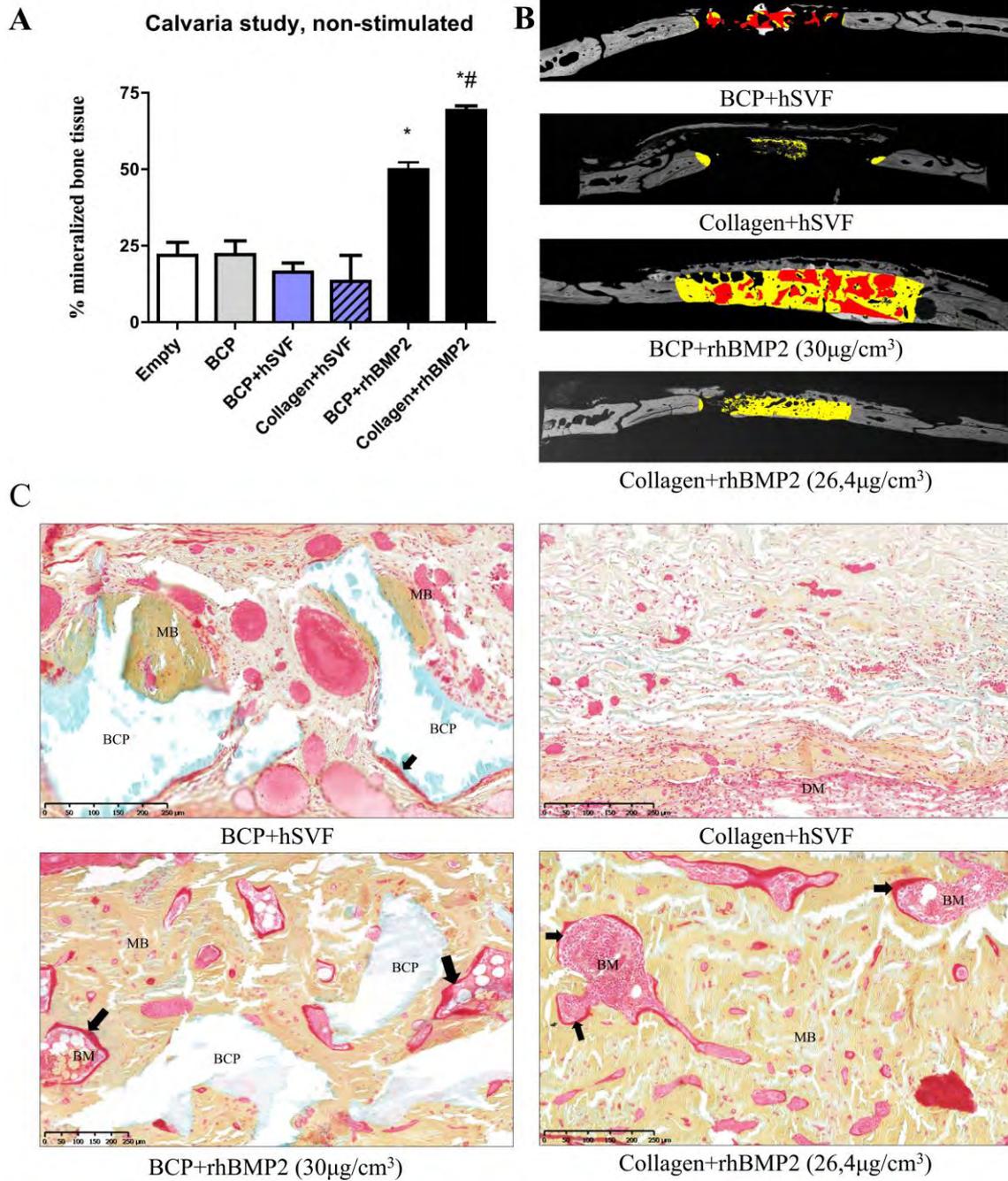
315

316 The association of hSVF with BCP granules was implanted in a critical-sized calvaria defect.
317 Bone content of the defects was quantify, 8 weeks after implantation, by micro-computed
318 tomography and SEM analysis (Figure 6A and 6B). The results confirmed the bone formation
319 potential of hSVF, with mineralized bone areas (Figure 6C) in contact with granules and even
320 an osteoid border structure (black arrow). Same amount of mineralized tissue was found when
321 hSVF cells were associated with collagen sponge. Nevertheless, histological analysis show a
322 fibrous tissue with no real signs of ossification although a woven bone tissue seemed to
323 appear in contact with the dura matter. However the same biomaterials combined with clinical
324 concentration of rhBMP2 were the only tested conditions reaching significant mineralized
325 tissue filling compared to the controls (49.2% for BCP+rhBMP2 and 69.2% for
326 collagen+rhBMP2). In both rhBMP2 conditions, a high mineralized bone content with several
327 osteoid borders in contact with bone marrow (BM).

328

329

Figure 6



330

331 **Figure 6:** Non-simulated hSVF based bone tissue engineering in an orthotopic model of
332 calvaria defect. A, Bone regeneration quantification by micro-computed tomography analysis.

333 B, SEM imaging of calvaria showing the BCP in red and the bone tissue in the region of

334 interest in yellow. C, Histological staining (MOVAT) of calvaria defects, black arrows

335 showing osteoid borders. Abbreviations: BCP: biphasic calcium phosphate granule, BM: bone
336 marrow, DM: *dura mater*, MB: mineralized bone. Bar = 250µm.

337

338 **Stimulated SVF bone tissue engineering**

339

340 To stimulate the bone formation abilities of hSVF, PRP was added to the BCP+hSVF
341 condition, which gave the most bone formation in histological analysis. This stimulated
342 condition of BCP+hSVF/PRP was compared in the same previous models.

343

344 *Subcutaneous study*

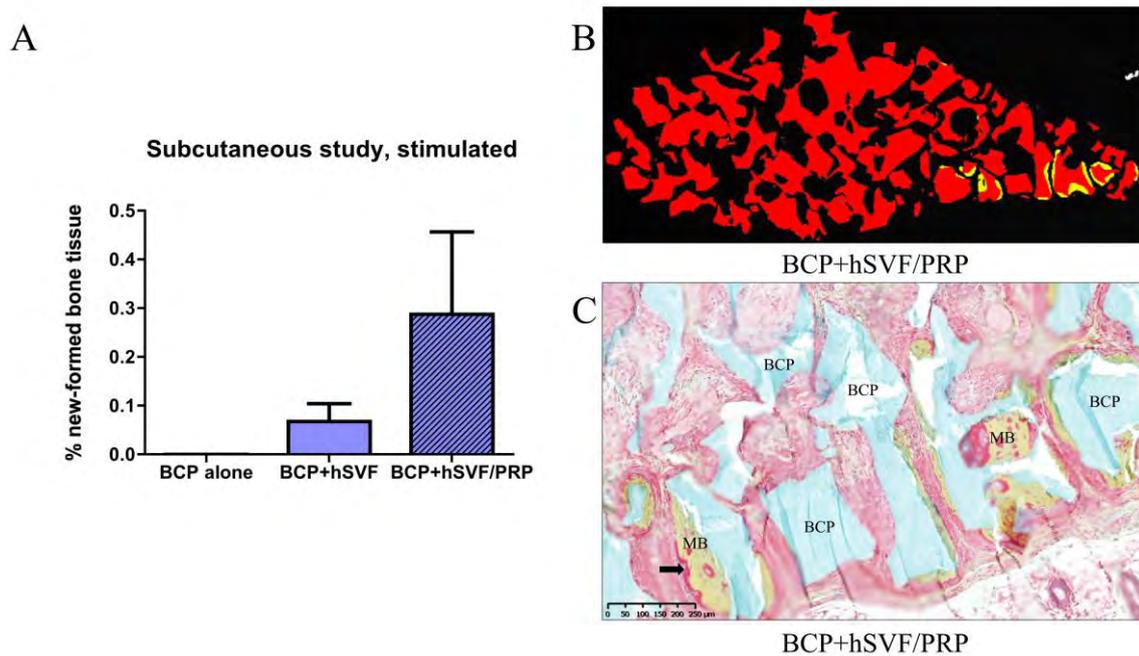
345

346 The results of the subcutaneous implantation are presented in Figure 7. The quantification
347 (Figure 7A) of new-formed mineralized bone tissue was obtained from SEM analysis (Figure
348 7B) and shows a slight bone formation for the condition with hSVF/PRP. Histology (Figure
349 7C), confirmed that the addition of PRP to hSVF gave rise to mineralized bone (MB) areas,
350 osteoid borders (black arrows) and, even bone marrow (BM) structures inside mineralized
351 sites. Even though, no significant difference was found between hSVF with or without PRP in
352 term of bone quantification.

353

354

Figure 7

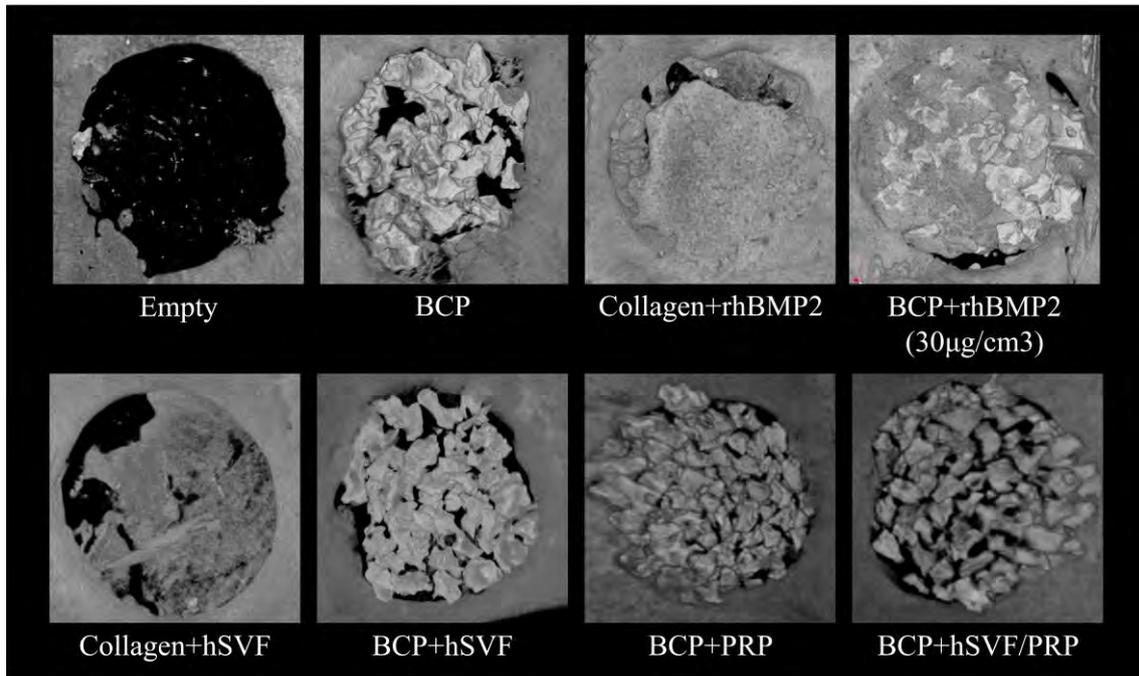


355

356 **Figure 7:** Simulated hSVF based bone tissue engineering in an ectopic model of subcutaneous
357 implantation. A, Newly formed bone quantification by SEM analysis. * $p < 0.05$ compared to
358 other conditions. B, SEM imaging of subcutaneous implants showing the BCP in red and the
359 newly formed bone in yellow. C, Histological staining (MOVAT) of subcutaneous implants,
360 black arrows showing osteoid borders. Abbreviations: BCP: biphasic calcium phosphate
361 granules, MB: mineralized bone. Bar = 250 μ m.

362

Figure 8



363

364 **Figure 8:** Macroscopic imaging (micro-computed tomography) of calvaria defect filled with
365 hSVF based bone tissue engineering, 8 weeks after implantation.

366 *Rat calvaria study*

367

368 The addition of PRP to BCP+hSVF was tested in the orthotopic calvaria model. Figure 8
369 resumes the macroscopic evaluation of defect closure in all tested conditions (hSVF,
370 hSVF/PRP and controls). We can see the BCP granules still inside the defects with no visible
371 signs of degradation. The collagen+hSVF condition showed a calcification of the bovine
372 pericardial patch on the top of the defect, but low signs of ossification inside the defect.

373

374 The quantification of bone content, SEM and histological images are presented in Figure 9.

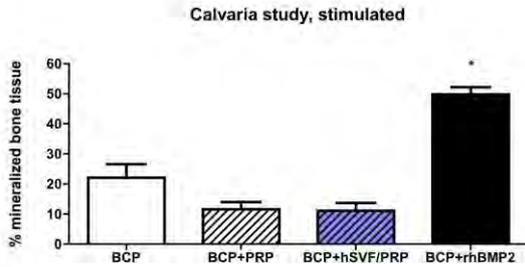
375 Concerning bone content quantification (Figure 9A), the combination of hSVF and PRP on
376 BCP granules resulted in no significant difference in term of mineralized tissue formation.

377

Figure 9

A

B



C

BCP+PRP

BCP+hSVF/PRP

BCP+PRP

BCP+hSVF/PRP

378

379 **Figure 9:** Simulated hSVF based bone tissue engineering in an orthotopic model of calvaria

380 defect. A, Bone regeneration quantification by micro-computed tomography analysis. B, SEM

381 imaging of calvaria showing the BCP in red and the bone tissue in the region of interest in

382 yellow. C, Histological staining (MOVAT) of calvaria defects, black arrows showing osteoid

383 borders. Abbreviations: BCP: biphasic calcium phosphate granules, MB: mineralized bone,

384 WB: woven bone. Bar = 250 μ m.

385

386

387 Histology of BCP+PRP and BCP+PRP+hSVF in progress

388

389 (Figure 9C).

390

391 *Tracking of human cells and implication in regeneration*

392

393 Tracking of human cells in the BCP+PRP/hSVF at 2 and 8 weeks in progress

394

395 (Figure 10)

396

397 *Discussion*

398

399 Human adipose tissue stromal vascular fraction (hSVF) is a cell source of great interest in
400 regenerative medicine [14-16]. However, little is known about its bone forming capacities in
401 tissue engineering strategies, most of the studies were conducted *in vitro* or in ectopic
402 implantation [9, 17-22]. In this study, we evaluated different hSVF-based strategies to
403 regenerate bone tissue in a clinically relevant context of maxillofacial bone loss. Indeed, in
404 case of facial malformations, trauma or tumor resection there is nowadays no reproducible
405 alternative to the autologous bone graft (BG). The bone graft is leading to good results in
406 most of the cases, however it is synonym of high morbidity (pain, scar, infection) and can lead
407 to failure in hypoplastic area (clef palate syndromes, scaring tissue...).

408

409 The bone tissue engineering is the concept of associating biomaterials (naturals or synthetics)
410 with an osteocompetent cell source, with or without other factors such as growth factors.
411 Among bone biomaterials, Biphasic Calcium Phosphate (BCP) have shown good results with
412 bone marrow and mesenchymal stem cells (MSC) [2]. However in the research of an intra-
413 operative alternative to BG, the use of MSCs seems compromised. Concerning unprocessed
414 Total Bone Marrow (TBM), although giving strong bone formation in pre-clinical studies [2,
415 8], its use is synonym of donor site morbidity and can be obtained in less amount than fat
416 tissue.

417

418 In this clinical context of maxillofacial bone loss, the use of hSVF could be advantageous for
419 (1) its easily availability in most patient, (2) its intra-operative potential use and, (3) its
420 vasculo-osteogenic content thanks to mesenchymal stromal cells and endothelial progenitors
421 [23]. The hypoplastic context of several maxillofacial applications increases the interest in

422 cell sources with an angiogenic potential to bring back vascularization to the defect. The
423 hSVF with or without PRP is able to secrete pro-angiogenic factors like VEGF [24] and then
424 promote cell survival and host cells homing.

425 In this study we investigated for the first time the hSVF intra-operative osteoinductive
426 potential, alone or stimulated by PRP, in two well described models of bone formation.

427

428 The first strategy of bone tissue engineering consisting of hSVF in association with BCP
429 granules resulted in some mineralization in the ectopic model of subcutaneous implantation.

430 Those results in an ectopic model showed the osteoinduction potential of human SVF cells in
431 combination with BCP granules and are in accordance with previous results in a similar
432 model with other biomaterials, with no culture or simulation of the cells (Müller 2010).

433

434 However the same association was used to fill a calvaria defect, the obtained bone formation
435 was not statistically different than the biomaterial alone. To enhance the relevance of this
436 observation, hSVF was combined to another biomaterial (collagen) clinically used for bone
437 regeneration. The same amounts of calcified tissue were observed. Only the use of an
438 orthopedic concentration of rhBMP2 resulted in a significant closure of the defect. Those
439 results in a bone defect are consistent with the only previous report on the utilization of hSVF
440 cells (with an HA coated PLGA scaffold) in a bone model [25] which was already a calvarial
441 one. Our previous results in nude rat calvaria were also in agreement with the presented study.
442 Even if in each case some mineralization can be found with hSVF cells in association with
443 biomaterials, the strategy fails to significantly heal the defect.

444

445

446 Nevertheless, presented results and previous knowledge concerning human SVF were
447 obtained in calvarial defects. Whether or not the osteoformation obtained from these cells
448 would be the same in a long bone defect, involving endochondral ossification for example,
449 remains to be investigated.

450

451 It has been suggested that the osteogenic potential of hSVF cells can be stimulated, for
452 example, by the addition of rhBMP2 [18], or by short term culture in bioreactors [17].

453 However, the use of growth factor in human maxillofacial surgery is debatable as far as
454 adverse effects has been reported, such as inflammatory reactions, graft failure and infections
455 [26, 27]. Finally our aim here was to investigate the intra-operative bone regenerative
456 potential of SVF cells, proscribing the use of culture conditions, even though it seemed of
457 great interest.

458

459 Knowing that, in the second strategy, our team aimed to stimulate the osteogenic potential of
460 hSVF, while remaining in a clinically relevant intra-operative strategy.

461 The PRP was used to allow the creation of a biological hydrogel to maintain cells at contact
462 with biomaterial during the first hours after implantation. Moreover, the PRP is releasing
463 growth factors from alpha-granules, notably pro-angiogenic factors like VEGF which could
464 improve neoangiogenesis and then survival of implanted cells [28, 29].

465

466 The addition of autologous PRP to hSVF cells did rise the bone formation observed in the
467 ectopic model. Although the difference in bone formation was not significant, histological
468 analysis, seemed to show the apparition of a marrow like structure inside mineralized area,
469 suggesting at least the vascularization of the neoformed bone.

470 However, just like in the first strategy, the association of BCP granules, SVF cells and PRP
471 failed to reach significant bone formation in the calvarial defect.

472

473 It would now be interesting to quantify the neovascularization in this condition to investigate
474 if the association of SVF with PRP was able to stimulate the angiogenesis inside the defect. In
475 our study we only checked the bone formation at 8 weeks, a commonly accepted timing for
476 bone formation in this model. However in the eventuality that PRP+SVF stimulated
477 angiogenesis it would be interesting to check at a later time point to see if endogenous
478 progenitors can use this newly formed vessels to infiltrate the tissue and enhance the bone
479 formation.

480

481 Previous reports on MSC-based bone tissue engineering suggested that the cell concentration
482 is essential to obtain sufficient bone formation [4]. Concerning SVF intra-operative strategies,
483 the expansion of cells is not conceivable, making cell concentration a limit. In our study,
484 based on previous results from our team and literature data [18] we used a concentration of 40
485 million of cells per cubic centimeter of construct. This concentration is equivalent to the use
486 of approximately 40cc of adipose tissue [30] to reconstruct 1cc of bone defect and which
487 seems clinically relevant.

488

489 *Conclusion*

490

491 In this study, human SVF-based bone tissue engineering was assessed for the first time in two
492 pre-clinical models of bone formation. We there show that hSVF cells in association with
493 BCP granules possesses a slight bone forming capacity but the obtained neoosteogenesis is
494 not sufficient to be clinically relevant. Even if the osteogenic stimulation of hSVF by PRP

495 seemed to improve bone formation in the ectopic model, the results were not significant. In
496 the bone defect model of rat calvarial.

497

498 **Discussion on human cell tracking in progress**

499

500 This study aims to build basis to work on for future experiments. It would be interesting to
501 assess the viability of implanted cells to confirm if it is or not a limitation for their osteogenic
502 activity. If so, new strategies including engineered biomaterials that can improve survival of
503 cells in ischemic conditions will be the solution to find an alternative to bone graft in
504 maxillofacial bone loss. As for now, the association of human SVF cells with BCP granules
505 does not provide a clinically relevant alternative to bone graft.

506

507

508 *Acknowledgment*

509 We would like to thank, Dr Lefourn, Dr Lejeune, Dr Baraer and the clinic Bretéché
510 department of Plastic and Reconstructive Surgery for providing the lipoaspirates and
511 Biomatlante company for providing the BCP. The authors would also like to thank Dr Fanny
512 Grimaud, Dr Pauline Blery and, Dr Amadou Tour   for their help in the experiments and the
513 University of Nantes animal facility for the precious help in animal care.

514

515 *Bibliography*

- 516 [1] Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous
517 bone grafts and bone substitutes—tools and techniques: I. A 20,000-case experience in
518 maxillofacial and craniofacial surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116.
- 519 [2] Corre P, Merceron C, Longis J, Khonsari RH, Pilet P, Thi TN, et al. Direct comparison of
520 current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects - A
521 preclinical study. *Acta biomaterialia*. 2015;26:306-17.
- 522 [3] Corre P, Merceron C, Vignes C, Sourice S, Masson M, Durand N, et al. Determining a
523 clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an "all-in-one" study in nude mice.
524 *PloS one*. 2013;8.
- 525 [4] Mankani MH, Kuznetsov SA, Robey PG. Formation of hematopoietic territories and bone
526 by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density.
527 *Experimental hematology*. 2007.
- 528 [5] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow.
529 Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*.
530 1968;6:230-47.
- 531 [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from
532 human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7:211-
533 28.
- 534 [7] Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous
535 stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case
536 report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European
537 Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2004;32:370-3.

- 538 [8] Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil C, Aguado E, et al. Calcium
539 phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study.
540 Bone. 2005;36:323-30.
- 541 [9] Müller AM, Mehrkens A, Schäfer DJ, Jaquier C, Güven S, Lehmicke M, et al. Towards
542 an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular
543 fraction of human adipose tissue. European cells & materials. 2010;19:127-35.
- 544 [10] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same?
545 Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and
546 stromal cells. Stem cells and development. 2012;21:2724-52.
- 547 [11] Espitalier F, Durand N, Rémy S, Corre P, Sourice S, Pilet P, et al. Development of a
548 cyclosporin-A-induced immune tolerant rat model to test marrow allograft cell type effects on
549 bone repair. Calcified tissue international. 2015;96:430-7.
- 550 [12] Girard AC, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran MK, Delarue P, Hulard O, et al. New
551 insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. Aesthetic plastic
552 surgery. 2013;37:144-52.
- 553 [13] They A, Bléry P, Malard O, Pilet P, Sourice S, Corre P, et al. Role of the stromal
554 vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone
555 regeneration in an irradiated area. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official
556 publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2015;43:1169-
557 76.
- 558 [14] Bai X, Yan Y, Song YH, Seidensticker M, Rabinovich B, Metzle R, et al. Both cultured
559 and freshly isolated adipose tissue-derived stem cells enhance cardiac function after acute
560 myocardial infarction. European Heart Journal. 2010;31:489-501.
- 561 [15] Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells:
562 Their identity and uses in clinical trials, an update. World Journal of Stem Cells. 2011;3:25.

563 [16] Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, et al.
564 Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a
565 comparison of protocols with and without cell expansion. *International Journal of Colorectal*
566 *Disease*. 2008;24:27-30.

567 [17] Güven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, et al. Engineering of
568 large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial
569 progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials*. 2011;32:5801-9.

570 [18] Mehrkens A, Saxer F, Güven S, Hoffmann W, Müller AM, Jakob M, et al. Intraoperative
571 engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells
572 and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *European cells & materials*.
573 2012;24:308-19.

574 [19] Müller AM, Davenport M, Verrier S, Drosler R, Alini M, Bocelli-Tyndall C, et al.
575 Platelet lysate as a serum substitute for 2D static and 3D perfusion culture of stromal vascular
576 fraction cells from human adipose tissue. *Tissue engineering Part A*. 2009;15:869-75.

577 [20] Papadimitropoulos A, Scherberich A, Güven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F,
578 et al. A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *European cells &*
579 *materials*. 2011;21:445.

580 [21] Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I. Three-Dimensional Perfusion
581 Culture of Human Adipose Tissue-Derived Endothelial and Osteoblastic Progenitors
582 Generates Osteogenic Constructs with Intrinsic Vascularization Capacity. *STEM CELLS*.
583 2007;25:1823-9.

584 [22] Tchang LA, Pippenger BE, Todorov A, Wolf F, Burger MG, Jaquiere C, et al. Pooled
585 thrombin-activated platelet-rich plasma: a substitute for fetal bovine serum in the engineering
586 of osteogenic/vasculogenic grafts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
587 2015.

588 [23] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz A, March KL, et al. Stromal cells
589 from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-
590 derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose
591 Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT).
592 Cytotherapy. 2013;15:641-8.

593 [24] Schubert T, Xhema D, Vériter S, Schubert M, Behets C, Delloye C, et al. The enhanced
594 performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal
595 stem cells. Biomaterials. 2011;32:8880-91.

596 [25] James AW, Zara JN, Corselli M, Askarinam A, Zhou AM, Hourfar A, et al. An abundant
597 perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. Stem cells translational
598 medicine. 2012;1:673-84.

599 [26] Neovius E, Lemberger M, Skogh DAC, Hilborn J, Engstrand T. Alveolar bone healing
600 accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2
601 delivered by hydrogel. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS.
602 2012;66:37-42.

603 [27] Woo E. Adverse Events Reported After the Use of Recombinant Human Bone
604 Morphogenetic Protein 2. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2012;70:765-7.

605 [28] Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend?
606 Arthritis Research & Therapy. 2012;14:219.

607 [29] Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Hihara M, Notodihardjo PV, Matsui M, et al.
608 Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected
609 into murine subcutis. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2015.

610 [30] Doi K, Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, et al. Stromal vascular fraction isolated
611 from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. Journal of
612 Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2013;7:864-70.

E. Discussion sur la mise au point d'un procédé d'ingénierie tissulaire osseuse avec la FSV humaine

Dans les différentes études présentées, que ce soit en modèle sous-cutané ou dans les modèles de calvaria (rat nude et rat Wistar), les études animales ont été effectuées dans une animalerie agréée et les règles d'éthiques de bien-être animal ont été respectées. Ces différents modèles ont fait l'objet de l'écriture de « dossiers de saisines » ou « formulaire d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques » comme demandé par l'arrêté du 1^{er} février 2013 de la directive européenne 2010/63/UE.

1) Le modèle de base : BCP+FSV

La concentration de FSV utilisée dans la première étude (du rat nude) était de $15 \cdot 10^6 / \text{cm}^3$ (500 000 cellules dans un défaut de calvaria). Les résultats obtenus étaient faibles en termes de repousse osseuse. De plus, Mehrkens en 2012 (Mehrkens, Saxer et al. 2012) montrait un effet dose réponse de la minéralisation entre une concentration de 10 et $40 \cdot 10^6$ cellules/ cm^3 .

C'est donc cette concentration de 40 millions de cellules par cm^3 soit 1,5 millions de cellules par défaut de calvaria qui est utilisée dans notre deuxième étude.

Le modèle ectopique sous-cutané étant plus stringent encore, pour observer une formation osseuse (et un effet potentiel du PRP et de la BMP2 dans la deuxième étude), nous nous sommes placés à 60 millions de cellules par cm^3 .

Enfin pour se placer au maximum dans un contexte favorable à une utilisation clinique intra-opératoire, les mélanges de biomatériaux et de cellules ont tous été réalisés 30 minutes avant l'implantation.

a. Les résultats en site ectopique

La figure 5 de l'article résume les résultats obtenus par l'implantation en site ectopique de l'association BCP+FSV humaine. Cette association biomatériaux, FSV humaine conduit à une très légère formation d'un tissu minéralisé au contact des granules. Même si d'un point de vue quantitatif, ce tissu représente moins de 0,1% de l'implant, il y a un début de minéralisation

dû à l'ajout de la FSV en comparaison aux biomatériaux seuls, n'induisant pas d'ostéoformation.

b. Les résultats en site osseux

L'ostéoinduction obtenue en site ectopique avec la FSV humaine nous a conduits à tester cette condition dans un site orthotopique de calvaria de rat. Ainsi comme présenté dans la figure 6 de l'article, l'implantation de BCP en association avec les cellules de FSV en calvaria donne là encore naissance à des zones réduites de minéralisation osseuse au contact des granules. Toutefois, à la différence de l'étude en site ectopique nous n'avons pas été en mesure d'observer une différence significative de condition en comparaison au biomatériau seul. Ceci est valable à la fois pour les granules de BCP mais aussi pour l'éponge de collagène, autre biomatériau testé dans ce modèle.

L'association de rhBMP2 avec du collagène (contrôle positif d'ostéoinduction utilisé en clinique vétérinaire) ou a des BCP, a quant à elle permit une quasi fermeture du défaut osseux de calvaria.

c. Conclusion

Cette première étude visait à étudier le potentiel ostéoinducteur de la FSV humaine. Les résultats en site ectopique montrent un léger potentiel d'ostéoinduction de l'association BCP+hFSV. Toutefois, le passage à un modèle de défaut osseux a permis de relativiser d'un point de vue clinique ce potentiel. En effet, en site osseux, l'association de FSV humaine a des biomatériaux (granules de BCP mais aussi une éponge de collagène), a donné de faibles résultats en termes de repousse osseuse en comparaison à l'association collagène+BMP2, stratégie utilisée en clinique vétérinaire et en orthopédie chez l'homme.

d. La stimulation intra-opératoire de la Fraction Stromale Vasculaire

Devant l'insuffisante ostéoinduction de la FSV humaine pour réparer des défauts osseux, nous avons cherché à améliorer ce potentiel ostéoinducteur. Afin de rester dans une stratégie intra-opératoire cliniquement pertinente, nous nous sommes intéressés à l'ajout de faible dose de BMP2 et à l'ajout de PRP.

➤ Stimuler avec la Bone Morphogenetic Protein 2

La BMP2 fait partie des 2 facteurs de croissances pro-ostéogéniques utilisés à l'heure actuelle en chirurgie orthopédique (avec la BMP7). Son action sur la formation osseuse est bien décrite. Toutefois, son utilisation actuelle entraîne des effets secondaires non négligeables (inflammation et ossification ectopique notamment). Ceux-ci représentent un obstacle à son recours en chirurgie maxillo-faciale chez l'enfant comme chez l'adulte. Il est possible que ces effets secondaires soient en partie liés aux doses supra-physiologiques utilisées en clinique (plusieurs μg).

C'est pourquoi réduire la quantité/concentration, paraît une approche intéressante pour permettre son utilisation en chirurgie maxillo-faciale. Toutefois, ses effets pro-ostéogéniques sont doses dépendants, et une réduction des quantités utilisées risque aussi de diminuer son efficacité.

D'un autre côté la FSV dans notre modèle permet un début de formation osseuse mais trop faible pour représenter un intérêt clinique conséquent.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés ici à la combinaison de FSV avec des doses décroissantes de BMP2 pour investiguer un potentiel effet synergique qui permettrait d'une part d'améliorer le potentiel ostéogénique de la FSV humaine tout en réduisant la concentration de BMP2 dans un modèle cliniquement relevant.

➤ L'apport du Plasma Riche en Plaquette

Comme expliqué précédemment, le PRP est utilisé depuis plusieurs décennies en implantologie pour sa capacité à former rapidement un gel biologique dégradable à partir d'un prélèvement sanguin. Son utilisation en ingénierie tissulaire osseuse en association avec des granules de BCP et des cellules permet une double action :

- Son action gel permet de garder les cellules sur le site d'implantation au contact des granules pendant les premières heures pour éviter une clairance des cellules par l'organisme.
- L'apport de facteurs de croissance relargés par le PRP lors de son activation peut stimuler l'action régénératrice recherchée. Notamment via l'action pro-angiogénique (sécrétion de VEGF) qui permet la revascularisation du tissu à régénérer et ainsi la

survie d'un plus grand nombre de cellules implantées et le recrutement de nouvelles cellules circulantes.

Plusieurs tests ont été effectués pour former un gel de PRP. Au regard de la littérature, la concentration en calcium pour activer le PRP est généralement de 10% du volume final.

2) Le modèle stimulé : BCP+FSV+BMP2 / BCP+FSV+PRP

Ajout de rhBMP2 :

Lors de l'étude ectopique de stimulation de la FSV par de la BMP2, les conditions de stimulations dans l'étude de Mehrkens étaient l'ajout de 250ng de rhBMP2 à un construct de 0,1cm³ soit 2,5µg/cm³.

Concernant les quantités de BMP2 utilisées en calvaria dans la littérature, le tableau suivant donne un exemple de quelques-unes de ces études (Marden, Hollinger et al. 1994, Lutolf, Weber et al. 2003, Inoda, Yamamoto et al. 2004, Hyun, Han et al. 2005, Intini, Andreana et al. 2007, Kim, Kim et al. 2007, Osathanon, Linnes et al. 2008, Park, Kim et al. 2008, Terella, Mariner et al. 2010, Notodihardjo, Kakudo et al. 2012).

Auteur Année Journal	Diamètre du défaut	Espèce de rat	Quantité de BMP2 par défaut	Repousse osseuse
Kim 2007 Biomaterials	8mm	Rat SD	500ng	50,60%
Notodihardjo 2012 J CranioMaxilloFac Surg	4mm	Rat Wistar	10µg	85,29%
Intini 2007 J Trans Med	8mm	Rat SD	5µg	non quantifié
Hyun 2005 J Periodontol	8mm	Rat SD	2,5µg	99,40%
Inoda 2004 J CranioMaxilloFac Surg	4mm	Rat Wistar	50µg	non quantifié
Park 2008 Int J Oral Maxillofac Implants	8mm	Rat nude	200ng	non quantifié
Terella 2010 Arch Facial Plast Surg	8mm	Rat SD	5ng	non quantifié
Lutolf 2003 Nature Biotech	8mm	Rat (sans préciser)	5µg	>80%
Marden 1994 J Biomed Mater Res	8mm	Rat	2,2µg / 6,5µg	non quantifié
Osathanon 2008 Biomaterials	8mm	Souris C57/BL6	1µg	non quantifié

Tableau 18: Utilisation de la rhBMP2 dans des modèles de défauts de calvaria et quantité de BMP2 utilisée

Les quantités varient entre 5ng et 50µg pour des défauts de rongeurs.

Enfin en clinique humaine, le kit INDUCTOS® commercialisant la BMP2 contient 12mg de rhBMP2 par kit avec une utilisation maximale de 2 kits (24mg) par patient et une concentration de 1,5mg/cm³, concentration très forte qui, si réduite pourrait réduire les effets secondaires.

Dans notre cas lors de notre étude nous choisissons d'utiliser :

- 300ng de rhBMP2 pour 0,1cm³ (3µg/cm³) en sous-cutanée concentration proche de celle déjà décrite (Mehrkens 2012).
- Des concentrations de 30µg, 3µg et 300ng/cm³ encadrant la concentration utilisée en sous-cutanée. Soit 1µg, 100ng et 10ng par défaut.
- Le kit d'utilisation clinique vétérinaire utilisé contient 660µg de BMP2. Il est préconisé d'utiliser un maximum de 2 éponges de 2,5cm/5cm. Soit une concentration de 26,4µg/cm³, proche de notre concentration maximale (0,528µg par défaut car le kit utilise une éponge de collagène et non des BCP).

Ajout de PRP :

La complémentation de la graisse avec du PRP a d'ores et déjà été discuté dans le cadre du lipotransfert.

Toutefois historiquement, les préparations de PRP et de PRF sont utilisées au niveau du parodonte pour améliorer la réparation des tissus mous et de l'os alvéolaire en cas d'extractions dentaires (Albanese, Licata et al. 2013).

Toutefois il semblerait qu'utilisé seul le PRP ait une action limitée pour traiter les défauts osseux. Là encore, les différences de préparation du PRP peuvent expliquer les résultats différents retrouvés dans la littérature. Il reste probable que le PRP stimule la formation du cal osseux et la régénération osseuse intrinsèque, *via* un mécanisme de sécrétion de facteurs de croissances, mais soit insuffisant seul pour traiter un défaut osseux critique.

En addition à ce contexte clinique, les effets du PRP sur les CSA ont été étudiés et une amélioration de la prolifération de ces dernières ont été observés (Gentile, Orlandi et al. 2012). De plus, ces dernières années, l'utilisation du PRP en tant que facteur stimulant la régénération osseuse a été étudiée dans différents modèles animaux.

En addition à son utilisation seule en clinique orale, la recherche se tourne vers son utilisation en tant que véhicule de facteurs de croissances ou de cellules pour l'ingénierie tissulaire

(Kasten, Beverungen et al. 2012, Lin, Whu et al. 2012, Wen, Gu et al. 2014, Zou, Yuan et al. 2014).

Des tests préliminaires ont permis en accord avec les recommandations du fabricant (RegenLab) ont permis de déterminer le mélange à effectuer pour avoir un gel de PRP en 15-30min de manière reproductible :

- 80% de plasma concentré en plaquette
- 10% de sérum avec protéines coagulantes
- 10% de gluconate de calcium pour activer le PRP et permettre la gélification avant implantation.

Les autres conditions faisant varier ces pourcentages ne donnent pas un gel en 30min ou alors pas de manière aussi reproductible.

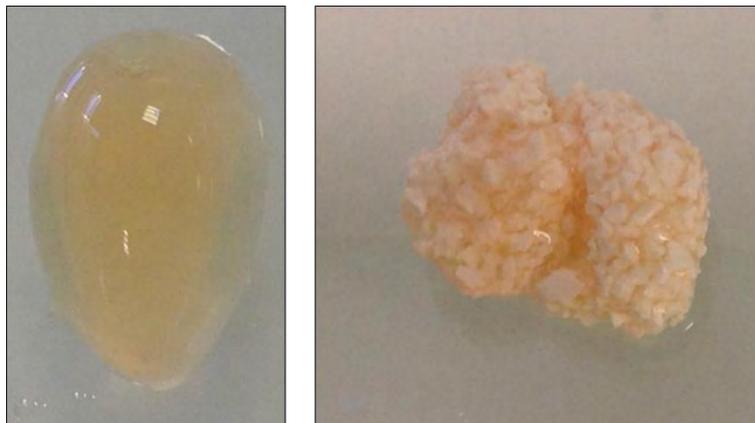


Figure 34: Aspect du gel de PRP après 30min (à gauche sans BCP et à droite avec des BCP)

Concernant la viabilité des cellules de la FSV au contact du PRP, un test de viabilité MTS a permis de déterminer que l'activité mitochondriale des cellules n'était impacté ni par l'association avec du PRP ni par celle avec du PRP et des BCP.

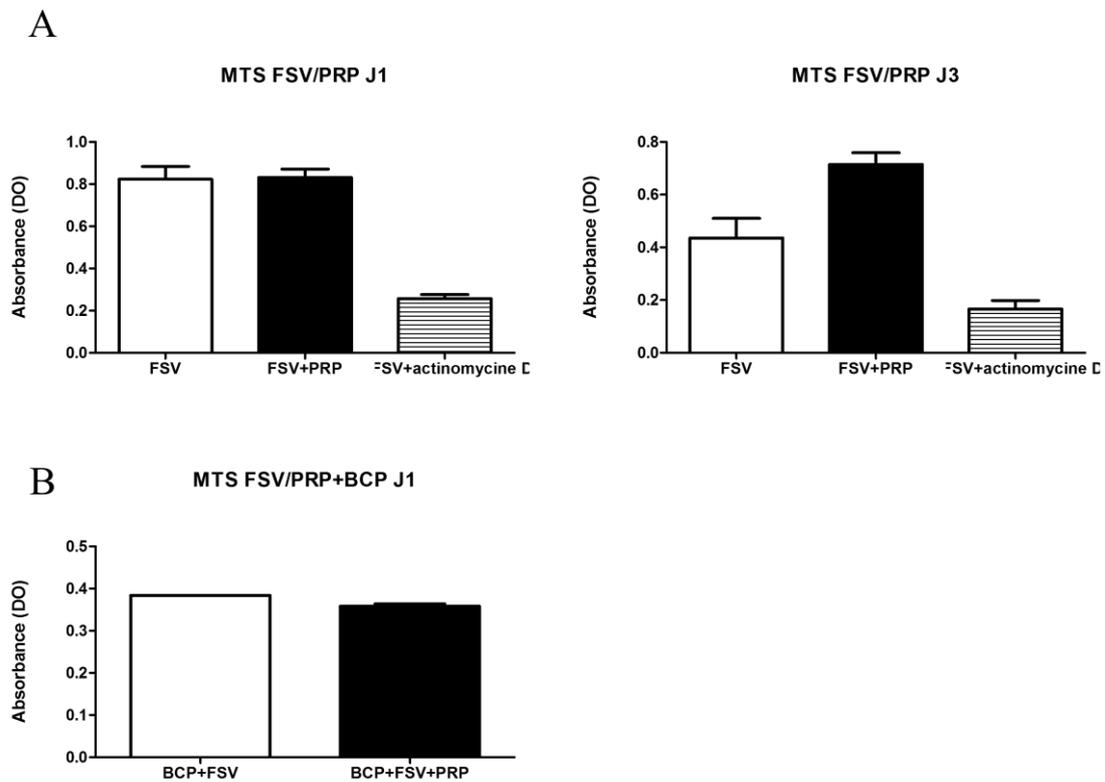


Figure 35: Viabilité des cellules de la FSV.
A: à 24 et 72h au contact du PRP. B: à 24h au contact des BCP et du PRP

Enfin, des dosages ELISA ont permis de vérifier que les cellules de la FSV en culture pendant 24h sécrètent bien du VEGF. L'association avec le gel de PRP se traduit par une concentration moindre de VEGF dans le surnageant. Ceci peut traduire une inhibition de la voie de sécrétion de ce facteur ou bien plus certainement un phénomène du au gel de PRP qui retiendrais les protéines, réduisant ou retardant leurs sécrétions dans le milieu.

D'autres expérience seront nécessaires pour mieux déterminer l'impact des associations FSV+PRP et BCP+FSV+PRP sur le sécrétome de ces cellules. Nos tests n'ont pas permis de mettre en évidence une sécrétion de BMP2 par ces cellules dans nos conditions.

Sécrétion de VEGF par les cellules de la FSV dans le PRP à 24h

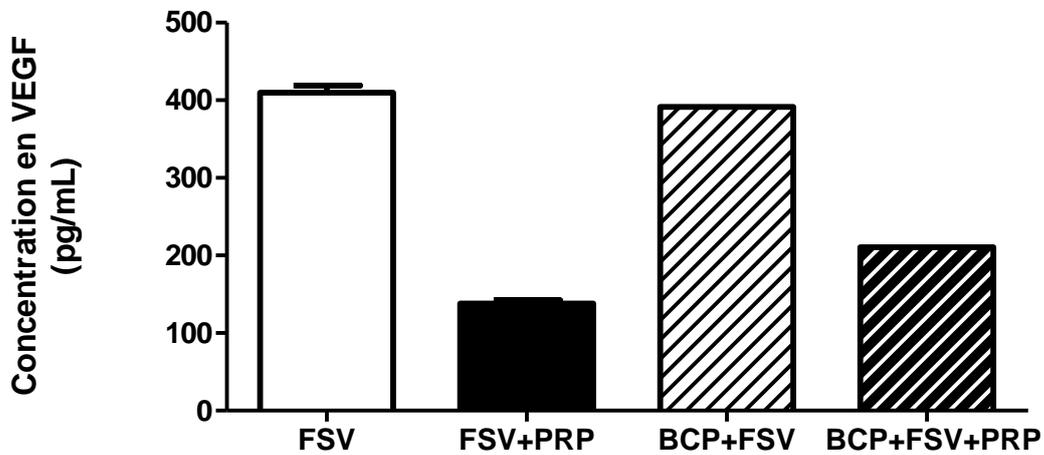


Figure 36: Sécrétion de VEGF par les cellules de la FSV en culture avec du PRP, des BCP ou un mélange des deux.

a. Les résultats en site ectopique

La figure suivante présente les résultats obtenus en site ectopique en stimulant l'ostéoinduction de la FSV soit par l'ajout de PRP soit par l'ajout de BMP2. Dans les 2 cas, une augmentation de la néoformation de tissu minéralisé est observable. L'ajout d'une concentration de BMP2 de $3\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (dose intermédiaire pour l'étude en calvaria) permet une augmentation significative de la néoformation osseuse comme dans l'étude de (Mehrkens 2012). La condition BCP+FSV+BMP2 a ensuite été retiré de l'article suite à l'eratum expliqué dans le prochain paragraphe.

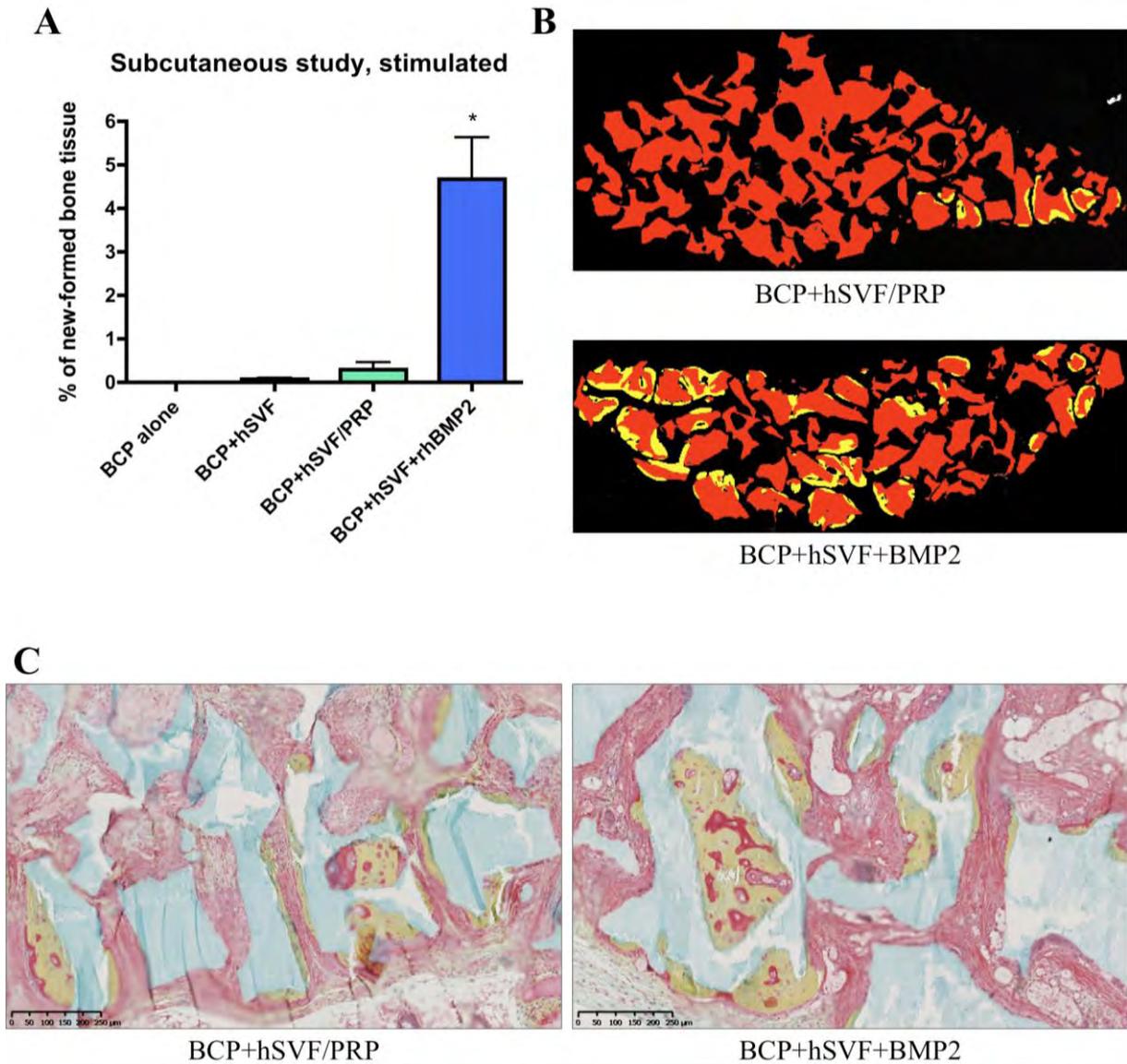


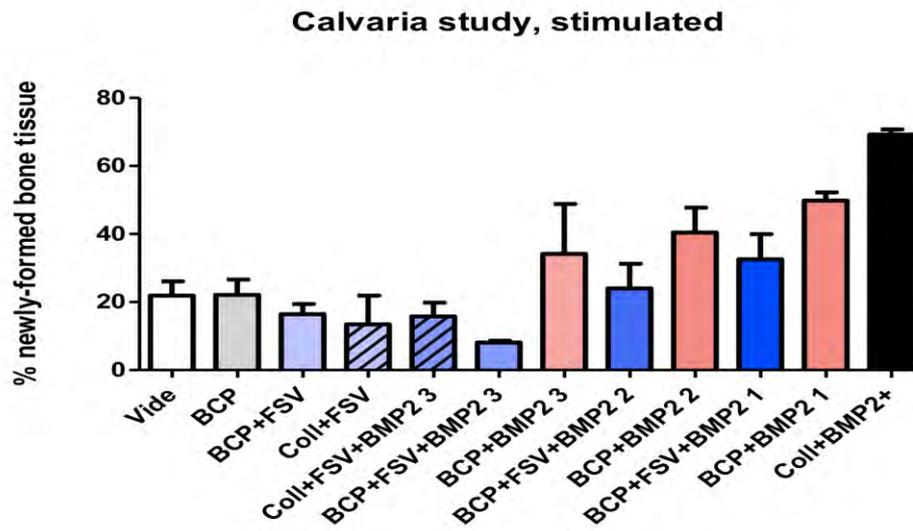
Figure 37: Figure 7 de l'article pré-ératum montrant la repousse osseuse en site ectopique avec l'ajout de la BMP2

b. Les résultats en site osseux

Comme précédemment nous avons testé la pertinence de nos stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse dans le même modèle de défaut osseux de calvaria. Les résultats présentés figure 9 montrent ici encore que l'ostéoinduction obtenue par la stimulation de la FSV via le PRP ou différentes concentration de BMP2 ne permet pas d'atteindre le potentiel du kit de clinique vétérinaire.

L'ostéoinduction apportées par la BMP2 en association avec les BCP est même diminuée lors de l'ajout des cellules de la FSV. Ces résultats vont à l'encontre de notre théorie initiale d'un effet synergique de l'ostéoinduction de la BMP2 avec l'ostéoinduction des cellules de la FSV.

A



B

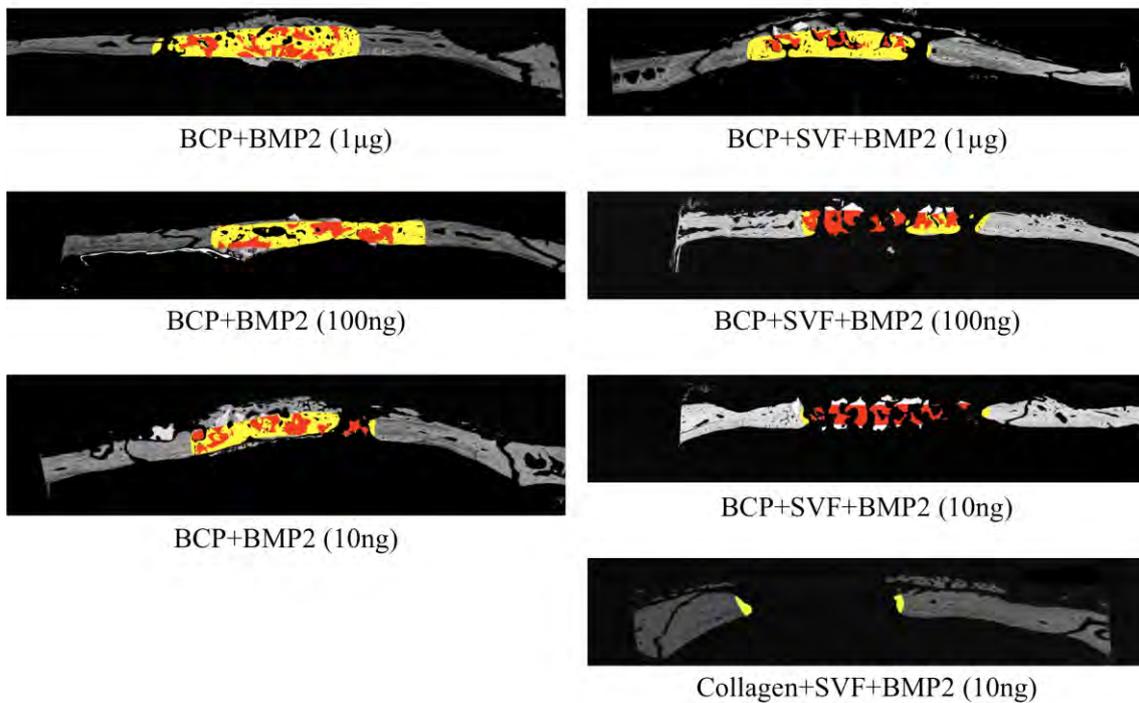


Figure 38: Figure de l'article pré-ératum montrant la repousse osseuse en site osseux avec la BMP2

Devant ces résultats inattendus, nous avons cherché à déterminer si l'absence d'amélioration de la formation osseuse dans les conditions associant BCP, FSV et BMP2 pouvait être due à notre protocole. En effet une baisse de la viabilité des cellules pourrait expliquer les résultats. Les cellules en mourant auraient relargué différentes protéases dans le milieu, dégradant ainsi la BMP2. Cette théorie pourrait expliquer la diminution de la formation osseuse en comparaison aux conditions avec la même quantité de BMP2 mais sans ajout de cellules.

Ainsi en reprenant plus en détail le protocole d'implantation concernant ces échantillons nous nous sommes aperçu que le solvant reprenant la BMP2 était de l'EPPI (eau pour préparation injectable). Or c'est dans cette BMP2 diluée à la concentration requise qu'a été repris le culot cellulaire de FSV.

Cette solution solvant de BMP2 est donc en fin de compte une solution hypotonique impropre à l'utilisation de cellules.

Des tests complémentaires ont été effectués pour vérifier la toxicité de ce solvant fournit dans le kit sur les cellules. Ainsi, l'osmomètre a révélé que c'est bel et bien de l'eau avec une osmolarité de 0mOsm/L (température de fusion de -0.01°C).

Des tests complémentaires ont été effectués sur l'effet d'un contact d'un culot de FSV avec l'EPPI. Même si l'activité mitochondriale n'est pas totalement diminuée après 2h de contact (figure 39), il y a lyse de tous les globules rouges présents dans la FSV. De plus, si le même culot repris dans du milieu de culture ou de l'EPPI est rincé puis mis en culture, la viabilité des cellules est très diminuée (figure 40).

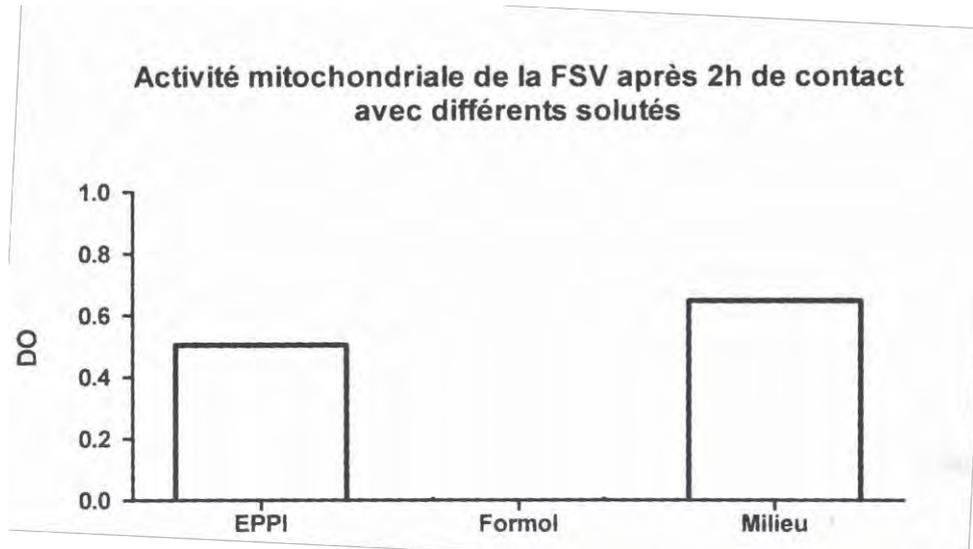
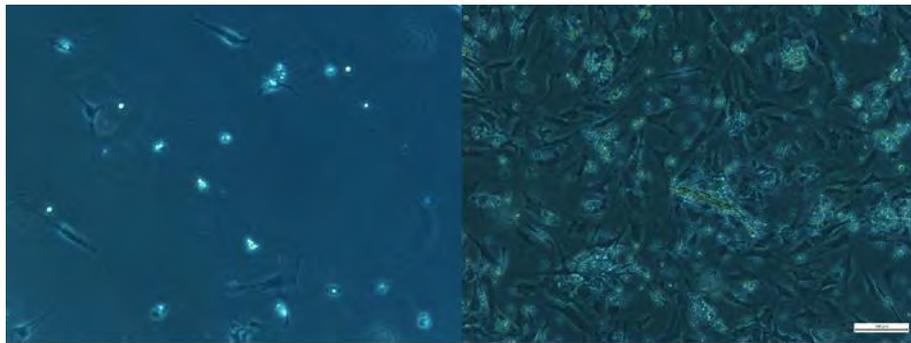


Figure 39: Activité mitochondriale des cellules de la FSV après 2h de contact avec l'EPPI



Cellules laissées 2h en contact de l'EPPI

Cellules laissées 2h en contact du milieu

Figure 40: Aspect à J4 des cellules de la FSV mise en culture après contact de l'EPPI ou du milieu pendant 2 heures

Concernant l'association FSV et PRP, la quantification en 3 dimensions de la repousse osseuse en calvaria est présentée figure 9 de l'article. Cette quantification montre que malgré l'amélioration du potentiel ostéoinducteur de la FSV qu'il semblait y avoir en site ectopique, l'ajout de PRP en site osseux ne permet pas une augmentation de la repousse osseuse que ce soit avec les BCP seuls ou avec l'association BCP+FSV humaine.

Les études histologiques de ce tissu néoformé sont actuellement en cours pour tenter de caractériser plus en détail l'effet de l'ajout du PRP.

Conclusion :

Cette étude a permis l'observation du potentiel de la FSV pour des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse. L'association de la FSV humaine à deux types de biomatériaux osseux, dans deux modèles précliniques n'a pas permis d'obtenir une ostéoformation relevante. Nous avons ensuite montré qu'il était possible d'améliorer le potentiel ostéoinducteur de la FSV dans des stratégies intra-opératoire par l'ajout de PRP. Toutefois, ici encore, la néoformation osseuse obtenue reste insuffisante pour présenter une pertinence en clinique maxillo-faciale.

Pour la première fois l'utilisation de la FSV humaine en site osseux a été intensivement étudiée. Même si son utilisation avec d'autres biomatériaux reste à étudier, à l'heure actuelle, la FSV humaine semble présenter un intérêt limité pour son utilisation intra-opératoire dans des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse dans nos modèles avec nos biomatériaux.

Toutefois il est important de noter que notre équipe, en travaillant dans un modèle de défaut fémoral d'os irradié, a montré une augmentation de la vascularisation du site après implantation de FSV de rat. Ainsi le potentiel régénératif de la FSV n'est pas remis en cause. Même si de meilleurs résultats sont envisageables dans d'autres modèles osseux ou encore avec d'autres biomatériaux, nous pensons qu'il est surtout nécessaire de trouver un autre moyen de stimuler le potentiel ostéogénique de la FSV. Cette stimulation peut se faire par l'ajout de nouvelles molécules, pro-ostéogéniques ou encore améliorant la survie des cellules implantées.

Les résultats concernant la stimulation de la FSV par des doses décroissantes de rhBMP2 ne sont pas interprétables dans la mesure où le protocole utilisé lors de l'implantation allait à l'encontre d'une bonne survie des cellules.

PARTIE IV :

**Le futur du tissu adipeux
et de ses dérivés en
clinique humaine**

PARTIE IV : Le futur du tissu adipeux et de ses dérivés en clinique humaine

Ce travail de thèse s'est penché sur l'utilisation en clinique humaine du tissu adipeux.

Non seulement ce tissu adipeux peut être prélevé de manière a-traumatique chez une grande majorité des patients, mais il possède en plus la particularité d'être d'un intérêt clinique multiple.

En effet, son utilisation en tant que volume tissulaire prélevable/reimplantable a permis l'apparition du transfert de graisse autologue depuis plus d'un siècle maintenant. Le lipotransfert, a d'ores et déjà acquis ses lettres de noblesses en chirurgie plastique et reconstructrice et fait maintenant parti du top 5 des techniques utilisées dans ces domaines. Le potentiel du tissu adipeux en comblement de tissu mou est attrayant de par sa forte disponibilité et l'aspect naturel du tissu reconstruit par cette technique.

Toutefois, comme nous l'avons décrit dans la revue sur ce sujet, cette technique n'a pas encore atteint son plein potentiel puisque quelques limites persistent dont la résorption du greffon. Le développement de nouveaux procédés de lipotransfert et l'étude intensive dont cette technique a fait l'objet permet maintenant de répondre à une partie de ces limites. Ainsi, le respect d'un certain nombre de points critiques lors du prélèvement, traitement, et réinjection du greffon de graisse permet le développement de nouveaux procédés donnant lieu à de bons résultats cliniques.

Dans cette optique, les kits MICROFILL[®] et MACROFILL[®] mis au point par STEM CIS permettent un prélèvement manuel, contrôlé, assurant la viabilité du tissu. Les étapes de centrifugations proposées sont, comme nous l'avons montré dans notre étude, un moyen reproductible de concentré le tissu en enlevant la phase aqueuse indésirable. Une centrifugation à faible vitesse permet un ici encore un respect du tissu et de sa viabilité (Girard, Mirbeau et al. 2015). Enfin, l'ajout d'étapes de lavages entre les centrifugations permet d'éliminer une grande partie des cellules sanguines et d'éventuels anesthésiques locaux utilisés dans certaines procédures.

Notre étude comparative a permis de confirmer l'importance du respect de ces points critiques, conduisant à de meilleurs résultats en termes de maintien du greffon dans le temps.

En addition à l'utilisation clinique du tissu adipeux dans son ensemble, s'ajoute un nouveau potentiel qui réside dans la fraction stromale vasculaire de ce tissu. En effet, en plus des adipocytes représentant la majorité du volume tissulaire, le tissu adipeux contient de nombreux autres types cellulaires. Cette phase non adipocytaire nommée fraction stromale vasculaire a beaucoup attirée l'attention lors de la mise en évidence de la présence de cellules stromales mésenchymateuses en son sein (Zuk, Zhu et al. 2001). Ces cellules renommées ensuite cellules stromales adipeuses (CSA) sont des cellules multipotentes capables de donner naissance à différents types cellulaires mésenchymateux comme la lignée adipocytaire mais aussi les lignées chondrocytaire (cartilage) ou ostéocytaire (os). En plus de cette capacité de différenciation, ces cellules possèdent un sécrétome riche qui leur confèrent des propriétés immuno-modulatrices (elles influent sur la réponse inflammatoire et sur la réponse immunitaire) mais aussi pro-angiogéniques, améliorant ainsi la survie des cellules en cas d'ischémie.

L'intérêt de la FSV ne réside pas seulement dans ces CSA. En effet, la présence de progéniteurs endothéliaux, de péricytes, de certaines cellules stromales mésenchymateuses et cellules lymphocytaires en fait un véritable micro-environnement capable de moduler des signaux pathologiques complexes. La façon dans la FSV va intégrer les différents signaux cellulaires et humoraux présents dans de nombreuses situations pathologiques est très peu connue à ce jour. Cette question fait l'objet de très nombreuses recherche et la FSV est à l'étude dans différentes situations cliniques, aussi bien pour traiter l'ischémie des membres que la sclérose multiple ou l'arthrose.

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés au potentiel ostéoinducteur de la FSV humaine dans un contexte clinique de perte osseuse maxillo-faciale. Dans le but de conserver une forte pertinence clinique nous avons étudié différentes stratégies intra-opératoires mettant en jeu de la FSV humaine et des biomatériaux osseux. Même si nos résultats font part d'un faible potentiel ostéoinducteur de la FSV dans nos modèles d'étude, son application dans d'autres domaines de la médecine régénératrice est prometteuse.

Ainsi, le laboratoire U791 et la société STEM CIS sont partenaires dans un projet de financement européen FEDER. Ce projet vise à étudier le potentiel de la FSV humaine dans le cadre de traitement de l'arthrose consécutive d'un traumatisme (modèle de rupture du ligament croisé

antérieur). Ce projet ayant lieu en parallèle du projet de thèse donnait lieu à des résultats préliminaires prometteurs et devrait livrer ces résultats définitifs prochainement.

A. Parenthèse réglementaire

D'un point de vue réglementaire, des changements ont eu lieu à la suite des directives européennes de 2004 et du règlement européen de 2007. Ainsi en 2012, la France a redéfini certains médicaments jusqu'alors considérés comme "préparations de thérapies cellulaires" ou "médicaments/préparations de thérapie génique" en introduisant le terme de :

- Médicaments de thérapie innovante (MTI) qui englobe aussi les "médicaments de thérapie génique".

Ainsi trois nouvelles définitions vont entrer en vigueur, définissant un cadre réglementaire spécifique :

- Les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) – règlement européen
- Les Médicaments de thérapie innovante préparés poncutellement (MTI-PP) – "exemption hospitalière" suivant le règlement national
- Les préparations – Produits de Santé non considérés comme des médicaments

La distinction entre les 3 définitions est résumée dans le tableau suivant :

PRODUIT	MANIPULATION / DESTINATION	DOMAINE d'APPLICATION	STATUT / REGLEMENTATION
Tissus/Cellules (Humain)	NON substantielle ET Même destination donneur/receveur	Restreinte Ou Large	Préparation cellulaire / tissu National
Tissus/Cellules Vecteurs de thérapie génique	OUI Substantielles Ou Cellules/tissus à usage non homologue à la fonction d'origine	Large	MTI Europe
Tissus/Cellules Vecteurs de thérapie génique	OUI Substantielles Ou Cellules/tissus à usage non homologue à la fonction d'origine	Restreinte Fabrication ponctuelle pour 1 patient déterminé Utilisation dans 1 seul état	MTI-PP National

Tableau 19: Cadre réglementaire des Médicaments de Thérapie Innovante (ANSM)

Concernant, le statut que pourrait représenter l'utilisation de la Fraction Stromale Vasculaire humaine dans cette nouvelle législation, aucune indication officielle de l'ANSM n'est disponible. Toutefois, des sources informelles suggèrent que la préparation et l'utilisation de la FSV au sein du bloc opératoire n'en font pas un MTI. Son obtention pourrait alors être considérée comme un acte de chirurgie et les dispositifs permettant son obtention (kit d'isolation) considérés comme des dispositifs médicaux de classe III (au potentiel très sérieux de risque), au même titre qu'une prothèse de hanche par exemple. L'utilisation de la FSV humaine ne serait donc pas soumise à la nouvelle réglementation.

B. Conclusion

En conclusion, le tissu adipeux est un tissu d'intérêt grandissant en clinique humaine. Son utilisation en tant que tissu de comblement autologue est actée et l'évolution de la technique donne maintenant lieu à des traitements de zones hypoplasiques autrefois très complexes à traiter. La découverte du potentiel clinique de la FSV est très récente et il est fort probable que dans la

décennie à venir les recherches sur le sujet donnent lieu à des déconvenues mais aussi à de très bonnes surprises. C'est pour cette raison qu'il est important de continuer ces études des situations pathologiques où l'apport d'une source cellulaire, autologue, utilisable dans un temps intra-opératoire et modulant l'environnement tissulaire peut se révéler salutaire.

Références Bibliographiques

- Agha, R. A., A. J. Fowler, C. Herlin, T. Goodacre and D. P. Orgill (2014). "Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: A systematic review with meta-analysis of oncological outcomes." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **68**(2).
- Ailhaud, G. (1998). "L'adipocyte, cellule sécrétrice et endocrine." médecine/sciences **14**.
- Akamaru, T., D. Suh, S. D. Boden, H.-S. S. Kim, A. Minamide and J. Louis-Ugbo (2003). "Simple carrier matrix modifications can enhance delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for posterolateral spine fusion." Spine **28**(5): 429-434.
- Albanese, A., M. E. Licata, B. Polizzi and G. Campisi (2013). "Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration." Immunity & Ageing **10**(1): 23.
- Allareddy, V. (2014). "Use of human recombinant bone morphogenetic protein is associated with increased hospital charges in children with cleft lip and palate having bone graft procedures." Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons **72**(12): 2531-2538.
- Almubarak, S., H. Nethercott, M. Freeberg, C. Beaudon, A. Jha, W. Jackson, R. Marcucio, T. Miclau, K. Healy and C. Bahney (2015). "Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration." Bone **83**: 197-209.
- Alonso, N., G. Risso, R. Denadai and C. Raposo-Amaral (2014). "Effect of maxillary alveolar reconstruction on nasal symmetry of cleft lip and palate patients: A study comparing iliac crest bone graft and recombinant human bone morphogenetic protein-2." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **67**(9): 1201-1208.
- Amini, A. R., C. T. Laurencin and S. P. Nukavarapu (2012). "Bone tissue engineering: recent advances and challenges." Critical reviews in biomedical engineering **40**(5): 363-408.
- Anghel, S. I. and W. Wahli (2007). "Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma." Cell research **17**(6): 486-511.
- Anjos, S., A. Matas-Palau, J. Mercader, A. J. Katz and R. Llull (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**(10).
- Anticevic, D., M. Jelic and S. Vukicevic (2006). "Treatment of a congenital pseudarthrosis of the tibia by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7): a case report." Journal of pediatric orthopedics. Part B **15**(3): 220-221.
- Aronowitz, J. A., R. A. Lockhart and C. S. Hakakian (2015). "Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue." SpringerPlus **4**(1): 713.
- Barradas, A. M. C., H. Yuan, C. A. van Blitterswijk and P. Habibovic (2011). "Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms." European cells & materials **21**: 407.
- Baskin, D. S., P. Ryan, V. Sonntag, R. Westmark and M. A. Widmayer (2003). "A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERSTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate." Spine **28**(12): 1219.
- Becquart, P., A. Cambon-Binder, L.-E. Monfoulet, M. Bourguignon, K. Vandamme, M. Bensidhoum, H. Petite and D. Logeart-Avramoglou (2012). "Ischemia is the prime but not the

only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo." Tissue engineering. Part A **18**(19-20): 2084-2094.

Bertheuil, N., B. Chaput, C. Ménard, A. Varin, I. Garrido, J. L. Grolleau, L. Sensébé, E. Watier and K. Tarte (2015). "[Adipose-derived stromal cells: history, isolation, immunomodulatory properties and clinical perspectives]." Annales de chirurgie plastique et esthétique **60**(2): 94-102.

Boerckel, J. D., Y. M. Kolambkar, K. M. Dupont, B. A. Uhrig, E. A. Phelps, H. Y. Stevens, A. J. García and R. E. Guldberg (2011). "Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration." Biomaterials **32**(22).

Bourin, P., B. A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A. J. Katz, K. L. March, H. Redl, J. P. Rubin, K. Yoshimura and J. M. Gimble (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." Cytotherapy **15**(6): 641-648.

Bouvet-Gerbettaz, S., F. Boukhechba, T. Balaguer, H. Schmid-Antomarchi, J.-F. F. Michiels, J.-C. C. Scimeca and N. Rochet (2014). "Adaptive immune response inhibits ectopic mature bone formation induced by BMSCs/BCP/plasma composite in immune-competent mice." Tissue engineering. Part A **20**(21-22): 2950-2962.

Bulgin, D., E. Vrabic and E. Hodzic (2013). "Autologous Bone-Marrow-Derived-Mononuclear-Cells-Enriched Fat Transplantation in Breast Augmentation: Evaluation of Clinical Outcomes and Aesthetic Results in a 30-Year-Old Female." Case Reports in Surgery **2013**.

Calabrese, C., L. Orzalesi, D. Casella and L. Cataliotti (2009). "Breast reconstruction after nipple/areola-sparing mastectomy using cell-enhanced fat grafting." ecancermedicalscience **3**.

Castro-Govea, Y., O. Garza-Pineda, J. Lara-Arias, H. Chacón-Martínez, G. Mecott-Rivera, A. Salazar-Lozano and E. Valdes-Flores (2012). "Cell-Assisted Lipotransfer for the Treatment of Parry-Romberg Syndrome." Archives of Plastic Surgery **39**(6): 659-662.

Cawthorn, W. P., E. L. Scheller, B. S. Learman, S. D. Parlee, B. R. Simon, H. Mori, X. Ning, A. J. Bree, B. Schell, D. T. Broome, S. S. Soliman, J. L. DelProposto, C. N. Lumeng, A. Mitra, S. V. Pandit, K. A. Gallagher, J. D. Miller, V. Krishnan, S. K. Hui, M. A. Bredella, P. K. Fazeli, A. Klibanski, M. C. Horowitz, C. J. Rosen and O. A. MacDougald (2014). "Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction." Cell Metabolism **20**(2): 368-375.

Cervelli, V., I. Bocchini, C. Di Pasquali, B. De Angelis, G. Cervelli, C. B. Curcio, A. Orlandi, M. G. Scioli, E. Tati, P. Delogu and P. Gentile (2013). "P.R.L. platelet rich lipotransfert: our experience and current state of art in the combined use of fat and PRP." BioMed research international **2013**: 434191.

Cervelli, V., P. Gentile, B. Angelis, C. Calabrese, A. Stefani, M. Scioli, B. Curcio, M. Felici and A. Orlandi (2010). "Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers." Stem cell research **6**(2): 103-111.

Cervelli, V., P. Gentile, B. De Angelis, C. Calabrese, A. Di Stefani, M. G. Scioli, B. C. Curcio, M. Felici and A. Orlandi (2011). "Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers." Stem cell research **6**(2): 103-111.

Cervelli, V., P. Gentile, M. G. Scioli, M. Grimaldi, C. U. Casciani, L. G. Spagnoli and A. Orlandi (2009). "Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation." Tissue engineering. Part C, Methods **15**(4): 625-634.

Cervelli, V., F. Nicoli, D. Spallone, S. Verardi, R. Sorge, M. Nicoli and A. Balzani (2012). "Treatment of traumatic scars using fat grafts mixed with platelet-rich plasma, and resurfacing of skin with the 1540 nm nonablative laser." Clinical and experimental dermatology **37**(1): 55-61.

Cervelli, V., L. Palla, M. Pascali, B. De Angelis, B. C. Curcio and P. Gentile (2009). "Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery." Aesthetic plastic surgery **33**(5): 716-721.

Chaput, B., L. Foucras, S. Guellec, J. Grolleau and I. Garrido (2013). "Recurrence of an Invasive Ductal Breast Carcinoma 4 Months after Autologous Fat Grafting." Plastic and Reconstructive Surgery **131**(1): 123.

Chatterjea, A., V. L. S. LaPointe, J. Alblas, S. Chatterjea, C. A. van Blitterswijk and J. de Boer (2013). "Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats." Journal of cellular and molecular medicine **18**(1): 134-142.

Chen, B., H. Lin, Y. Zhao, B. Wang, Y. Zhao, Y. Liu, Z. Liu and J. Dai (2007). "Activation of demineralized bone matrix by genetically engineered human bone morphogenetic protein-2 with a collagen binding domain derived from von Willebrand factor propolypeptide." Journal of Biomedical Materials Research Part A **80A**(2): 428-434.

Chen, W., J. Liu, N. Manuchehrabadi, M. D. Weir, Z. Zhu and H. H. K. Xu (2013). "Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects." Biomaterials **34**(38): 9917-9925.

Chenard, K. E., C. M. Teven, T.-C. He and R. R. Reid (2012). "Bone Morphogenetic Proteins in Craniofacial Surgery: Current Techniques, Clinical Experiences, and the Future of Personalized Stem Cell Therapy." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2012**.

Cheng, H., W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park and T.-C. C. He (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." The Journal of bone and joint surgery. American volume **85-A**(8): 1544-1552.

Cheriyana, T., H. Kao, X. Qiao and L. Guo (2014). "Low Harvest Pressure Enhances Autologous Fat Graft Viability." Plastic and Reconstructive Surgery **133**(6): 1365.

Coelho, M., T. Oliveira and R. Fernandes (2013). "Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ." Archives of medical science : AMS **9**(2): 191-200.

Cohen, P. and B. M. Spiegelman (2015). "Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine." Diabetes **64**(7): 2346-2351.

Coleman, S. R. and A. P. Saboeiro (2007). "Fat Grafting to the Breast Revisited: Safety and Efficacy." Plastic and Reconstructive Surgery **119**(3): 775.

Corinaldesi, G., L. Piersanti, A. Piattelli, G. Iezzi, F. Pieri and C. Marchetti (2012). "Augmentation of the floor of the maxillary sinus with recombinant human bone morphogenetic protein-7: a pilot radiological and histological study in humans." The British journal of oral & maxillofacial surgery **51**(3): 247-252.

Corre, P., C. Merceron, J. Longis, R. H. Khonsari, P. Pilet, T. N. Thi, S. Battaglia, S. Sourice, M. Masson, J. Sohier, F. Espitalier, J. Guicheux and P. Weiss (2015). "Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects - A preclinical study." Acta biomaterialia **26**: 306-317.

Corre, P., C. Merceron, C. Vignes, S. Sourice, M. Masson, N. Durand, F. Espitalier, P. Pilet, T. Cordonnier, J. Mercier, S. Remy, I. Anegon, P. Weiss and J. Guicheux (2013). "Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an "all-in-one" study in nude mice." PLoS one **8**(12).

Dawson, E., H. W. Bae, J. K. Burkus, J. L. Stambough and S. D. Glassman (2009). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. A prospective randomized trial." The Journal of bone and joint surgery. American volume **91**(7): 1604-1613.

Dégano, I. R., M. Vilalta, J. R. Bagó, A. M. Matthies, J. A. Hubbell, H. Dimitriou, P. Bianco, N. Rubio and J. Blanco (2008). "Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." Biomaterials **29**(4): 427-437.

Deschepper, M., M. Manassero, K. Oudina, J. Paquet, L. E. Monfoulet, M. Bensidhoum, D. Logeart-Avramoglou and H. Petite (2013). "Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells upon Transplantation." STEM CELLS **31**(3): 526-535.

Dhillon, R. S., E. M. Schwarz and M. D. Maloney (2012). "Platelet-rich plasma therapy - future or trend?" Arthritis Research & Therapy **14**(4): 219.

Dickinson, B. P., R. K. Ashley, K. L. Wasson, C. O'Hara, J. Gabbay, J. B. Heller and J. P. Bradley (2008). "Reduced morbidity and improved healing with bone morphogenetic protein-2 in older patients with alveolar cleft defects." Plastic and reconstructive surgery **121**(1): 209-217.

Dohan Ehrenfest, D. M., I. Andia, M. A. Zumstein, C.-Q. Q. Zhang, N. R. Pinto and T. Bielecki (2014). "Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives." Muscles, ligaments and tendons journal **4**(1): 3-9.

Dohan Ehrenfest, D. M., L. Rasmusson and T. Albrektsson (2009). "Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)." Trends in biotechnology **27**(3): 158-167.

Doi, K., S. Tanaka, H. Iida, H. Eto, H. Kato, N. Aoi, S. Kuno, T. Hirohi and K. Yoshimura (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**(11): 864-870.

Domenis, R., L. Lazzaro, S. Calabrese, D. Mangoni, A. Gallelli, E. Bourkoula, I. Manini, N. Bergamin, B. Toffoletto, C. A. Beltrami, A. P. Beltrami, D. Cesselli and P. Parodi (2015). "Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques." Stem cell research & therapy **6**(1): 2.

Dong, S. O., Y. Cheon, R. Y. Jeon and D. A. E. Lew (2011). "Activated Platelet-Rich Plasma Improves Fat Graft Survival in Nude Mice: A Pilot Study." Dermatologic Surgery **37**(5): 619-625.

Dugail, I. and K. Clément (2000). "Métabolisme des adipocytes." EMC - Endocrinologie-Nutrition **12**(2).

Eggenhofer, E., V. Benseler, A. Kroemer, F. C. Popp, E. K. Geissler, H. J. Schlitt, C. C. Baan, M. H. Dahlke and M. J. Hoogduijn (2012). "Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion." Frontiers in immunology **3**: 297.

Esmaili, S., A. Xu and J. George (2014). "The multifaceted and controversial immunometabolic actions of adiponectin." Trends in Endocrinology & Metabolism **25**(9): 444-451.

Fabeck, L., D. Ghafil, M. Gerroudj, R. Baillon and P. Delincé (2006). "Bone morphogenetic protein 7 in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia." The Journal of bone and joint surgery. British volume **88**(1): 116-118.

Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." International Journal of Cancer **136**(5).

Fève, B. and N. Mercier (0100). "Adipocyte, une cellule en devenir." MT Cardio **3**(1).

Fraga, M., R. Nishio, R. Ishikawa, L. Perin, A. Helene and C. Malheiros (2010). "Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **63**(12).

Freyria, A. M., S. Courtes and F. Mallein-Gerin (2008). "[Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]." Pathologie-biologie **56**(5): 326-333.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.

Fu, S., J. Luan, M. Xin, Q. Wang, R. Xiao and Y. Gao (2013). "Fate of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells after Co-implantation with Fat Grafts: Evidence of Cell Survival and Differentiation in Ischemic Adipose Tissue." Plastic and Reconstructive Surgery **132**(2): 363.

Gale, K. L., E. A. Rakha, G. Ball, V. K. Tan, S. J. McCulley and D. R. Macmillan (2015). "A Case-Controlled Study of the Oncologic Safety of Fat Grafting." Plastic and Reconstructive Surgery **135**(5): 1263.

García-Gareta, E., M. J. Coathup and G. W. Blunn (2015). "Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration." Bone **81**: 112-121.

Gardin, C., E. Bressan, L. Ferroni, E. Nalesso, V. Vindigni, E. Stellini, P. Pinton, S. Sivoletta and B. Zavan (2012). "In Vitro Concurrent Endothelial and Osteogenic Commitment of Adipose-Derived Stem Cells and Their Genomical Analyses Through Comparative Genomic Hybridization Array: Novel Strategies to Increase the Successful Engraftment of Tissue-Engineered Bone Grafts." Stem Cells and Development **21**(5): 767-777.

Garza, R. M., R. C. Rennert, K. J. Paik, D. Atashroo, M. T. Chung, D. Duscher, M. Januszyk, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2015). "Studies in Fat Grafting: Part IV. Adipose-Derived Stromal Cell Gene Expression in Cell-Assisted Lipotransfer." Plastic and Reconstructive Surgery **135**(4): 1045.

Gentile, P., B. De Angelis, M. Pasin, G. Cervelli, C. B. Curcio, M. Floris, C. Di Pasquali, I. Bocchini, A. Balzani, F. Nicoli, C. Insalaco, E. Tati, L. Lucarini, L. Palla, M. Pascali, P. De Logu, C. Di Segni, D. J. Bottini and V. Cervelli (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**(1): 267-272.

Gentile, P., C. Di Pasquali, I. Bocchini, M. Floris, T. Eleonora, V. Fiaschetti, R. Floris and V. Cervelli (2013). "Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma." Surgical innovation **20**(4): 370-376.

Gentile, P., A. Orlandi, M. G. Scioli, D. C. Pasquali, I. Bocchini and V. Cervelli (2012). "Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery." Stem Cells Translational Medicine **1**(3): 230-236.

Gentile, P., A. Orlandi, M. G. Scioli, D. C. Pasquali, I. Bocchini, C. B. Curcio, M. Floris, V. Fiaschetti, R. Floris and V. Cervelli (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**(4): 341-351.

Gentile, P., M. Scioli, A. Orlandi and V. Cervelli (2015). "Breast Reconstruction with Enhanced Stromal Vascular Fraction Fat Grafting: What Is the Best Method?" Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open **3**(6).

Geuze, R. E., H.-J. Prins, C. F. Öner, Y. J. M. van der Helm, L. S. Schuijff, A. C. Martens, M. C. Kruyt, J. Alblas and W. J. A. Dhert (2010). "Luciferase Labeling for Multipotent Stromal Cell

Tracking in Spinal Fusion Versus Ectopic Bone Tissue Engineering in Mice and Rats." Tissue Engineering Part A **16**(11): 3343-3351.

Girard, A.-C. C., S. Mirbeau, L. Gence, V. Hivernaud, P. Delarue, O. Hulard, F. Festy and R. Roche (2015). "Effect of Washes and Centrifugation on the Efficacy of Lipofilling With or Without Local Anesthetic." Plastic and reconstructive surgery. Global open **3**(8).

Granel, B., A. Daumas, E. Jouve, J.-R. R. Harlé, P.-S. S. Nguyen, C. Chabannon, N. Colavolpe, J.-C. C. Reynier, R. Truillet, S. Mallet, A. Baiada, D. Casanova, L. Giraud, L. Arnaud, J. Veran, F. Sabatier and G. Magalon (2015). "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." Annals of the rheumatic diseases **74**(12): 2175-2182.

Gutowski, K. A. and A. Force (2009). "Current Applications and Safety of Autologous Fat Grafts: A Report of the ASPS Fat Graft Task Force." Plastic and Reconstructive Surgery **124**(1): 272-280.

Güven, S., A. Mehrkens, F. Saxer, D. J. Schaefer, R. Martinetti, I. Martin and A. Scherberich (2011). "Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue." Biomaterials **32**(25): 5801-5809.

Has (0100). "Evaluation de la sécurité et des conditions de réalisation de l'autogreffe de tissu adipeux dans la chirurgie reconstructrice, réparatrice et esthétique du sein." Rapport de la HAS.

Haynesworth, S. E., J. Goshima, V. M. Goldberg and A. I. Caplan (1992). "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow." Bone **13**(1): 81-88.

Hivernaud, V., B. Lefourn, J. Guicheux, P. Weiss, F. Festy, A.-C. C. Girard and R. Roche (2015). "Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements." Aesthetic plastic surgery **39**(4): 547-561.

Hoareau, L., K. Bencharif, A.-C. C. Girard, L. Gence, P. Delarue, O. Hulard, F. Festy and R. Roche (2013). "Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency." Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS **66**(5): 712-719.

Hughes, A. P., F. Taher, M. Farshad and A. Aichmair (2013). "Multiple myeloma exacerbation following utilization of bone morphogenetic protein-2 in lateral lumbar interbody fusion: a case report and review of the literature." The spine journal : official journal of the North American Spine Society **14**(4): 9.

Hyun, S.-J. J., D.-K. K. Han, S.-H. H. Choi, J.-K. K. Chai, K.-S. S. Cho, C.-K. K. Kim and C.-S. S. Kim (2005). "Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects." Journal of periodontology **76**(10): 1667-1674.

Inoda, H., G. Yamamoto and T. Hattori (2004). "Histological investigation of osteoinductive properties of rh-BMP2 in a rat calvarial bone defect model." Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery **32**(6): 365-369.

Intini, G., S. Andreana, F. E. Intini, R. J. Buhite and L. A. Bobek (2007). "Calcium Sulfate and Platelet-Rich Plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration." Journal of Translational Medicine **5**(1): 13.

Javed, A., H. Chen and F. Y. Ghorri (2010). "Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation." Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America **22**(3): 283-293.

Jung, H. K., C. H. Kim and S. Y. Song (2015). "Prospective 1-Year Follow-Up Study of Breast Augmentation by Cell-Assisted Lipotransfer." Aesthetic surgery journal / the American Society for Aesthetic Plastic surgery.

Kaigler, D., Z. Wang, K. Horger, D. J. Mooney and P. H. Krebsbach (2006). "VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **21**(5): 735-744.

Kakudo, N., N. Morimoto, T. Ogawa, M. Hihara, P. V. Notodihardjo, M. Matsui, Y. Tabata and K. Kusumoto (2015). "Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis." Journal of tissue engineering and regenerative medicine.

Kamakura, T. and K. Ito (2011). "Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation." Aesthetic plastic surgery **35**(6): 1022-1030.

Kang, B.-J., H.-H. Ryu, S. Park, Y. Koyama, M. Kikuchi, H.-M. Woo, W. Kim and O.-K. Kweon (2012). "Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects." Journal of veterinary science **13**(3): 299-310.

Kasten, P., M. Beverungen, H. Lorenz, J. Wieland, M. Fehr and F. Geiger (2012). "Comparison of Platelet-Rich Plasma and VEGF-Transfected Mesenchymal Stem Cells on Vascularization and Bone Formation in a Critical-Size Bone Defect." Cells Tissues Organs **196**(6): 523-533.

Keck, M., J. Kober, O. Riedl, H. B. Kitzinger, S. Wolf, T. M. Stulnig, M. Zeyda and A. Gugerell (2014). "Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem cells: Impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **67**(1).

Kelly, M. P., J. W. Savage, S. M. Bentzen, W. K. Hsu, S. A. Ellison and P. A. Anderson (2014). "Cancer Risk from Bone Morphogenetic Protein Exposure in Spinal Arthrodesis." The Journal of Bone & Joint Surgery **96**(17): 1417-1422.

Kersten, S. (2014). "Physiological regulation of lipoprotein lipase." Biochimica et biophysica acta **1841**(7): 919-933.

Keyhan, S., S. Hemmat, A. Badri, A. Abdeshahzadeh and K. Khiabani (2013). "Use of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Plasma in Combination With Fat Graft: Which Is More Effective During Facial Lipostructure?" Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **71**(3): 610-621.

Khouri, R. K., G. Rigotti, E. Cardoso, R. K. Khouri and T. M. Biggs (2014). "Megavolume Autologous Fat Transfer: Part I. Theory and Principles." Plastic and Reconstructive Surgery **133**(3): 550.

Kim, J., I. Kim, T. Cho, K. Lee, S. Hwang, G. Tae, I. Noh, S. Lee, Y. Park and K. Sun (2007). "Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells." Biomaterials **28**(10): 1830-1837.

Kim, S. W., P. D. Pajevic, M. Selig, K. J. Barry, J.-Y. Y. Yang, C. S. Shin, W.-Y. Y. Baek, J.-E. E. Kim and H. M. Kronenberg (2012). "Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **27**(10): 2075-2084.

Kling, R. E., B. J. Mehrara, A. L. Pusic, L. V. Young, K. M. Hume, C. A. Crotty and P. J. Rubin (2013). "Trends in Autologous Fat Grafting to the Breast: A National Survey of the American Society of Plastic Surgeons." Plastic and Reconstructive Surgery **132**(1): 35.

Kølle, S.-F., A. Fischer-Nielsen, A. Mathiasen, J. Elberg, R. S. Oliveri, P. V. Glovinski, J. Kastrup, M. Kirchhoff, B. Rasmussen, M.-L. Talman, C. Thomsen, E. Dickmeiss and K. Drzewiecki (2013). "Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial." The Lancet **382**(9898): 1113-1120.

Krings, A., S. Rahman, S. Huang, Y. Lu, P. J. Czernik and B. Lecka-Czernik (2011). "Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes." Bone **50**(2): 546-552.

Kumar, S., C. Wan, G. Ramaswamy, T. L. Clemens and S. Ponnazhagan (2010). "Mesenchymal Stem Cells Expressing Osteogenic and Angiogenic Factors Synergistically Enhance Bone Formation in a Mouse Model of Segmental Bone Defect." Molecular Therapy **18**(5): 1026-1034.

Kushida, S., N. Kakudo, N. Morimoto, T. Hara, T. Ogawa, T. Mitsui and K. Kusumoto (2014). "Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems." Journal of Artificial Organs **17**(2): 186-192.

Laforest, S., J. Labrecque, A. Michaud, K. Cianflone and A. Tcherno (2015). "Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **52**(6): 301-313.

Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science (New York, N.Y.) **260**(5110): 920-926.

Largo, R. D., L. Tchang, V. Mele, A. Scherberich, Y. Harder, R. Wettstein and D. J. Schaefer (2014). "Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: A systematic review." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **67**(4): 437-448.

Leopardi, D., P. Thavaneswaran, K. L. A. Mutimer, N. A. Olbourne and G. J. Maddern (2014). "Autologous fat transfer for breast augmentation: a systematic review." ANZ Journal of Surgery **84**(4): 225-230.

Levi, B., J. S. Hyun, D. T. Montoro, D. D. Lo, C. K. F. Chan, S. Hu, N. Sun, M. Lee, M. Grova, A. J. Connolly, J. C. Wu, G. C. Gurtner, I. L. Weissman, D. C. Wan and M. T. Longaker (2012). "In vivo directed differentiation of pluripotent stem cells for skeletal regeneration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(50): 20379-20384.

Levi, B., A. W. James, E. R. Nelson, S. Hu, N. Sun, M. Peng, J. Wu and M. T. Longaker (2011). "Studies in adipose-derived stromal cells: migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection." Plastic and reconstructive surgery **127**(3): 1130-1140.

Levi, B., A. W. James, E. R. Nelson, M. Peng, D. C. Wan, G. W. Commons, M. Lee, B. Wu and M. T. Longaker (2011). "Acute skeletal injury is necessary for human adipose-derived stromal cell-mediated calvarial regeneration." Plastic and reconstructive surgery **127**(3): 1118-1129.

Li, F., W. Guo, K. Li, M. Yu, W. Tang, H. Wang and W. Tian (2015). "Improved Fat Graft Survival by Different Volume Fractions of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells." Aesthetic Surgery Journal **35**(3): 319-333.

Li, K., J. Gao, Z. Zhang, J. Li, P. Cha, Y. Liao, G. Wang and F. Lu (2012). "Selection of donor site for fat grafting and cell isolation." Aesthetic plastic surgery **37**(1): 153-158.

Li, L., S. Pan, B. Ni and Y. Lin (2014). "Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres." Cell biology international **38**(8): 962-970.

Lin, B.-N., S. Whu, C.-H. Chen, F.-Y. Hsu, J.-C. Chen, H.-W. Liu, C.-H. Chen and H.-M. Liou (2012). "Bone marrow mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma and nanohydroxyapatite-type I collagen beads were integral parts of biomimetic bone substitutes for bone regeneration." Journal of tissue engineering and regenerative medicine **7**(11): 841-854.

Lissenberg-Thunnissen, S. N., D. J. J. de Gorter, C. F. Sier and I. B. Schipper (2011). "Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing." International orthopaedics **35**(9): 1271-1280.

Liu, T., M. Martina, D. W. Huttmacher, J. Hui, E. Lee and B. Lim (2007). "Identification of Common Pathways Mediating Differentiation of Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived

Human Mesenchymal Stem Cells into Three Mesenchymal Lineages." STEM CELLS **25**(3): 750-760.

Liu, Y., J. K. Chan and S.-H. H. Teoh (2015). "Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems." Journal of tissue engineering and regenerative medicine **9**(2): 85-105.

Liu, Y., L. Wang, T. Kikuri, K. Akiyama, C. Chen, X. Xu, R. Yang, W. Chen, S. Wang and S. Shi (2011). "Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α ." Nature medicine **17**(12): 1594-1601.

Lu, F., J. Li, J. Gao, R. Ogawa, C. Ou, B. Yang and B. Fu (2009). "Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells." Plastic and reconstructive surgery **124**(5): 1437-1446.

Luan, A., D. Duscher, A. J. Whittam, K. J. Paik, E. R. Zielins, E. A. Brett, D. A. Atashroo, M. S. Hu, G. K. Lee, G. C. Gurtner, M. T. Longaker and D. C. Wan (2015). "Cell-Assisted Lipotransfer Improves Volume Retention in Irradiated Recipient Sites and Rescues Radiation-Induced Skin Changes." STEM CELLS.

Luo, X., W. Cao, H. Xu, L. Wang, Z. Zhang, Y. Lu, X. Jin, X. Ren, J. He, M. Fu, Y. Huang, Q. Pi and Z. Fan (2015). "Coimplanted endothelial cells improve adipose tissue grafts' survival by increasing vascularization." The Journal of craniofacial surgery **26**(2): 358-364.

Lutolf, M. P., F. E. Weber, H. G. Schmoekel, J. C. Schense, T. Kohler, R. Müller and J. A. Hubbell (2003). "Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices." Nature Biotechnology **21**(5): 513-518.

Ma, J., S. K. Both, W. Ji, F. Yang, H. J. Prins, M. N. Helder, J. Pan, F. Z. Cui, J. A. Jansen and J. J. P. van den Beucken (2014). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as monocultures or cocultures with human umbilical vein endothelial cells: Performance in vitro and in rat cranial defects." Journal of Biomedical Materials Research Part A **102**(4): 1026-1036.

Magalon, J., O. Bausset, N. Serratrice, L. Giraudou, H. Aboudou, J. Veran, G. Magalon, F. Dignat-Georges and F. Sabatier (2014). "Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model." Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association **30**(5): 629-638.

Mailey, B., S. Saba, J. Baker, C. Tokin, S. Hickey, R. Wong, A. M. Wallace and S. R. Cohen (2013). "A comparison of cell-enriched fat transfer to conventional fat grafting after aesthetic procedures using a patient satisfaction survey." Annals of plastic surgery **70**(4): 410-415.

Malard, O., F. Espitalier, P. Bordure, G. Daculsi, P. Weiss and P. Corre (2007). "Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck." Expert review of medical devices **4**(5): 729-739.

Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov and P. Robey (2007). "Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density." Experimental hematology **35**(6): 995-1004.

Marden, L. J., J. O. Hollinger, A. Chaudhari, T. Turek, R. G. Schaub and E. Ron (1994). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats." Journal of biomedical materials research **28**(10): 1127-1138.

Matsumoto, D., K. Sato, K. Gonda, Y. Takaki, T. Shigeura, T. Sato, E. Aiba-Kojima, F. Iizuka, K. Inoue, H. Suga and K. Yoshimura (2006). "Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection." Tissue engineering **12**(12): 3375-3382.

Mehrkens, A., N. Di Maggio, S. Gueven, D. Schaefer, A. Scherberich, A. Banfi and I. Martin (2014). "Non-adherent mesenchymal progenitors from adipose tissue stromal vascular fraction." Tissue engineering. Part A **20**(5-6): 1081-1088.

Mehrkens, A., F. Saxer, S. Güven, W. Hoffmann, A. M. Müller, M. Jakob, F. E. Weber, I. Martin and A. Scherberich (2012). "Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2." European cells & materials **24**: 308-319.

Mestak, O., V. Hromadkova, M. Fajfrova, M. Molitor and J. Mestak (2015). "Evaluation of Oncological Safety of Fat Grafting After Breast-Conserving Therapy: A Prospective Study." Annals of Surgical Oncology.

Mojallal, A. and J. L. Foyatier (2004). "[Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery]." Annales de chirurgie plastique et esthétique **49**(5): 419-425.

Mountziaris, P. M. and A. G. Mikos (2008). "Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration." Tissue Engineering Part B: Reviews **14**(2): 179-186.

Nakamura, S., M. Ishihara, M. Takikawa, K. Murakami, S. Kishimoto, S. Nakamura, S. Yanagibayashi, S. Kubo, N. Yamamoto and T. Kiyosawa (2010). "Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats." Annals of plastic surgery **65**(1): 101-106.

Nelissen, X., F. Lhoest and L. Preud'Homme (2015). "Refined Method of Lipofilling following DIEP Breast Reconstruction: 3D Analysis of Graft Survival." Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open **3**(9).

Notodihardjo, F., N. Kakudo, S. Kushida, K. Suzuki and K. Kusumoto (2012). "Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats." Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery **40**(3): 287-291.

Olivo, C., J. Alblas, V. Verweij, A. J. Zonneveld, W. J. A. Dhert and A. C. M. Martens (2008). "In vivo bioluminescence imaging study to monitor ectopic bone formation by luciferase gene marked mesenchymal stem cells." Journal of Orthopaedic Research **26**(7): 901-909.

Osathanon, T., M. L. Linnes, R. M. Rajachar, B. D. Ratner, M. J. Somerman and C. M. Giachelli (2008). "Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **29**(30): 4091-4099.

Pace, M. M., A. Chatterjee, D. G. Merrill, M. A. Stotland and E. B. Ridgway (2013). "Local Anesthetics in Liposuction: Considerations for New Practice Advisory Guidelines to Improve Patient Safety." Plastic and Reconstructive Surgery **131**(5): 820.

Panettiere, P., D. Accorsi, L. Marchetti, A. M. Minicozzi, G. Orsini, P. Bernardi, D. Benati, G. Conti and A. Sbarbati (2011). "The trochanteric fat pad." European journal of histochemistry : EJH **55**(2).

Park, E.-J. J., E.-S. S. Kim, H.-P. P. Weber, R. F. Wright and D. J. Mooney (2008). "Improved bone healing by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone morphogenetic protein-2." The International journal of oral & maxillofacial implants **23**(5): 818-826.

Peltoniemi, H. H., A. Salmi, S. Miettinen, B. Mannerström, K. Saariniemi, R. Mikkonen, H. Kuokkanen and C. Herold (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 : JPRAS **66**(11): 1494-1503.

Pérez-Cano, R., J. J. Vranckx, J. M. Lasso, C. Calabrese, B. Merck, A. M. Milstein, E. Sassoon, E. Delay and E. M. Weiler-Mithoff (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 (EJSO) **38**(5): 382-389.

Peterson, M. J., S. A. Czerwinski and R. M. Siervogel (2003). "Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model." The American journal of clinical nutrition **77**(5): 1186-1191.

Petit, J. Y., E. Botteri, V. Lohsiriwat, M. Rietjens, D. F. Lorenzi, C. Garusi, F. Rossetto, S. Martella, A. Manconi, F. Bertolini, G. Curigliano, P. Veronesi, B. Santillo and N. Rotmensz (2012). "Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients." Annals of Oncology **23**(3): 582-588.

Petit, J. Y., M. Rietjens, E. Botteri, N. Rotmensz, F. Bertolini, G. Curigliano, P. Rey, C. Garusi, D. F. Lorenzi, S. Martella, A. Manconi, B. Barbieri, P. Veronesi, M. Intra, T. Brambullo, A. Gottardi, M. Sommario, G. Lomeo, M. Iera, V. Giovino and V. Lohsiriwat (2013). "Evaluation of fat grafting safety in patients with intra epithelial neoplasia: a matched-cohort study." Annals of Oncology **24**(6): 1479-1484.

Philips, B. J., T. L. Grahovac, J. E. Valentin, C. W. Chung, J. M. Bliley, M. E. Pfeifer, S. B. Roy, S. Dreifuss, A. Kelmendi-Doko, R. E. Kling, S. K. Ravuri, K. G. Marra, V. S. Donnenberg, A. D. Donnenberg and P. J. Rubin (2013). "Prevalence of Endogenous CD34+ Adipose Stem Cells Predicts Human Fat Graft Retention in a Xenograft Model." Plastic and Reconstructive Surgery **132**(4): 845.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." Science **284**(5411): 143-147.

Por, Y.-C., V. Yeow, N. Louri, T. Lim, I. Kee and I.-C. Song (2008). "Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse." Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS **62**(8): 1030-1034.

Prins, H. J., H. Fernandes, H. Rozemuller, C. Blitterswijk, J. Boer and A. C. M. Martens (2012). "Spatial distribution and survival of human and goat mesenchymal stromal cells on hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla and A. Blancher (2005). "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells." British Journal of Haematology **129**(1): 118-129.

Reddi, A. H. and C. Huggins (1972). "Biochemical Sequences in the Transformation of Normal Fibroblasts in Adolescent Rats." Proceedings of the National Academy of Sciences **69**(6): 1601-1605.

Rho, J.-Y., L. Kuhn-Spearing and P. Zioupos (1998). "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone." Medical Engineering & Physics **20**(2): 92-102.

Rigotti, G., A. Marchi, P. Stringhini, G. Baroni, M. Galiè, A. Molino, A. Mercanti, R. Micciolo and A. Sbarbati (2010). "Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction." Aesthetic plastic surgery **34**(4): 475-480.

Ripamonti, U. (1996). "Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models." Biomaterials **17**(1): 31-35.

Rodríguez-Flores, J., M. Palomar-Gallego, A. Enguita-Valls, J. Rodríguez-Peralto and J. Torres (2010). "Influence of platelet-rich plasma on the histologic characteristics of the autologous fat graft to the upper lip of rabbits." Aesthetic plastic surgery **35**(4): 480-486.

Rodríguez, A., S. Ezquerro, L. Méndez-Giménez, S. Becerril and G. Frühbeck (2015). "Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of

energy metabolism." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **309**(8): 714.

Rohrich, R. J., E. S. Sorokin and S. A. Brown (2004). "In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site." Plastic and reconstructive surgery **113**(1): 391.

Rubin, P. J., D. Coon, M. Zuley, J. Toy, Y. Asano, M. Kurita, N. Aoi, K. Harii and K. Yoshimura (2012). "Mammographic changes after fat transfer to the breast compared with changes after breast reduction: a blinded study." Plastic and reconstructive surgery **129**(5): 1029-1038.

Sakaguchi, Y., I. Sekiya, K. Yagishita and T. Muneta (2005). "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source." Arthritis and rheumatism **52**(8): 2521-2529.

Salgarello, M., G. Visconti and A. Rusconi (2011). "Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art." Plastic and reconstructive surgery **127**(6): 2176-2185.

Sano, H., H. Orbay, H. Terashi, H. Hyakusoku and R. Ogawa (2013). "Acellular adipose matrix as a natural scaffold for tissue engineering." Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS **67**(1): 99-106.

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**(6): 833-846.

Schubert, T., D. Xhema, S. Vériter, M. Schubert, C. Behets, C. Delloye, P. Gianello and D. Dufrane (2011). "The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells." Biomaterials **32**(34): 8880-8891.

Seebach, C., D. Henrich, K. Wilhelm, J. H. Barker and I. Marzi (2012). "Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats." Cell transplantation **21**(8): 1667-1677.

Serratrice, N., L. Bruzzese, J. Magalon, J. Véran, L. Giraud, H. Aboudou, D. Ould-Ali, P. S. Nguyen, O. Bausset, A. Daumas, D. Casanova, B. Granel, L. Andrac-Meyer, F. Sabatier and G. Magalon (2014). "New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice." Stem cell research & therapy **5**(6): 138.

Seyhan, N., D. Alhan, A. U. Ural, A. Gunal, M. C. Avunduk and N. Savaci (2015). "The effect of combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on fat graft survival." Annals of plastic surgery **74**(5): 615-620.

Shiffman, M. A. and S. Mirrafati (2001). "Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature." Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.] **27**(9): 819-826.

Shrivats, A. R., M. C. McDermott and J. O. Hollinger (2014). "Bone tissue engineering: state of the union." Drug discovery today **19**(6): 781-786.

Siu, R. K., S. S. Lu, W. Li, J. Whang, G. McNeill, X. Zhang, B. M. Wu, S. A. Turner, H. B. Seim, P. Hoang, J. C. Wang, A. A. Gertzman, K. Ting and C. Soo (2011). "Nell-1 Protein Promotes Bone Formation in a Sheep Spinal Fusion Model." Tissue Engineering Part A **17**(7-8): 1123-1135.

Small, K., M. Choi, O. Petruolo, C. Lee and N. Karp (2014). "Is There an Ideal Donor Site of Fat for Secondary Breast Reconstruction?" Aesthetic Surgery Journal **34**(4): 545-550.

Smit, J. M., H. J. P. Tielemans, B. de Vries and S. M. H. Tuinder (2014). "Recurrence of invasive ductal breast carcinoma 10 months after autologous fat grafting." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **67**(5).

Spaggiari, G., A. Capobianco, S. Becchetti, M. Mingari and L. Moretta (2005). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." Blood **107**(4): 1484-1490.

Spiro, R. C., L. Liu, M. A. Heidarani, A. Y. Thompson, C. K. Ng, J. Pohl and J. W. Poser (2000). "Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5." Biochemical Society transactions **28**(4): 362-368.

Sterodimas, A., J. de Faria, B. Nicaretta and F. Boriani (2011). "Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study." Aesthetic surgery journal / the American Society for Aesthetic Plastic surgery **31**(6): 682-693.

Strioga, M., S. Viswanathan, A. Darinskis, O. Slaby and J. Michalek (2012). "Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells." Stem Cells and Development **21**(14): 2724-2752.

Sweeny, L., W. P. Lancaster, N. R. Dean, S. J. Magnuson, W. R. Carroll, P. J. Louis and E. L. Rosenthal (2012). "Use of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 in Free Flap Reconstruction for Osteonecrosis of the Mandible." Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **70**(8): 1991-1996.

Szpalski, C., M. Barbaro, F. Sagebin and S. M. Warren (2012). "Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques—Part II: Cell Types." Tissue Engineering Part B: Reviews **18**(4): 258-269.

Tanikawa, D. Y. S., M. Agüena, D. F. Bueno, M. Passos-Bueno and N. Alonso (2013). "Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsomia." Plastic and reconstructive surgery **132**(1): 141-152.

Tavassoli, M. and W. H. Crosby (1968). "Transplantation of marrow to extramedullary sites." Science (New York, N.Y.) **161**(3836): 54-56.

Terella, A., P. Mariner, N. Brown, K. Anseth and S.-O. O. Streubel (2010). "Repair of a calvarial defect with biofactor and stem cell-embedded polyethylene glycol scaffold." Archives of facial plastic surgery **12**(3): 166-171.

Tiryaki, T., N. Findikli and D. Tiryaki (2011). "Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report." Aesthetic plastic surgery **35**(6): 965-971.

Trojani, C., T. Balaguer, F. Boukhechba, F. G. Carle, P. Boileau and N. Rochet (2008). "Inventaire des stratégies cellulaires en ingénierie tissulaire de reconstruction osseuse." Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur **94**(1): 1-11.

Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, K. Cox, S. Kakar, L. Gerstenfeld, T. Einhorn, C. J. Tabin and V. Rosen (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing." Nature genetics **38**(12): 1424-1429.

Ueberreiter, K., J. G. von Finckenstein, F. Cromme, C. Herold, U. Tanzella and P. M. Vogt (2010). "[BEAULI™--a new and easy method for large-volume fat grafts]." Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefäße : Organ der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen **42**(6): 379-385.

Wabitsch, M., J.-B. B. Funcke, B. Lennerz, U. Kuhnle-Krahl, G. Lahr, K.-M. M. Debatin, P. Vatter, P. Gierschik, B. Moepps and P. Fischer-Posovszky (2015). "Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity." The New England journal of medicine **372**(1): 48-54.

Wang, L., X. Luo, Y. Lu, Z.-H. H. Fan and X. Hu (2015). "Is the Resorption of Grafted Fat Reduced in Cell-Assisted Lipotransfer for Breast Augmentation?" Annals of plastic surgery **75**(2): 128-134.

Wen, Y., W. Gu, J. Cui, M. Yu, Y. Zhang, C. Tang, P. Yang and X. Xu (2014). "Platelet-rich plasma enhanced umbilical cord mesenchymal stem cells-based bone tissue regeneration." Archives of Oral Biology **59**(11): 1146-1154.

Willemsen, J. C., B. van der Lei, K. M. Vermeulen and H. P. Stevens (2014). "The effects of platelet-rich plasma on recovery time and aesthetic outcome in facial rejuvenation: preliminary retrospective observations." Aesthetic plastic surgery **38**(5): 1057-1063.

Wronska, A. and Z. Kmiec (2012). "Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots." Acta Physiologica **205**(2): 194-208.

Wu, I., Z. Nahas, K. A. Kimmerling, G. D. Rosson and J. H. Elisseeff (2012). "An Injectable Adipose Matrix for Soft-Tissue Reconstruction." Plastic and Reconstructive Surgery **129**(6): 1247.

Yang, Z., H. Yuan, W. Tong, P. Zou, W. Chen and X. Zhang (1996). "Osteogenesis in extraskelentially implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals." Biomaterials **17**(22): 2131-2137.

Yoshikawa, T., H. Ohgushi and S. Tamai (1996). "Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite." Journal of biomedical materials research **32**(3): 481-492.

Yoshimoto, T., M. Yamamoto, H. Kadomatsu, K. Sakoda, Y. Yonamine and Y. Izumi (2006). "Recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) induced bone formation in murine calvariae." Journal of periodontal research **41**(2): 140-147.

Yoshimura, K., Y. Asano, N. Aoi, M. Kurita, Y. Oshima, K. Sato, K. Inoue, H. Suga, H. Eto, H. Kato and K. Harii (2010). "Progenitor-Enriched Adipose Tissue Transplantation as Rescue for Breast Implant Complications." The Breast Journal **16**(2): 169-175.

Yoshimura, K., K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi and K. Harii (2007). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." Aesthetic plastic surgery **32**(1): 48.

Yoshimura, K., K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, K. Inoue, H. Suga, H. Eto, H. Kato, T. Hirohi and K. Harii (2008). "Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells." Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.] **34**(9): 1178-1185.

Yuan, H., D. J. D. Bruijn, X. Zhang, V. C. A. Blitterswijk and D. K. Groot (2001). "Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier." Journal of materials science. Materials in medicine **12**(9): 761-766.

Yueyi, C., H. Xiaoguang, W. Jingying, S. Quansheng, T. Jie, F. Xin, X. Yingsheng and S. Chunli (2013). "Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin." Biomaterials **34**(37): 9373-9380.

Zhang, C., K.-z. Wang, H. Qiang, Y.-l. Tang, Q. Li, M. Li and X.-q. Dang (2010). "Angiopoiesis and bone regeneration via co-expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno-associated viral vector in vitro and in vivo." Acta Pharmacologica Sinica **31**(7): 821-830.

Zhang, Y., A. Daquinag, D. O. Traktuev, F. Amaya-Manzanares, P. J. Simmons, K. L. March, R. Pasqualini, W. Arap and M. G. Kolonin (2009). "White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer Progression in Mouse Models." Cancer Research **69**(12): 5259-5266.

Zou, J., C. Yuan, C. Wu, C. Cao and H. Yang (2014). "The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells." Connective Tissue Research **55**(4): 304-309.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue engineering **7**(2): 211-228.

ANNEXES

ANNEXE I : Matériel et Méthodes utilisés lors du travail de thèse

A. Prélèvements de tissus au bloc opératoire:

1. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est obtenu à partir de lipoaspiration de patient à la clinique Bretéché de Nantes. Chaque patient a donné son consentement éclairé (dossier DC-2011-1399 du Comité de Protection des Personnes).

Pour l'étude de comparaison des techniques de lipotransfert, les patientes incluses ont subi une lipoplastie abdominale où la zone d'aspiration a été divisée en 5.

Pour tous les protocoles d'aspiration sauf pour le protocole WAL (Water Assisted Lipoaspiration), le site donneur a été infiltré avec une solution saline (NaCl 0.9% et adrénaline 2%) (BBraun). La quantité de liquide d'infiltration est égale à la quantité de tissu adipeux à prélevé (ratio 1:1). Pour le protocole WAL, la solution saline est infiltrée durant la lipoaspiration comme précisé par le fournisseur (BodyJet, Human med).

Pour la technique Coleman (Lipostructure[®]), le tissu adipeux est prélevé avec une canule de prélèvement de 3mm de diamètre à une ouverture couplée à une seringue de 10cc. La dépression dans la seringue est contrôlée pour rester inférieure à 2cc.

Pour le protocole WAL (BodyJet), le tissu est infiltré et aspiré simultanément avec l'appareil BodyJet où l'infiltration est réglée sur 2 et l'aspiration réglée à 0,5atm (approximativement 380mmHg).

Pour le protocole PAL, l'aspiration est effectuée avec une canule multi-trous de 3mm de diamètre connecté à l'appareil PAL (PAL, microaire). La vibration de la canule est réglée sur 5 sur une échelle de 10 et l'aspiration est réglée à 0,5atm.

Pour le protocole Microfill (Adip'sculpt), l'aspiration est effectuée avec une canule multi-trous de 2mm de diamètre connectée à une seringue de 10cc. Ici encore, l'aspiration est contrôlée pour ne pas dépasser 2cc de dépression.

Pour le protocole Macrofill (Adip'sculpt), l'aspiration se fait avec une canule multi-trous de 3,5mm de diamètre connectée à une seringue 50cc. La seringue utilisée est une seringue à incrément dont le piston peut être bloqué à différents niveaux permettant ici encore de contrôler l'aspiration.

2. Prélèvement de sang

Pour permettre la création de PRP autologue pour les manipulations d'ingénierie tissulaire osseuse, 2 tubes de sang de 8cc sont prélevés par abord veineux au moment de l'anesthésie des patients qui ont donné leur consentement éclairé.

3. Prélèvement de greffe osseuse et de moelle osseuse humaine

Le témoin positif de l'étude d'ingénierie tissulaire osseuse en calvaria de rat nude est la greffe osseuse. Ce tissu correspond à un déchet d'opération d'un patient de 20 ans avec une séquelle de fente labio-palatine obtenu en accord avec le patient et le protocole de gestion des tissus biologiques de l'hôpital de Nantes. Le prélèvement est effectué au niveau iliaque. La moelle osseuse du patient est récupéré dans les mêmes conditions que la greffe osseuse et a servie à l'implantation sans traitement ainsi qu'à l'isolation des cellules souches mésenchymateuses de moelle humaine. Les analyses cytologiques et myelographique de cette moelle osseuse ont été effectuées par le service d'hématologie de l'hôpital de Nantes.

4. Prélèvement de moelle osseuse de rat

Les rats donneurs sont sacrifiés (soit au CO₂ soit par injection intracardiaque de sodium thiopental (Nesdonal, Mérieux)). Les fémurs et les tibias des animaux sont récupérés. Les extrémités des os sont coupées aux ciseaux et chaque os est ensuite le volume désiré de solution saline est injectée dans les fûts osseux à plusieurs reprises pour récolter les cellules de la moelle de la diaphyse. L'opération est effectuée au-dessus d'un récipient stérile. La moelle osseuse ainsi récupérée est soit utilisée extemporanément ou alors sert à l'isolation des cellules souches mésenchymateuses.

B. Préparation des différents tissus

1. Purification du tissu adipeux

Pour la technique Coleman, le lipoaspirat prélevé a été purifié par une centrifugation de 3000rpm pendant 3min dans la centrifugeuse Adip'spin (Adip'sculpt). Suite à cette centrifugation les phases supérieures et inférieures (huileuse et aqueuse respectivement) ont été enlevées par une canule de transfert connectée à une seringue de 10cc.

Pour le protocole WAL, le tissu aspiré par l'appareil BodyJet est directement envoyé dans un piège à graisse (Lipocollector 3, Human med) pour subir une décantation d'environ 15min. Après décantation la phase inférieure aqueuse est retirée grâce à une canule de transfert connectée à une seringue de 50cc. Puis la phase intermédiaire adipeuse est prélevée avec une autre canule connectée à une autre seringue de 50cc en évitant de prélever la phase huileuse supérieure.

Pour le protocole PAL, le lipoaspirat est purifié en étant lavé et filtré dans une poche de lavage (PureGraft, Cytori) selon les instructions du fournisseur. Le lipoaspirat est introduit dans la poche puis, le même volume de Ringer Lactate (BBraun) est introduit. Après plusieurs renversements manuels de la poche, les déchets sont récupérés avec une seringue de 50cc connectée de l'autre côté de la poche. Cette opération est répétée une deuxième fois.

Pour les protocoles Microfill et Macrofill, le tissu aspiré est traité selon le protocole suivant : 15cc de Ringer Lactate sont additionnés à 35cc de graisse et le tout est centrifugé pendant 1s à 100g. Cette opération est répétée 2 fois, avec toutefois une vitesse de 400g pendant 1min pour la dernière centrifugation. Après chaque centrifugation les phases inférieures et supérieures sont enlevées avec une canule de transfert connectée à une seringue de 10cc.

2. Préparation du PRP

Le Plasma Riche en Plaquette est préparé à l'aide du kit Regenkit (Regenlab, Le Mont-sur-Lausanne, Suisse). Deux tubes de sang sont prélevés, l'un nommé BCT avec anti-coagulant (citrate de sodium) et l'autre nommé ATS dans anti-coagulant. Chaque tube contient un gel permettant de séparer les hématies par centrifugation. Le tube BCT est centrifugé une fois à 1500g pendant 5min. Après resuspension du contenu cellulaire déposé au-dessus du gel, est

obtenu le plasma (avec protéines coagulantes) débarrassé des globules rouges et ainsi « concentré » en plaquettes. Le tube ATS quant à lui est centrifugé deux fois selon les mêmes paramètres. La phase supérieure du tube ATS centrifugé correspond au sérum avec les protéines coagulantes (*thrombine*). Un mélange est ensuite effectué avec 80% de plasma, 10% de sérum avec les protéines coagulantes et 10% de gluconate de calcium pour « activer » le mélange ce qui permet en quelques minutes d'obtenir un gel de PRP.

C. Isolation des cellules

1. Isolation de la Fraction Stromale Vasculaire

Pour isoler la Fraction Stromale Vasculaire du tissu adipeux obtenu à partir de lipoaspiration, le lipoaspirat est tout d'abord purifié à l'aide du protocole de purification utilisé dans les techniques Microfill et Macrofill. A la suite de ces lavages, 35cc de tissu sont mélangés à 1,5% de collagénase (NB4 Serva) et à 15cc de Ringer Lactate pour digestion 1h à 37°C. Le tissu digéré est ensuite centrifugé pendant 4min à 900g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire correspondant à la fraction stromale vasculaire est repris dans le Ringer Lactate pour être rincé 3 fois (avec des centrifugations de 4min à 900g). Le culot rincé est repris une dernière fois dans du Ringer Lactate pour être tamisé sur filtre Steriflip 100µm (Millipore, France). Les cellules peuvent ensuite être recentrifuger pour être repris dans du plasma, du Ringer Lactate ou du sérum de culture DMEM (Gibco, Invitrogen) à la concentration voulue.

2. Isolation des cellules stromales adipeuses (CSA)

Les CSA sont isolées de la FSV par mise en culture sur plastique de cette dernière. Après 24h, les cellules non adhérentes sont éliminées par rinçages avec du PBS (Gibco, Invitrogen). Ces cellules adhérentes sont les CSA, population cellulaire hétérogène avec des capacités de multipotence et de clonogénicité. Les proportions des différentes cellules composant les CSA vont ensuite évoluer en fonction du nombre de passage. Les CSA sont ensuite cultivées dans du milieu de culture DMEM dans un incubateur à 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ et en atmosphère humide.

3. Isolation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSMO)

Le principe d'isolation des CSMO est le même que celui des CSA : isolation par adhérence au plastique en 24h (ou 48h pour les cellules de rats). Les CSMO et les CSA ont en effet des caractéristiques très proches. La moelle osseuse récupérée est tamisée sur filtre 70µm pour éliminer les débris osseux. Elle est ensuite mise en culture sur du plastique traité par la culture cellulaire. Lors des premiers jours suivant l'isolation des CSMO il peut y avoir une part d'hématies collées au tapis cellulaire. Ces cellules se décrocheront au fil des rinçages lors des changements de milieu. Les CSMO sont ensuite cultivées dans du milieu de culture α MEM (Gibco, Invitrogen) dans un incubateur à 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ et en atmosphère humide.

D. Culture cellulaire

1. Mise en culture du tissu adipeux

Le tissu adipeux total (contenant la fraction adipocytaire et la fraction stromale vasculaire) peut être mis en culture pour une courte période après obtention du lipoaspirat. Le tissu une fois purifié selon la technique utilisée est transféré par canule dans des plaques 24 puits traitées pour la culture cellulaire et mis en présence de milieu DMEM, 1% Penicilline Stréptomycine (P/S, Sigma Aldrich), 10% Sérum de Veau Fétal (SVF, PAN-Biotech GmbH). Pour 48h de culture, 1mL de graisse est mis au contact de 2mL de milieu de culture puis laissé à l'incubateur 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ en atmosphère humide.

2. Passage des cellules

Lorsque les cellules stromales sont en phase d'amplification, il est nécessaire d'empêcher les cellules d'atteindre la confluence pour éviter des phénomènes de différenciation spontanée (sans ajout d'un milieu de différenciation particulier). Ainsi quand les cellules occupent 80% du plastique de culture, elles sont décollées à l'aide de l'action de la trypsine dans une solution de trypsine 0,25%/EDTA (Invitrogen) pendant 3/4min dans l'incubateur. La solution de trypsine contenant les cellules est ensuite récupérée et mis au contact de milieu de culture (le SVF inactivant l'action de la trypsine qui peut diminuer la viabilité cellulaire si laissée trop longtemps en contact avec les cellules). L'ensemble est centrifugé pour récupérer le culot cellulaire afin de « réensemencer » les cellules sur plastique à 5.10³ cellules/cm².

3. Culture cellulaire sur biomatériaux

La culture des cellules (CSA, FSV ou CSMO) sur des biomatériaux (BCP ou éponges de collagène) est faite en plaque ultra-low attachement (Corning) pour favoriser l'adhésion des cellules au biomatériau et non à la plaque de culture. Le biomatériau est mis au fond du puits, puis les cellules préalablement reprise dans le milieu désiré sont mises au contact du biomatériau. Si l'on souhaite favoriser l'adhésion, les 2 premiers jours de culture du milieu est rajouté sans enlever le surnageant pour ne pas perdre de cellules qui n'auraient pas encore adhérees. Pour les BPC, il est possible de permettre une équilibrion ionique du biomatériau en le laissant 24h à l'avance en contact avec du milieu de culture sans cellules. Toutefois cette technique n'est pas utilisée lorsque l'on veut retranscrire des conditions cliniques intra-opératoires. Après les 2 premiers jours de culture, le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours. La culture s'effectue en incubateur à 37°C, 21% O₂, 5% de CO₂ en atmosphère humide.

4. Différenciation ostéogénique

La différenciation ostéogénique, que ce soit pour les cellules de la FSV, les CSA ou les CSMO s'effectue dans un milieu ostéogénique. Ce milieu est basé sur le milieu de prolifération (DMEM ou α MEM, 1% P/S, 10% SVF) auquel est ajouté :

- 10mM β -glycerophosphate (Calbiochem)
- 0,2mM sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich)
- 10⁻⁸M dexamethasone (Sigma-Aldrich)

Le milieu est ensuite renouvelé tous les 2-3 jours et la culture est effectuée en incubateur 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ en atmosphère humide.

La culture est généralement effectuée sur 14 ou 28 jours. Il est possible d'attester de la minéralisation de la matrice par une coloration du tapis cellulaire par rouge Alizarin. Le tapis cellulaire est rincé par du PBS, puis la solution de Rouge Alizarin 2% (Sigma Aldrich) est mis au contact du tapis cellulaire pendant 2-3min. Le puits est ensuite rincé à l'eau pour éliminer les dépôts aspécifiques de colorants. Une coloration rouge indiquera la présence de cristaux de minéralisation, synonyme de la capacité des cellules à minéraliser leur matrice, une des caractéristiques des cellules ostéogéniques.

5. Marquage des cellules par le CM-DIL

Afin de suivre les cellules implantées dans le cadre d'ingénierie tissulaire osseuse il est possible de marquer les membranes lipidiques de celles-ci par un marqueur fluorescent stable : le CM-DIL (CellTracker™, Invitrogen). Après explantation, les cellules seront visibles au microscope à fluorescence sur coupes histologiques. Pour le marquage, les cellules sont incubées avec 20µM de CM-DIL pendant 5min à 37°C. Le colorant est ensuite inactivé sur glace pendant 15min. L'analyse est effectuée sur les coupes en résine GMMA au microscope fluorescent avec le laser d'excitation 568nm.

6. Test de viabilité cellulaire par MTS

Il est possible de déterminer l'action cytotoxique d'un agent (*le* biomatériau) par un test MTS. Le test MTS a pour but de doser l'activité mitochondriale des cellules qui peut, sauf cas particulier, être rapportée à la viabilité des cellules au contact de l'agent à tester.

Le MTS est un test colorimétrique qui utilise le mélange du sel de tetrazolium, le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium et de méthosulfate de phenazine (PMS), qui vont être transformés en formazan par l'activité mitochondriale des cellules eucaryotes. La présence de formazan est ensuite mesurée par absorbance à 490nm avec un spectromètre.

Pour le test, le milieu des cellules est remplacé par un milieu frais contenant 0,40mg/mL de sel de tetrazolium et 9,6ng/mL de PMS. Le nouveau milieu est laissé de au contact des cellules pendant un temps variable de 5min à 4h selon le nombre de cellules. Le test est arrêté lorsque qu'une différence de coloration est visible à l'œil nu entre une condition sans cellules (ou avec un inducteur de la mort cellulaire) et une condition avec des cellules seules sans agent. La densité optique du milieu (transféré dans une plaque neuve sans cellules) est ensuite lue avec un spectromètre de plaque avec un filtre d'absorption 490nm (VICTOR3, PerkinElmer).

E. Biologie Moléculaire

1. Tests ELISA

Il est possible de quantifier la quantité de différentes cytokines/facteurs de croissance (IL6, MCP1, TNFα, VEGF, TGFB3, BMP2...) dans du surnageant de culture cellulaire à l'aide d'un

dosage ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Le principe des kits commerciaux utilisés est celui de l'ELISA dit « sandwich ». Dans un premier temps la plaque de dosage est coâtée avec un premier anticorps spécifique de la molécule à dosé. Après une étape de blocage pour éviter les fixations aspécifiques, l'échantillon (milieu de culture) est mis dans la plaque de dosage. La plaque est ensuite rincée pour ne conserver que les molécules qui se sont spécifiquement liées à l'anticorps. Puis un deuxième anticorps spécifique d'un autre site de la même molécule est ajouté. Cette étape double la spécificité du signal que l'on obtiendra. Ce deuxième anticorps est biotinylé ce qui permet ensuite la fixation d'une Avidine (qui se fixera à la biotine) elle-même couplée à une enzyme : HRP. L'HRP (Horseadish peroxydase) est une enzyme qui va transformer un substrat incolore en produit coloré. La coloration sera proportionnelle à la quantité de molécule présente dans le puits et permettra une quantification de celle-ci après lecture de la coloration avec un spectromètre.

Le protocole est le suivant :

1. Coating de la plaque avec l'anticorps de capture dilué dans le « coating buffer » à 4°C pendant la nuit
2. Lavages des puits avec le tampon de lavage (PBS, Tween 20 0,05%) à cinq reprises
3. Blocage des puits avec la solution « assay diluent » pendant 1h à température ambiante
4. Lavages de puits avec le tampon de lavage à cinq reprises
5. Les échantillons/la gamme standard, dilués dans l'« assay diluent » sont incubés pendant 2h à température ambiante
6. Lavages des puits avec le tampon de lavage à cinq reprises
7. Ajout de l'anticorps de détection, incubé 1h à température ambiante
8. Lavages des puits avec le tampon de lavage à cinq reprises
9. Ajout du complexe Avidine-HRP pendant 30min à température ambiante
10. Lavages des puits avec le tampon de lavage à sept reprises
11. Ajout du substrat de l'HRP pendant 15min à température ambiante
12. Ajout de la solution STOP (acide phosphorique)
13. Lecture de la plaque à 450nm avec le spectromètre

F. Les Biomatériaux utilisés

1. Les Granules de Phosphates de Calcium Biphases

Durant les études sur la régénération osseuse, le biomatériau ayant servi de base à nos différentes stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse est une céramique de phosphate de calcium biphasée (BCP). Ces BCP sont fournis par la société Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France) et commercialisé sous le nom de MBCP+®.

Ce sont des granules de granulométrie variant entre 0,5 et 1mm. Ils sont composé de 20% d'hydroxyapatite (HA) et de 80% de phosphate tricalcique beta (β -TCP).

Lors des implantations les granules sont répartis dans des puits de plaques de culture Ultra-Low Attachment puis l'équivalent de 60mg de granules ($0,109 \text{ cm}^3$) puis hydratés avec 100 μ L de solution physiologique (Ringer Lactate) contenant ou non les cellules et les facteurs de croissance.

2. Les éponges de Collagène

L'autre biomatériau utilisé pour les études de repousse osseuse est une éponge de collagène. Cette éponge est fournie dans le kit anciennement commercialisé en clinique vétérinaire par Pfizer (TruScient) utilisant la rhBMP2 pour la régénération osseuse chez le chien. C'est une éponge de collagène de type I d'origine bovine. Lors des études, un disque de 5mm de diamètre de ces éponges est découpé sous hotte en milieu stérile et transféré dans une plaque de culture Ultra-Low Attachment. L'éponge est ensuite hydratée par 100 μ L d'une solution physiologique (Ringer Lactate) contenant ou non les cellules et les facteurs de croissance.

G. Protocoles d'études animales

Chaque protocole d'étude sur des animaux à fait l'objet d'une demande d'avis de la part du comité d'éthique animale.

1. Injection de tissu adipeux humain en sous-cutané de souris SCID

Saisine 2012.249 ayant reçu l'avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire le 31 janvier 2013

Saisine soumise au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le 17 mars 2014

Les animaux utilisés pour cette étude sont des souris femelles âgées de 8 semaines et de souche CB17/SCID (Severe Combined ImmunoDeficient) (Charles River Laboratories).

Ces souris « SCID Beige » possèdent une mutation sur le gène *Prkdc* (protein kinase DNA activated catalytic polypeptide) qui affecte la réparation d'ADN et donc les phases de recombinaison des BCR et TCR entraînant ainsi une absence de lymphocytes matures (B et T). Cette mutation couplée au fond génétique « Beige » entraîne aussi l'absence de cellules Natural Killer NK. Ces souris possèdent donc un système immunitaire déficient à la fois au niveau de l'immunité acquise mais aussi au niveau de l'immunité innée ce qui permet de réduire au maximum le risque de rejet lors de l'injection de tissus d'origines xénogéniques (ici humains). Ces souris ont été choisies plutôt que les souris « nues » athymiques et plus classiquement utilisées car la peau des souris SCID et le tissu sous-cutané associé est plus proche du tissu sous-cutané humain que la peau des souris nues.

Les souris reçoivent une anesthésie gazeuse à l'isoflurane dans une cage d'induction (4% isoflurane, 2L/min d'air) puis l'anesthésie est maintenue sous masque (2% isoflurane ; 1L/min d'air).

La peau du dos est désinfectée à la povidone iodée (*ie* Bétadine) puis chaque souris a reçu une injection sous-cutanée rétrograde de 1cc de graisse humaine au niveau de chaque flanc. L'injection est réalisée à l'aide d'une canule d'injection émoussée de 2mm de diamètre connectée à une seringue de 1cc.

Quatre semaines après l'injection, les animaux sont euthanasiés par asphyxie au dioxyde de carbone et les greffons sous-cutanés sont récupérés pour analyses et fixés dans du formaldéhyde 4% pendant une durée minimum de 48h.

2. Implantation de procédés d'ingénierie tissulaire osseuse en sous-cutané de souris nude

Saisine 2012.142 ayant reçu l'avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire le 3 janvier 2013

Les animaux choisis sont des souris femelles de 8 semaines immunodéprimées (souris nude) (Janvier Labs). La mutation « nude » touche le gène *Foxn1* (forkhead box N1) conduisant un défaut de développement du thymus et ainsi à la quasi-absence de lymphocytes T matures et à un défaut partiel de développement des lymphocytes B. Les animaux sont anesthésiés comme précédemment par isoflurane (induction à 4% et maintien à 2%). Pour les conditions

d'ingénierie tissulaire (biomatériaux+cellules) les cellules sont laissées au contact des biomatériaux pendant 30min pour favoriser l'adhésion.

Une incision est effectuée au niveau de la peau du dos et une poche sous-cutanée est réalisée à l'aide des ciseaux. Les biomatériaux (avec ou sans cellules) sont implantés à l'aide d'une seringue de 1cc dont le bout a été coupé. La seringue est insérée dans la poche sous-cutanée et les biomatériaux sont déposés par pression sur le piston.

Chaque souris reçoit ainsi 4 implants répartis dans la zone dorsale. Les incisions sont ensuite recousus avec du fil de suture résorbable.

Après 8 semaines les animaux sont sacrifiés par euthanasie au CO₂ (asphyxie) et les implants sont récupérés pour analyses. Chaque implant est fixé dans le para-formaldéhyde (PFA) pendant 24h.

3. Implantation de procédés d'ingénierie tissulaire osseuse en calvaria de rat

Saisine 2012.250 ayant reçu l'avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire le 19 février 2013

Saisine soumise au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le 16 octobre 2014

Les animaux sont des rats femelles de 8 semaines, nude (Charles River) ou de souche Wistar (Janvier Labs).

Les animaux sont d'abord anesthésiés par isoflurane (4% induction, 2,5-3% maintien). La peau du crâne est désinfectée à la povidone iodée. Un anesthésique local (alphacaïne) est injecté en sous-cutané de la peau du crâne.

Une incision cutanée et périostée de 3cm est effectuée au bistouri sur la ligne médiane du crâne de la région nasale à la région occipitale.

Le périoste est ensuite décollé à la rugine sur toute la zone des défauts, puis 2 défauts bilatéraux de 5mm de diamètre sont créés à la fraise tréphine (Komet Medial) montée sur une pièce à main (TPS U2 Drill, Stryker) sous irrigation au sérum physiologique. Les deux défauts sont créés de part et d'autre du sinus sagittal en prenant soin de ne pas abimer la dure mère.

Une fois le volet osseux retiré, les berges du défaut sont nettoyées à la curette dentaire.

Les défauts sont ensuite comblés par les différentes conditions d'ingénierie tissulaire osseuse.

La voie d'abord est ensuite fermée à l'aide d'un lambeau de péricarde bovin pour assurer l'étanchéité et le maintien des biomatériaux. Une suture cutanée est ensuite réalisée à l'aide de fil de suture résorbable.

Les animaux sont identifiés et reçoivent une injection intra-musculaire d'analgésique, buprénorphine 0,3mg/mL à la dose de 10µg/kg (Buprekar, Axience).

Deux mois après implantation, les animaux sont sacrifiés par euthanasie au CO₂ et les calvaria sont récupérées pour analyses histologiques. Les échantillons sont fixés dans le PFA 4% pendant 7 jours.

a. Immunosuppression des rats Wistar

Pour permettre l'implantation de stratégies de régénération avec des cellules humaines, les rats de souche Wistar (immunocompétent) reçoivent une thérapie immunosuppressive à la cyclosporine A (Néroral, Novartis). L'agent immunosuppresseur est administré par voie orale à hauteur de 15mg/kg/j du moment de l'implantation à l'euthanasie. La cyclosporine A va inhiber la sécrétion de plusieurs cytokines par les lymphocytes T (notamment l'IL2) réduisant grandement le potentiel de rejet des animaux.

b. Injection de sulfate de Barium

Afin d'étudier la néovascularisation au niveau des défauts osseux lors selon les différentes stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse, certains animaux au moment de l'euthanasie reçoivent une injection intracardiaque d'un agent radio-opacifiant permettant d'observer ensuite l'arbre vasculaire avec un microscanner à haute résolution.

Les animaux sont anesthésiés avec l'isoflurane. La cavité abdominale est ouverte à l'aide de ciseaux et l'on procède en remontant à une thoracotomie. Une fois le cœur bien en vue, un cathéter est inséré au niveau de l'apex du ventricule gauche et maintenu ainsi par un point de colle. Le cathéter est relié à un tuyau de pompe péristaltique qui va permettre l'injection à vitesse constante du sulfate de barium gélatiné (50% Sulfate de Barium, 48,5% PBS, 1.5% Gélatine). Une fois l'injection lancée, le ventricule droit est incisé aux ciseaux et l'injection de l'agent de contraste se poursuit jusqu'à blanchiment des extrémités de l'animal.

c. Préparation de la rhBMP2

La BMP2 provient du kit TruScient (Pfizer), qui propose une régénération osseuse à usage vétérinaire, en utilisant de la rhBMP2 (recombinant human bone morphogenic protein 2) et une éponge de collagène. La BMP2 est présente sous forme de poudre de 0,66mg.

La première action consiste à reprendre la poudre dans 3,3mL d'EPPI (eau pour préparation injectable) pour obtenir une solution mère à 0,2mg/mL.

Par exemple pour une implantation en calvaria :

- 20mg de BCP correspondent à 0,036cm³
- Sont implantés 19,6mm³ de collagène (valeur surestimée car l'épaisseur de l'éponge ne fait pas 1mm)

Pour une concentration en BMP2 à 30µg/cm³, 3µg/cm³ ou 300ng/cm³ cela correspond respectivement 1µg, 100ng et 10ng par défaut de calvaria. Les mélanges BCP+BMP2 (avec éventuellement les cellules) sont préparés comme suit :

- 60mg de BCP + 100µL de solution

Les 100µL de solution doivent donc contenir 3µg, 300ng et 30ng de BMP2. Des solutions à 30µg/mL, 3µg/mL et 300ng/mL de BMP2 sont donc préparées à partir de la solution mère de BMP2.

Environ 30min avant l'implantation des défauts, les solutions (contenant ou non les cellules) de BMP2 servent à hydrater les biomatériaux.

H. Analyses histologiques et microscopiques

1. Microtomodensitométrie à rayons X (microscanner)

Le microcomputed tomography (µCT), encore appelé microtomodensitométrie à rayons X ou plus simplement microscanner permet d'observer les tissus calcifiés avant préparation histologique puisque ceux-ci sont radio-opaques. De plus le microscanner Skyscan 1272 (Skyscan, Bruker) utilisé pour la plupart des expérimentations permet la visualisation avec une résolution de l'ordre du µm, permettant ainsi de distinguer les BCP de l'os néoformé qui possèdent des radio-opacité légèrement différentes.

a. Acquisition

L'échantillon est d'abord fixé (dans le formol 4% ou le paraformaldéhyde 4%) avant acquisition. L'échantillon est ensuite placé dans un tube en plastique et maintenu avec de la mousse radio-transparente pour éviter les mouvements lors de l'acquisition puisque l'échantillon va tourner sur lui-même entre la source de rayonnement et la caméra.

L'acquisition est réalisée à l'aide du logiciel « skyscan 1272 ». Pour une calvaria les paramètres seront les suivants :

- filtre Alu 0,25mm
- 60 kV et 166 μ A
- Taille du pixel 5 μ m
- Temps d'exposition : 2600ms
- Pas de rotation : 0,600 degrés

b. Analyses

Une fois les images acquises, elles sont sous forme de radio en fichiers TIFF. La reconstruction se fait à l'aide du logiciel NRecon (Skyscan, Bruker) pour obtenir des images en fichiers BMP. Les images sont ensuite analysables en 3 dimensions avec le logiciel CTvox (Skyscan, Bruker). L'analyse et les calculs (Region of Interest, calculs de repousse osseuse) se fait avec le logiciel d'analyse CTan (Skyscan, Bruker) à partir des images reconstruites (BMP ou JPEG).

2. Inclusion histologique

L'inclusion histologique permet de remplacer l'eau des tissus par la matière d'inclusion puis d'enrober l'échantillon dans cette même substance pour permettre d'effectuer des coupes fines (généralement 5 μ m) des échantillons pour colorations histologiques et observation du tissu au microscope. Toute inclusion se fait après fixation des tissus par formol ou paraformaldéhyde.

a. Inclusion en paraffine

La paraffine est utilisée pour inclure, après fixation et déshydratation, des tissus mous tels que:

- des organes mous ou des embryons
- de l'os décalcifié/cartilage, disque intervertébral

L'inclusion en paraffine permet le durcissement des tissus afin d'éviter leur détérioration lors de la coupe. La confection de coupes d'épaisseur comprise entre 3 et 5 μ m est nécessaire pour observer un tissu en microscopie photonique.

La première étape consiste à déshydrater les échantillons par des bains successifs d'alcools de degrés croissants (70°, 80°, 95° et 100°).

La deuxième étape consiste à remplacer l'alcool par un solvant miscible dans la paraffine (ici le méthylcyclohexane).

Enfin la dernière étape consiste en 2 bains de paraffine. Ainsi à la fin de l'inclusion toute l'eau contenue dans le tissu est remplacée par de la paraffine. Tous ces bains sont réalisés dans un automate d'inclusion qui possède un carrousel permettant l'inclusion selon différents programmes de temps préalablement programmés. (Automate de déshydratation STP 120, ThermoScientific)

Puis le tissu ainsi inclus est enrobé de paraffine dans une station d'enrobage (Denton Vacuum Desk III, Denton Vacuum LLC) pour faciliter la coupe (de sorte qu'un bloc entier de taille standard et de résistance égale soit coupé).

Les coupes de 5 μ m sont réalisées au microtome (Microtome Reichert Jung 2050 SuperCut, Leica), et déposé sur lames (Lames polysine™, VWR).

b. Décalcification

Le procédé de décalcification est utilisé pour permettre l'inclusion de tissus « durs » comme l'os ou les biomatériaux phosphocalciques dans de la paraffine normalement destinée aux tissus « mous ». Cette inclusion peut être choisie car de nombreux protocoles ont été mis au point sur paraffine et pas sur résine. La décalcification a pour principe de dissoudre les sels de calcium responsables de la calcification.

La décalcification est elle aussi effectuée sur tissus fixés à l'aide d'acides inorganiques ou d'agents chélatants comme l'EDTA (chélateur des cations bivalents comme le calcium).

Pour nos échantillons contenant des BCP, la décalcification est accélérée grâce à un micro-onde KOS (Automate multifonctionnel Micro-onde KOS, Milestone). Le micro-onde KOS envoie des ondes électromagnétiques qui augmentent la diffusion des fluides dans l'échantillon et permettent une élévation contrôlée et stable de la température et une homogénéisation par agitation des solutions décalcifiantes. Il augmente la vitesse de décalcification quelle que soit la nature de la solution décalcifiante.

La solution de décalcification utilisée est de l'EDTA à 4,13% dilué dans du PBS et le procédé est effectué au micro-onde à 46°C pendant 48h.

Les échantillons sont ensuite rincés abondamment dans du PBS pour enlever toute trace d'EDTA ou de sels de calcium.

c. Inclusion en résine

La résine possède une dureté proche de celle des tissus osseux et permet ainsi de traiter les tissus inclus et enrobés en résine sans les déchirer au moment de la coupe. Il existe plusieurs types de résines. Celles le plus employés au laboratoire sont à base de méthacrylate, la résine GMMA (Sigma Aldrich) et la résine Technovit (Technovit® 9100, Kulzer), cette dernière permettant ensuite d'effectuer des marquages immunologiques et des hybridations *in situ*. Enfin l'inclusion en résine permet ensuite l'analyse en microscopie électronique à balayage et donc la quantification en 2 dimensions de la surface de BCP et de tissu minéralisé.

➤ Inclusion en résine GMMA

Le glycol méthyl méthacrylate (GMMA) est une résine acrylique (le méthyl méthacrylate) contenant un plastifiant le polyéthylène glycol 400. L'inclusion s'effectue après fixation des échantillons.

La première étape correspond à la déshydratation par des bains croissants d'alcools 70°, 80°, 95° et 100° (pendant 7j pour les échantillons de calvaria et 3j pour les échantillons de BCP produits *in vitro* ou implantés en sous-cutané). Puis pendant une dizaine d'heures l'alcool est remplacé par de l'acétone.

Deux bains de 5j dans la solution de GMMA permettent la pré-imprégnation du tissu par la résine.

Puis enfin un nouveau bain de GMMA est réalisé dans lequel une solution initiatrice de la polymérisation de la résine est ajoutée. Cette solution est le N, N diméthylaniline et la polymérisation de la résine se fait sous vide pendant environ 1 semaine à 4°C.

➤ Inclusion en résine Technovit

La résine Technovit 9100 New est une résine à base de méthyl méthacrylate qui a été spécialement développée par Heraeus Kulzer GmbH pour inclure des tissus minéralisés.

La polymérisation des monomères vinyliques de MMA est déclenchée par la présence de radicaux libres fournis par un catalyseur : le peroxyde de benzoyle et un initiateur de polymérisation : le N,N-3-5, tétraméthylaniline.

Des réactifs supplémentaires comme le MMA en poudre et un régulateur permettent un contrôle de la polymérisation à des températures de -8°C / -20°C ce qui garantit une dispersion de la température générée pendant la polymérisation.

La polymérisation est inhibée par l'oxygène de l'air ; l'inclusion se fait sous vide.

La première étape correspond à la déshydratation par des bains croissants d'alcools 70° , 80° , 95° et 100° (pendant 7j pour les échantillons de calvaria et 3j pour les échantillons de BCP produits *in vitro* ou implantés en sous-cutané). Puis pendant une dizaine d'heures, l'alcool est remplacé par du xylène.

Les bains suivants durent 3 à 5 jours selon la taille de l'échantillon et sont réalisés à 4°C :

- bain 1 50% Technovit / 50% xylène
- bain 2 Technovit / 0,5% de peroxyde dibenzoyle
- bain 3 Technovit déstabilisé par passage sur billes d'oxyde d'aluminium / 0,5% de peroxyde dibenzoyle
- bain 4 Technovit déstabilisé par passage sur billes d'oxyde d'aluminium / 0,5% de peroxyde dibenzoyle et 8% de MMA en poudre

Puis la polymérisation est réalisée à -20°C pendant une semaine environ dans un mélange contenant l'initiateur et un régulateur de cette polymérisation.

3. Microscopie électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (scanning electron microscopy SEM en anglais) est une technique basée sur les interactions électrons-matière. Elle a pour principe de placer un échantillon dans une chambre vide et de le soumettre à un faisceau d'électron. Selon sa composition, l'échantillon va réémettre certaines particules (électrons secondaires ou électrons rétrodiffusés) qui seront captées par des caméras spécifiques de celles-ci. L'intensité du courant électrique produit par ces électrons émis permet d'obtenir une image caractérisant l'échantillon analysé.

a. *Préparation des échantillons*

L'analyse s'est faite ici à partir d'échantillons inclus en résine (GMMA ou Technovit). Pour permettre l'analyse le bloc de résine est coupé en deux au niveau de la zone à analyser à l'aide d'une scie diamantée (Leitz, SP1600, Leica). Puis la surface ainsi découverte est polie sur une polisseuse (Polisseuse Metaserv 2000, Buehler) à l'aide de disque de granulométrie croissante. Enfin pour la surface doit être conductrice, ainsi après polissage les échantillons sont métallisés à l'aide d'un métaliseur or/palladium (Histostar, ThermoScientific) ou d'un métaliseur carbone (JEE 4B, Jeol) qui dépose une fine couche de métal à la surface de l'échantillon.

Enfin au moment de l'analyse, l'échantillon est placé sur une platine métallique et un pont conducteur est créé entre la surface métallisée et la platine avec une colle d'argent. La platine est insérée dans la chambre du microscope (LEO1450, Carl Zeiss).

b. Analyse des échantillons

A partir des images ainsi acquises, les niveaux de gris sont seuillés pour permettre le calcul de la surface osseuse et de la surface de BCP à l'aide du logiciel Leica QWin (Leica).

4. Coloration histologiques

Les colorations histologiques permettent la visualisation des différents tissus composant un échantillon et peuvent le cas échéant aider à un scoring histologique pour quantifier les différences entre 2 échantillons.

Les échantillons en paraffine sont coupés en coupes fines avec un microtome (Microtome Reichert Jung 2050 SuperCut, Leica) puis déposés sur lames histologiques (Lame Polysine™, VWR).

Les échantillons en résine sont coupés en coupes fines avec un polycut (Microtome SM2500, Leica) puis déposés sur des lames Polysine™ qui ont été trempées dans de la colle à bois (Colle à Bois, Sader) pour permettre aux échantillons de coller sur la lame.

La coloration se déroule en 3 étapes :

- L'étape 1 correspond au déparaffinage (pour paraffine) ou la déplastification (pour résine) des échantillons sur lame

Pour le déparaffinage : 2 bains de xylène de 5min

Pour la déplastification : 1 bain de 1h de xylène, 1 bain de 1h de MEA (2 Méthoxy-éthyl-Acétate) et 1 bain de 10min d'acétone

Puis les échantillons sont réhydratés (Alcool 100° 2x2min, Alcool 80° 2min et Alcool 70° 2min).

- L'étape 2 correspond à la coloration ou les lames sont plongées dans les bains des différents colorants.

- La dernière étape correspond au montage. Les lames colorées sont réhydratées (Alcool 70° 2min, Alcool 80° 2min et Alcool 100° 2x2min) puis 3 bains successifs de méthylcyclohexane (3x2min) ont lieu avant montage entre lame et lamelle

Une goutte de colle de montage (Eukitt) diluée dans le xylène est posée sur la lamelle, elle-même déposée sur l'échantillon.

La lame ainsi collée est laissée sécher sous Sorbonne avant analyse.

a. Colorations non spécifiques

Les colorations non spécifiques utilisées dans nos études sont :

- la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran), coloration de référence en histologie. Elle consiste en l'action successive d'un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline de Harris et d'un colorant cytoplasmique acide, l'éosine-érythrosine. Le safran permet de colorer le tissu conjonctif.

Elle se lit comme suit :

TISSU OU MOLECULE CIBLES	VISUALISATION
Noyaux	Bleus – noirs
Collagène	Jaune - orangé
Cytoplasmes – Fibres élastiques	Rose
Fibres musculaires et hématies	Rouge vif

- la coloration HPS (Hématoxyline, Phloxine, Safran) qui colore les cytoplasmes en rouge avec la Phloxine, qui est utilisée pour la coloration du tissu adipeux et qui se lit comme l'HES.

b. Colorations du tissu osseux

Certaines colorations dont l'usage est plus spécifique des tissus osseux ont été utilisées lors des études sur l'ingénierie tissulaire osseuse :

- la coloration de Goldner qui est une bonne technique de coloration pour voir sur une coupe les noyaux, l'os minéralisé, les fibres musculaires, les fibres élastiques, le collagène, le mucus et le cytoplasme.

Elle est très utilisée pour faire de l'histologie sur tissu osseux car il est ainsi possible de distinguer la formation d'ostéoïde, étape qui précède la formation de l'os. Elle associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Weigert, une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides (Fuchsine - Ponceau – azophloxine et orange G) et une coloration différentielle du tissu conjonctif au Vert Lumière.

Elle se lit comme suit :

TISSU OU MOLECULE CIBLES	VISUALISATION
Noyaux	Bleus - noirs
Os minéralisé	Vert
Collagène et mucus	Vert clair
Cytoplasmes	Rose à rouge.
Ostéoïde -	Rouge vif
Lames élastiques – muscles	Rose
Erythrocyte - Hématies et kératine	Rouge Orangé

- la coloration de Movat. Le pentachrome de Movat est une bonne technique de coloration pour voir sur une coupe les noyaux, les fibres musculaires, les fibres élastiques, le collagène/les fibres réticulées, les composants non cellulaires de la matrice extracellulaire, les fibrines.

Comme le Goldner elle permet de détecter les bordures ostéoïdes mais en plus de distinguer l'os néoformé « jeune » de l'os déjà remodelé « vieux ».

Elle associe une coloration des glycoaminoglycane (GAG) avec le bleu alcian, les noyau et fibres élastiques avec l'hématoxyline de Weigert, le muscle avec le brillant crocéine/fushine acide, les fibres de collagène avec l'acide phosphotungstique et le safran.

Elle se lit comme suit :

TISSU OU MOLECULE CIBLES	VISUALISATION
Noyaux	Bleus - noirs
Os minéralisé jeune	Vert – jaune (tire sur le vert)
Os minéralisé vieux	Jaune vert (plutôt jaune)
Collagène – fibres réticulées	Jaune
Cartilage	Bleu vert
Muscle – Ostéoïde - Fibrine	Rouge
Composants non cellulaires de la matrice extracellulaire (les mucosubstances acides, les céramiques...)	Bleu ciel

5. Immuno-histochimie

Pour compléter les colorations des tissus avec les colorations histologiques précédemment mentionnées, il est possible de détecter la présence et de localiser une molécule spécifique (souvent une protéine) au sein d'un tissu. C'est le but des Immunohistochimie (IHC) qui utilisent des anticorps spécifiques de la molécule en question. Ces anticorps seront directement couplés à un système de détection, ou alors il sera fait usage d'un deuxième anticorps dirigé contre le premier pour permettre la détection colorimétrique directe ou par fluorescence.

a. *Ostéocalcine*

Dans notre étude l'IHC utilisée était dirigée contre l'ostéocalcine (OC) / Bone Gla protéine (BGLAP) protéine de la matrice extra-cellulaire non collagénique sécrété par les cellules de la lignée ostéogénique.

L'IHC anti-OC s'effectue sur coupe histologiques et se déroule comme suit :

6. Hybridation In Situ

L'hybridation In Situ (HIS) a pour but de détecter non pas une protéine mais des chaînes d'acides nucléiques (ARN ou ADN) dans un tissu biologique. Cette détection se fait à l'aide d'une sonde complémentaire à la séquence à détecter. La sonde ayant incorporé un marqueur qui sera détectable à l'aide d'un anticorps comme lors des IHC.

a. Séquence Alu

Afin de vérifier la présence de cellules humaines dans nos échantillons issus de modèles animaux de régénération osseuse nous avons cherché à mettre en évidence par HIS les séquences Alu présentes dans ces cellules. En effet les séquences consensus Alu sont des séquences non codantes répétées à divers endroits du génome des primates. Elles sont donc présentes dans l'ADN des cellules humaines mais pas chez les cellules de rongeurs (rat – souris) hôtes de nos expérimentations animales.

L'HIS détectant les séquences Alu s'effectue sur coupes histologiques et se déroule comme suit :

ANNEXE II : Dossier de saisine

**Analyse par imagerie et histologie de l'impact des techniques de
prélèvement de tissu adipeux humain sur son maintien après
implantation in vivo en sous cutanée de souris SCID**

DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ..., aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

Analyse par imagerie et histologie de l'impact des techniques de prélèvement de tissu adipeux humain sur son maintien après implantation *in vivo* en sous cutanée de souris SCID.

1.2. Durée du projet :

5 ans

1.3. Date prévue de début du projet :

01.04.2014

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

Le tissu adipeux autologue (plus communément appelé graisse) est couramment utilisé comme tissu de comblement, pour des indications esthétiques ainsi qu'en traitement de malformations ou séquelles pathologiques (mastectomie par exemple) [1-3]. Une limite majeure de cette utilisation est la résorption imprévisible du tissu injecté (entre 25 et 80%) et qui est liée à la mort des cellules du greffon. Ces

dernières décennies, de nombreuses techniques de lipoaspiration se sont développées et ce sans harmonisation des protocoles [4]. Ces techniques diffèrent selon les principes de prélèvement et de purification du tissu adipeux. La manipulation du tissu prélevé influence la survie du greffon et le maintien du volume à long terme après réinjection [5, 6]. Le but de cette étude est donc de comparer 5 techniques de prélèvements couramment utilisées à l'heure actuelle. Après l'étude de l'impact des différentes techniques de prélèvement *in vitro* sur le tissu récupéré, nous souhaitons comparer le devenir *in vivo* du tissu adipeux issu des 5 techniques de prélèvement sur un même patient. Pour cela, le produit de lipoaspiration humaine sera injecté en sous-cutané chez un modèle de souris immunodéprimée. Ces souris possèdent un faible système immunitaire ce qui est indispensable pour limiter le rejet du greffon d'origine humaine. Deux modèles de souris immunodéprimées sont classiquement utilisés en expérimentation animale : les souris nude et les souris SCID. Les souris nude possèdent une peau sans poil et lâche, ce qui peut gêner l'observation du greffon de tissu adipeux et du phénomène de résorption que nous souhaitons étudier. Les souris SCID en revanche possèdent une peau d'aspect normal et sont moins immunoréactives que la souris nude c'est à dire qu'il y a moins de risque de réaction immunitaire à l'encontre du tissu humain que l'on injecte. Ces souris SCID ont donc été sélectionnées pour notre étude.

Dans cette étude nous voulons injecter sous la peau des souris SCID du tissu humain directement récupéré à la clinique pour retranscrire ce qui se passe chez l'homme lors d'une injection de tissu adipeux. Ce tissu aura été prélevé chez un/une patient(e) humain(e) par 5 techniques de lipoaspiration. Puis, deux fois 1 millilitre de tissu adipeux humain seront injectés dans le dos des souris sous anesthésie générale. Une technique d'imagerie de pointe sera ensuite utilisée pour observer le tissu injecté après euthanasie : le Scanner (micro-computed tomography). Cette technique, couplée à de l'histologie va nous permettre d'observer le devenir de la graisse après injection à un temps court de 1 semaine et un temps long de 3/4 semaines d'implantation. Ces analyses auront pour but de quantifier le taux de résorption du greffon en fonction des 5 techniques de prélèvement et la présence ou non d'huile indésirable au sein de celui-ci.

Cette étude nous permettra de mettre en évidence la technique de lipoaspiration qui favorise le maintien du tissu adipeux après réinjection. Ceci a pour but d'optimiser les protocoles mis en place par les chirurgiens plasticiens et ainsi limiter le nombre d'interventions chirurgicales.

Le nombre total de souris prévues pour cette étude est de 180. Les techniques comparées ont été préalablement sélectionnées parmi les plus utilisées en clinique et ont été comparées *in vitro*. Le modèle d'étude animal a été validé et montré peu-invasif par les études précédentes. Enfin le nombre d'animaux a été choisi en fonction des variabilités observées lors des études précédentes et de la nécessité d'avoir une vision à court et à moyen terme sur le greffon.

Références essentielles :

1. Pu, L.L., Towards more rationalized approach to autologous fat grafting. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS, 2012. 65(4): p. 413-9.
2. Rosing, J.H., et al., Autologous fat grafting for primary breast augmentation: a systematic review. Aesthetic plastic surgery, 2011. 35(5): p. 882-90.

3. Missana, G., Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: technique, indications, results. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2009. 8(2): p. 4.
4. Tabit, C.J., et al., Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes. Aesthetic plastic surgery, 2012. 36(3): p. 704-13.
5. Conde-Green, A., N.F. de Amorim, and I. Pitanguy, Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS, 2010. 63(8): p. 1375-81.
6. Oedayrajsingh-Varma, M.J., et al., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. Cytotherapy, 2006. 8(2): p. 166-77.

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom : UTE IRS – UN (Nantes)
- Numéro d'agrément : B44-278
- Date de délivrance de l'agrément : 2010
- Nom et prénom du responsable : Mme le Doyen JOLLIET
- Adresse électronique du responsable : pascale.jolliet@univ-nantes.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : LIABEU Marie
- Adresse électronique de ce délégataire : marie.liabeuf@univ-nantes.fr

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

CEEA Pays de la Loire N°6

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Weiss Pierre
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : LIOAD/ U791, 1 place Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1
- Adresse électronique : pierre.weiss@univ-nantes.fr
- Téléphone : 0687741055

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

- Nom et prénom : Marie LIABEUF
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UTE IRS UN 8 quai Moncoussu 44000 NANTES
- Adresse électronique : marie.liabeuf@univ-nantes.fr
- Téléphone : 02.28.08.03.96

...

3.2. Le personnel

- Compétences des personnes participant au projet :

- la conception des procédures expérimentales et des projets ● oui ○ non
- l'application de procédures expérimentales aux animaux ● oui ○ non
- les soins aux animaux ● oui ○ non
- la mise à mort des animaux ● oui ○ non

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ? ○
- requis par la loi ? ○
- justifié du point de vue scientifique ? ●

○ **Informations sur cette justification :**

Des études menées par la société STEM CIS à la Réunion ont permis de mettre au point le protocole d'injection en sous-cutané de souris que nous allons utiliser. Ces études ont permis de montrer l'influence de la manipulation de la graisse sur la résorption de celle-ci. Nous cherchons maintenant à déterminer la meilleure technique de prélèvement pour l'implantation du tissu adipeux, parmi celles proposées actuellement aux chirurgiens plasticiens. Cette étude est financée par la société STEM CIS et l'ANRT dans le cadre d'un partenariat CIFRE.

3.3.2. Description du projet :

Le but est de pouvoir observer la résorption d'un greffon de graisse dans le temps en fonction du traitement de la graisse. Pour cela le modèle est l'injection de graisse humaine en sous-cutanée de souris SCID. L'observation du greffon est ensuite effectuée par imagerie microCT (pour calculer le volume du greffon).
Prélèvement de tissu adipeux humain :

Le tissu adipeux humain est prélevé à la clinique Bretéché sur les patientes du Dr Lefourn et traité selon différents protocoles avant injection à Nantes : - décantation, filtration, centrifugation rapide, centrifugation lente (2 protocoles différents)

Manipulation des souris à leur arrivée (Nantes) :

Les études (6 études au total) porteront sur 12 à 30 souris injectées avec de la graisse humaine : 2x1mL de graisse injecté en sous-cutanée dans le dos de chaque souris selon le nombre de techniques utilisées par le chirurgien (6 souris par technique et au moins 2 techniques comparées à 2 temps différents pour la même patiente).

Les souris seront stabulées dans l'animalerie de l'IRS-UN à Nantes

Après environ une semaine d'acclimatation, les souris subiront une injection sous-cutanée de graisse d'origine humaine fraîchement prélevée, selon le protocole suivant :

Injection de la graisse (après 1 semaine d'acclimatation) J0 :

Toute l'opération sera effectuée dans les conditions les plus propres possible, hotte à flux laminaire avec des gants stériles.

Les instruments et matériels en contact avec la souris seront stériles et désinfectés entre chaque animal.

La souris est anesthésiée par anesthésie gazeuse : induction en chambre d'isoflurane (4-5%) et maintien au masque à isoflurane (1-2%).

Phase 1 : désinfection de la zone d'injection

Phase 2 : incision au niveau de la peau du dos à l'aide d'une aiguille 18G ou 20G. (raser les poils n'est pas nécessaire)

Phase 3 : injection rétrograde du tissu adipeux contenu dans une seringue stérile 2mL et couplée à une canule d'injection de diamètre 1,25 et de longueur 70mm.

ATTENTION : lors des injections, il est nécessaire de finir l'injection rétrograde à quelques millimètres de l'incision pour éviter que la graisse ne ressorte par cette incision. Après l'injection, les souris de chaque groupe seront si possible marquées par un marquage international au niveau de l'oreille (à l'aide d'un emporte-pièce désinfecté).

Phase 4 : Une fois l'injection des souris terminée, les souris sont mises sur tapis chauffants pour se réveiller sous surveillance.

Les souris seront ensuite stabulées dans l'animalerie pendant 1 à 4 semaines.

Stabulation (1 à 4 semaines) :

Les souris SCID devront être stabulées pendant 1 à 4 semaines selon les groupes. Nous souhaitons observer l'aspect du greffon à court terme (1 semaine) pour observer la présence ou non d'huile due à la technique de prélèvement et à plus long terme (3/4 semaines) pour observer la résorption du greffon.

L'appareil de microscanner qui va nous permettre d'analyser la taille du greffon de manière extrêmement précise est disponible à l'unité INSERM U791 de Nantes.

Cette appareil est le seul disponible en France avec cette résolution (2µm) et n'existe pas pour animal vigile ce qui implique de devoir sacrifier un nombre restreint d'animaux pour les temps courts (1 semaine) et pour les temps longs (3/4 semaines).

Euthanasie :

A 1 et 3/4 semaines après l'injection, les animaux seront euthanasiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique.

Les greffons seront ensuite récupérés (explantés) et ramenés au laboratoire U791 pour analyses microscanner et histologiques.

Résumé de l'étude: Injection – Stabulation (1 à 4 semaines selon le groupe d'étude) – Euthanasie pour analyse

Ce protocole a déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation validée par le comité d'éthique des Pays de la Loire : CEEA 2012.249 où les procédure ont eu lieu à l'école nationale vétérinaire de Nantes.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

Injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (0.2mL par animal)

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

N/A

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Des études antérieures ont permis de démontrer que le nombre de 6 injections par groupe permet d'obtenir une puissance statistique suffisante pour observer les différences entre les groupes. Ces études ont permis d'observer que les animaux ne montrent pas de signes de souffrance suite à l'injection de graisse. Les études en cours tendent à montrer une forte variabilité inter-individuelle du tissu adipeux. Nous souhaitons donc dans un premier temps réaliser l'étude sur 6 donneurs de graisse afin de vérifier qu'un test statistique non-paramétrique de Kruskal & Wallis sur des petits échantillons permet de faire ressortir une différence significative de résorption et/ou formation d'huile au sein des greffons de graisse traités avec les protocoles utilisés en cliniques.

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Afin de démontrer efficacement les différences existantes entre les protocoles d'injection de graisse utilisés actuellement chez l'homme, il est nécessaire de les comparés à partir de la graisse d'un même donneur, ce qui pour des raisons de coût, de sécurité et d'éthique n'est pas réalisable en clinique. Il est donc nécessaire d'effectuer cette comparaison sur un modèle animal adapté qui est l'injection sous-cutanée de graisse sur un modèle murin.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Souris (<i>Mus musculus</i>) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Rats (<i>Rattus norvegicus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Cobayes (<i>Cavia porcellus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Hamsters (syriens) (<i>Mesocricetus auratus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Hamsters (chinois) (<i>Cricetulus griseus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres rongeurs (<i>Rodentia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Chats (<i>Felis catus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Chiens (<i>Canis familiaris</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Furets (<i>Mustela putorius furo</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres carnivores (<i>carnivora</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Caprins (<i>Capra aegagrus hircus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Ovins (<i>Ovis aries</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Bovins (<i>Bos primigenius</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Prosimiens (<i>prosimia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Ouistitis et tamarins (<i>par exemple, Callithrix jacchus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singe cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singe rhésus (<i>Macaca mulatta</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Vervets <i>chlorocebus</i> spp. (généralement soit <i>pygerythrus</i> , soit <i>sabaeus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Babouins (<i>Papio</i> spp.) | <input type="checkbox"/> |
| Saïmiris (<i>par exemple, Saimiri sciureus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres espèces de primates non humains (autres espèces de <i>Ceboidea</i> et <i>Cercopithecoidea</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singes anthropoïdes (<i>Hominoidea</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres mammifères (autres <i>Mammalia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Poules domestiques (<i>Gallus gallus domesticus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres oiseaux (autres <i>Aves</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Reptiles (<i>Reptilia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Grenouilles Rana (<i>Rana temporaria</i> et <i>Rana pipiens</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Grenouilles Xenopus (<i>Xenopus laevis</i> et <i>Xenopus tropicalis</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres amphibiens (autres <i>Amphibia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres poissons (autres <i>Pisces</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Céphalopodes (<i>Cephalopoda</i>) | <input type="checkbox"/> |

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

Le modèle murin d'injection sous-cutanée de graisse est un bon modèle pour retranscrire le comportement *in vivo* de petits volumes de tissu. De plus le choix de l'espèce permet d'avoir à disposition de nombreux outils d'analyses adaptés (imagerie petits échantillons, anticorps adaptés pour l'immuno-histochimie) afin d'analyser les greffons. Enfin la nécessité de travailler sur de la graisse humaine induit le recours à un modèle immuno-déprimé qui empêche un rejet du greffon.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)

Animaux non domestiques non tenus en captivité

Animaux génétiquement altérés

Animaux non domestiques non tenus en captivité

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :

- **Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :**

- **Animaux génétiquement altérés**
 - **Animaux génétiquement modifiés** oui non
Si oui :
 - **Création d'une lignée** oui non
 - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation** oui non
 - **Phénotype non dommageable** oui non
 - **Phénotype dommageable** oui non
 - **Souche mutante autre** oui non
Si oui :
 - **Création d'un mutant** oui non
 - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation** oui non
 - **Phénotype non dommageable** oui non
 - **Phénotype dommageable** oui non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

- **Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?**

oui non

- **Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :**

Etablissement :

- **Nom :**

- **Adresse postale :**

- **Animaux fournis :**

- **Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :**

- Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** oui non

- Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** oui non

- Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

- **Nom :**

- **Adresse postale :**

- **Animaux fournis :**

- Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

oui

non

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

180

○ **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

Comme précisé dans le paragraphe 3.3.5, nous souhaitons comparer 5 techniques de traitement de la graisse et il est nécessaire d'avoir 6 échantillons par technique. Pour s'affranchir des différences interindividuelles des donneurs de graisse nous souhaitons répéter l'étude avec 6 donneurs différents.

- 5 techniques menant à 6 injections soit 30 injections dans un total de 15 souris (2 injections par souris)
- Cette opération est répétée pour 2 temps d'euthanasie (court et long) soit 30 souris par patiente prélevée
- Nous souhaiterions faire cette étude sur 6 patientes soit 6 études de 30 souris = 180.

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

Les animaux seront utilisés seront âgés de 8 semaines afin d'avoir une taille et un poids suffisant pour recevoir deux greffons de 1mL de graisse.

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Les animaux utilisés sont des femelles. Ce choix permet d'éviter les rivalités de dominance que l'on observe chez les mâles et qui peuvent pousser les animaux à se battre entre eux.

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours.

La grille comportementale ci-dessous sera complétée pour chaque animal :

Signes cliniques notables	Signes cliniques sévères
Le point limite est atteint en présence de trois signes simultanés	Le point limite est atteint en présence d'un seul signe
Plaie/ Traumatisme	
Lésion sans effraction cutanée	Lésion sévère (automutilation, plaie suintante, masse ulcérée...) Traumatisme, saignement incontrôlable
Comportement/ Mouvement	
Agitation/ Agressivité	Akinésie
Hypomotilité/ Hyporéactivité	Décubitus

Incoordination modérée	Difficulté/ Impossibilité de mobilisation
Stéréotypies	Incoordination marquée
	Tremblements généralisés
	Convulsions
Aspect général	
Poil piqué	Persistance du pli cutané
Coloration anormale de la peau	Coloration jaune ou bleue des muqueuses
Flacidité musculaire généralisée	Voussure du dos/ Dos cambré
Gonflement abdominal	
Zone ano génitale souillé	
Excrétion	
Fèces liquide	Absence de fèces
Fèces mucoïdes	Urines rouges
Evolution pondérale	
Perte de poids inférieure à 15%	Perte de poids supérieure à 15%
Consommation de nourriture	
Diminution/ Absence de prise de nourriture	Absence de prise de nourriture > à 2 jours
Si le point critique est atteint, l'animal sera sacrifié pour des raisons éthiques et utilisé pour des analyses histologiques.	

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :

- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.



D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.



E- La recherche en vue de la conservation des espèces.



F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.



G - Les enquêtes médico-légales.



4.2 Nombre de procédures expérimentales :

1

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

Injection sous-cutanée de tissu adipeux humain

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure permet de retranscrire le transfert de graisse humaine utilisé en clinique chez l'homme pour des indications esthétiques et de chirurgie reconstructrice.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Comme indiqué au paragraphe 3.4.10 l'étude portera sur 30 animaux par donneur de tissu adipeux et un total de 6 patients sera utilisé.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Le prélèvement du greffon de graisse sera effectué après euthanasie des animaux à la fin du protocole.

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Un antalgique morphinomimétique sera administré en injections sous cutané, en post-opératoire immédiat. De plus comme indiqué au paragraphe traitant du point critique (3.4.13), en fonction de l'évaluation de la douleur sur les animaux nous renouvelerons l'injection si nécessaire les jours suivants : (Buprénorphine (Buprecare ®0,3mg/ml) : 0,05mg/kg en sous cutané).

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?



précisez les animaux concernés :

Toutes les souris seront mises à mort afin de récupérer les greffons de graisse pour analyse au microscanner et histologique.

- animal gardé en vie ?



précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?



précisez les animaux concernés :

4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :



4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

- légère
- modérée
- sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ? **Ooui Onon**

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ? **Ooui Onon**

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

ANNEXE III : Dossier de saisine

**Evaluation du potentiel ostéogénique d'association de biomatériaux
avec des cellules souches mésenchymateuses en sous cutanée chez la
souris**

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Cadre réserve au Comité

A transmettre par e-mail en .rtf ou en .doc au secrétariat permanent du Comité (ceea.pdl@contact.univ-angers.fr)

Date de réception de la saisine :

Numéro d'enregistrement du projet :

Préambule :

Deux documents sont annexés au document de saisine pour vos besoins :

1- Classification des procédures selon leur degré de sévérité

2- Modalités d'utilisation des médicaments

Présentez un descriptif du projet et des phases expérimentales ci-dessous (1-2 pages maximum) sous forme d'un résumé du projet scientifique pour les « naïfs » suivi des références essentielles du projet.

Titre : Evaluation du potentiel ostéogénique d'association de biomatériaux avec des cellules souches mésenchymateuses en **sous cutanée chez la souris**

Résumé du projet scientifique pour les naïfs (incluant la justification scientifique) :

Nos projets de recherche impliquent des stratégies complexes de régénération tissulaires avec des interactions de biomatériaux et de cellules. Ces interactions impliquent des réponses inflammatoires et de communications entre différents types de cellules : les cellules apportées par les biomatériaux **avec** les cellules de l'hôte comme les monocytes macrophages, les cellules de l'immunité, les cellules osseuses et vasculaires et les cellules souches ...

La biocompatibilité *in vitro* et les interactions biomatériaux/cellules sont validées avant toute implantation animale afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la caractérisation de nos biomatériaux et de nos associations avec des cellules pour réaliser des greffes hybrides, **mi synthétiques et mi biologiques**, pour la régénération tissulaire.

La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives [1] dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a motivé le développement de **matériaux supports** injectables [2, 3] pour l'ingénierie tissulaire du cartilage [4] et osseuse [5]. Ces matrices injectables doivent également pouvoir **durcir** une fois implantées et présenter des propriétés mécaniques en relation avec le tissu à réparer. Des polymères ayant un fort pouvoir **épaississant** dans l'eau peuvent servir à réaliser des hydrogels par **pontage** physique, ionique ou covalente [6]. Notre domaine actuel de recherche est la régénération des tissus squelettiques comme l'os et le cartilage [7]. Notre objectif est de développer des hydrogels, biomatériaux à base de biopolymères, supports pour

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

l'ingénierie tissulaire (association de cellules avec un biomatériau) afin de réaliser de la médecine régénératrice. Les objectifs cliniques sont la régénération osseuse par apposition lorsque l'os a disparu ou pour le traitement d'ostéoradionécrose chez des patients irradiés [8, 9], pour le traitement d'un cancer des voies aérodigestives supérieures. Le cartilage qui ne répare pas seul, nécessite également des techniques d'ingénierie tissulaire.

*Afin d'améliorer les propriétés mécaniques de ces constructions tridimensionnelles, des renforts participent à l'élaboration, « à façon » des hydrogels [10]. Ces constructions complexes permettront de comprendre le rôle de différents paramètres des **biomatériaux** sur le comportement de certaines cellules en modélisant l'environnement tridimensionnel de ces cellules. Notre objectif est de construire des matrices extracellulaires synthétiques (**Biomatériau et hydrogel**) modulaires avec des objets fonctionnels [11, 12] compatibles afin de faire varier certains des paramètres de structure du biomatériau. Il s'agit de comprendre comment la structure du gel (taille des pores, hétérogénéité, propriétés dynamiques, fonctions spécifiques...) peut influencer les comportements cellulaires, en particulier la diffusion des cellules.*

Afin d'optimiser la formation d'un tissu osseux ou cartilagineux, les matrices synthétiques seront couplées à des cellules ayant un potentiel de différenciation en cellules osseuses ou cartilagineuses. La moelle osseuse totale (MOT) a d'ores et déjà prouvée son potentiel ostéogénique en étant associée à un biopolymère [9, 13]. Cette association MOT+biopolymère convient donc comme contrôle positif fiable de l'ingénierie tissulaire osseuse. La moelle osseuse comme de nombreux tissus humains contient des cellules souches mésenchymateuses (CSM) capables de différenciation ostéogénique [14]. Ces CSM peuvent être différenciées dans la voie ostéogénique pour donner des cellules osseuses in vitro. Elles sont différenciées soit seules (2D) soit en étant associées à un biomatériaux (3D). Il est intéressant d'observer la capacité à refaire de l'os de l'association de ces CSM isolées et différenciées dans la voie ostéogénique in vitro avec des biomatériaux par rapport à celui de la MOT couplée aux mêmes biomatériaux. Ces CSM sont aussi présentes au niveau de la fraction stromale vasculaire (FSV) du tissu adipeux [15]. Le tissu adipeux est prélevé de manière moins traumatique que la moelle osseuse. Il reste maintenant à définir le potentiel ostéogénique de la FSV de ce tissu associée à des biomatériaux par rapport à l'association MOT+biomatériaux.

Ces premiers essais de biocompatibilité in vivo et de biofonctionnalité en sous cutanée chez la souris avec et sans cellules (autologues ou humaines) seront réalisés pour commencer à faire la preuve du concept en choisissant une construction par indication, l'os ou le cartilage.

[Références essentielles :](#)

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

1. Gauthier, O., et al., Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute : a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *J Mater Sci Mater Med*, 2001. **12**(5): p. 385-390.
2. Weiss, P. and A. Fatimi, Injectable composite for bone repair, in *Biomedical composite*, L. Ambrosio, Editor 2009, Woodhead publishing limited.
3. Weiss, P., et al., The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials*, 2007. **28**: p. 3295–3305.
4. Vinatier, C., et al., Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009. **4**(4): p. 318-29.
5. Vinatier, C., et al., Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels. *Biomed Mater Eng*, 2006. **16**(4 Suppl): p. S107-13.
6. Bourges, X., et al., Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci*, 2002. **99**(3): p. 215-28.
7. Vinatier, C., et al., An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **102**(4): p. 1259-67.
8. Lerouxel, E., et al., Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: An experimental study in rats. *Biomaterials*, 2006. **27**(26): p. 4566-4572.
9. Espitalier, F., et al., A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials*, 2009. **30**(5): p. 763-9.
10. Xie, F., et al., Kinetic studies of a composite carbon nanotube-hydrogel for tissue engineering by rheological methods. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. **21**(4): p. 1163-8.
11. Rederstorff, E., et al., An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. **7**(5): p. 2119-30.
12. Sohier, J., et al., Hydrogel/calcium phosphate composites require specific properties for three-dimensional culture of human bone mesenchymal cells. *Acta Biomater*. **6**(8): p. 2932-9.

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

13. Shirasu, N., et al., Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta histochemica*, 2010. **112**(3): p. 270-7.
14. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
15. Zuk, P.A., et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

Titre du protocole de recherche :

*Evaluation du potentiel ostéogénique d'association de biomatériaux avec des cellules souches mésenchymateuses en **sous cutanée** chez la souris*

Renseignements concernant l'unité :

Nom de l'unité / laboratoire : LIOAD/ U791

Adresse postale : 1 place Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1

Nom du directeur du laboratoire : Pr Pierre Weiss

Nom du porteur du projet : Pr Pierre Weiss

Adresse mail du porteur du projet : pierre.weiss@univ-nantes.fr

Téléphone du porteur du projet : 0687741055

Nom du responsable du protocole utilisant les animaux : Pierre Weiss

Adresse postale : 1 place Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1

Adresse mail : pierre.weiss@univ-nantes.fr

Téléphone : 0687741055

N° et date d'autorisation d'expérimenter : Niveau 1 44143 Date obtention : 10/11/2011

N° et date d'agrément de chirurgie : diplôme de chirurgien-dentiste

Nom des personnes intégrées au protocole (Indiquer la fonction dans le protocole, la ou les formations et autorisations d'expérimenter (Niveau I, II, III, certificat de capacité, autorisation de pratiquer la chirurgie...) en précisant la date d'obtention) :

- Olivier Gauthier (vétérinaire, niveau I : D7181 (Date d'obtention : 26 juin 1996, Date de renouvellement 22/11/2011 valable jusqu'au 21/11/2016)), **responsable de l'injection des animaux et de leur euthanasie.**

- Pierre Weiss (PU-PH odontologie, niveau I : 44143, diplôme de chirurgien dentiste), **Manipulateur injection des animaux et euthanasie, porteur de projet.**

- Sophie Portron, doctorante 3^{em} année, encadrante scientifique, formation au niveau I en janvier 2009.

- Jérôme Guicheux, PhD, encadrant scientifique, DR2 Inserm, formation au niveau I le 15 mars 2009.

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

- Régis Roche, PhD, encadrant scientifique, formation au niveau I le 26 septembre 2008.

Noms des personnes non formées(Indiquer le nom de la personne responsable encadrant les manipulations) :

- Pierre Corre, PH du service de chirurgie maxillo-faciale, titulaire d'un DU de microchirurgie expérimentale de la faculté de médecine de Nantes *expérimentateur des injections sous la direction de Pierre Weiss ou Olivier Gauthier.*

- Amadou Touré, Odontologiste en thèse de l'université de Nantes *expérimentateur des injections sous la direction de Pierre Weiss ou Olivier Gauthier. Prélèvement des échantillons et analyses histologiques et microscopiques.*

- Cécile Boyer, post doctorante scientifique *expérimentateur des injections sous la direction de Pierre Weiss ou Olivier Gauthier.*

- Vincent Hivernaud, doctorant scientifique *expérimentateur des injections sous la direction de Pierre Weiss ou Olivier Gauthier. Prélèvement des échantillons et analyses histologiques et microscopiques.*

Encadrants :

- Gauthier Olivier (vétérinaire, niveau I : D7181 (Date d'obtention : 26 juin 1996, Date de renouvellement 22/11/2011 valable jusqu'au 21/11/2016))

- Weiss Pierre (PU-PH odontologie, niveau I : 44143)

Le protocole expérimental est-il réalisé en collaboration avec d'autres équipes du même laboratoire ou de laboratoires extérieurs (indiquez noms, grades et coordonnées du (des) responsables) ?

Décrivez la part de chacune des équipes dans le protocole expérimental et indiquez si le(s) collaborateur(s) possède(nt) eux-mêmes une autorisation d'expérimenter (avec Numéro et date de validité) ?

- STEM CIS : partenaire scientifique et financier (97490 Sainte Clotilde, La Réunion)

Responsable : Régis Roche (directeur), formation au niveau I le 26 septembre 2008
(regis.roche@adipsculpt.com)

• Animalerie hébergeant les animaux pendant le protocole :

- Nom du responsable de l'animalerie : Redini Françoise
- Nom de l'animalerie : Animalerie IRT-UN

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

- *N° d'agrément et date d'obtention : 4478 (date d'obtention : 2010)*
- *N° d'agrément du bâtiment pour les OGM : non communiqué*

Membres du personnel de l'animalerie intervenant dans le protocole (manipulations, entretiens, soins des animaux) : (Indiquer la fonction dans le protocole, la ou les formations et autorisations d'expérimenter (Niveau I, II, III, certificat de capacité, autorisation de pratiquer la chirurgie...) en précisant la date d'obtention) :

Lemarchand Mindé Stéphanie (niveau I juin 2012)

Amandine Lefebvre (niveau II 2003)

Christelle Bailly (niveau II 2010)

Aurélie Huger (niveau II 2010)

Malek Jaouachi (niveau III janvier 2012)

Sylvia lambot (Niveau II 2001 et chirurgie 2007)

Virginie Maurier (niveau II 2009)

Noms des personnes non formées (Indiquer le nom et numéro d'autorisation de la personne responsable encadrant les manipulations) :

Objectif du dépôt du dossier :

Dossier concernant un protocole répétitif : oui

Renouvellement d'un dossier en cours (donnez le n° _____) : non

Amendement d'un dossier existant (donnez le n° _____) : .../.../...

(Fiche d'amendement en annexe du dossier de Saisine) : oui / non

(joindre le document initial)

Objectif de l'utilisation d'animaux :

Recherche : oui Etude réglementaire : non

Enseignement : non Diagnostic : non

Production : non Autres (expliquez) : non

Justification de l'utilisation animale :

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Confirmez le fait que les activités concernées ne constituent pas des répétitions non justifiées d'études antérieures en cochant un des points suivants :

Existe-t-il des méthodes alternatives ? *non*

Si oui, lesquelles ?

-

Ces études ont-elles déjà été réalisées : *non*

Les études antérieures furent-elles concluantes (justifiez) : *oui*

Nous avons déjà mené des études identiques pour des stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage :

- *Vinatier C, Magne D, Gauthier O, Vignes-Colombeix C, et al. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. 2007;80(1):66–74.*

En collaboration avec une unité de Nice des associations de biomatériaux et de cellules souches mésenchymateuse ont été réalisées :

- *Trojani C, Boukhechba F, Scimeca J-C, Vandebos F, Michiels J-F, Daculsi G, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. Biomaterials. 2006;27(17):3256–64.*

Ces études ont montré l'intérêt de l'association de biomatériaux et de la moelle osseuse. Ce modèle animal permet de tester de nombreuses associations et stratégies en condition plus physiologiques que la culture, avec la présence de cellules de l'hôte, la vascularisation, des monocytes macrophages et des lymphocytes T lorsque le modèle n'est pas la souris immunodéprimée. Actuellement nous savons que les cellules souches mésenchymateuses meurent après implantation (Deschepper 2011, Boukhechba 2011). Il va falloir trouver des stratégies pour éviter l'ischémie des cellules souches dans un biomatériau. Liu dans Nature Medicine en 2011, a montré le rôle des lymphocytes T dans la destruction des cellules souches mésenchymateuses autologues et donc l'intérêt de l'utilisation également de modèles de souris non nude ou immunodéprimées.

Bien que semblables à d'autres expériences, ces études augmentent-elles le niveau de connaissance à leur sujet : *oui*

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Les études *in vitro* de biocompatibilité, de prolifération cellulaire et de différenciation vers le phénotype cartilagineux ou osseux sont réalisées *pour toute association* cellules/matériaux afin de réduire le nombre d'échantillons (et donc d'animaux) pour réaliser ce type d'expérimentation animale.

Existe-t-il d'autres études *in vivo* préalables à cette étude : non

Conditions d'hébergement, de suivi et d'observation des animaux pendant la durée du protocole :

Condition d'hébergement standard à l'espèce oui

Autres (précisez les conditions particulières demandées par le protocole) :

-

En groupe : oui Isolé : non Caillebotis : non

(Justifier le choix)

Alimentation (spécificité, lesquelles et justifications) : granules

Autre : eau à volonté

Calendrier général du protocole (*):

Date prévisible de début du protocole : novembre 2012

Durée prévisible du protocole : ce sont des protocoles qui dureront 1 à 4 mois au total et qui seront répétés en fonction des stratégies de réalisations de constructions biomatériaux avec ou sans cellules complexes et dont les résultats nous permettront de progresser dans l'évolution de ces constructions.

(*) : prévoir au minimum 4 semaines pour l'expertise des dossiers, car le CEEA-PdL ne se prononcera pas sur des expérimentations animales qui ont déjà débuté.

Animaux intégrés aux protocoles :

Espèce : souris Souche : swiss nude, ou C57BL/6 Age (en début de protocole) : 6 à 7 semaines

Fournisseur (coordonnées) ou élevage propre : Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, France

Nombre total : de 5 à 30 Nombre par groupe expérimental : 5 à 10 Sexe : femelle

Actuellement une première étude associant différentes stratégies d'association de MOT, de CSM et de greffe autologue associées à du Biphasic calcium phosphate (BCP) en sous cutanée chez la souris nude nous a permis de voir des différences significatives pour un nombre

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

d'échantillons par condition de 6 en utilisant deux implants par animal. Cette étude a été acceptée et présentée au congrès mondial des biomatériaux en Chine cette année avec Pierre Corre comme premier auteur. Une publication est soumise.

Nature de l'expérimentation :

- Prélèvements de tissus après euthanasie : oui, tissus conjonctif sous cutanée
- Biopsies après anesthésie locale ou locorégionale : non
- Prélèvements de sang : non
- Etude du comportement : non
- Etude :
 - injection de drogues : chronique/aigüe
 - greffe de tumeurs : chronique/aigüe
 - greffe d'organes : chronique/aigüe
 - implantation d'électrodes : chronique/aigüe
 - autre acte chirurgical : **chronique/ aigüe**
 - inoculation d'agents infectieux : chronique/aigüe
 - manipulation du génome : chronique/aigüe
 - essais de thérapie génique : chronique/aigüe
 - induction d'une maladie expérimentale : chronique/aigüe
 - inoculation de substances radioactives : chronique/aigüe
 - immunisation : chronique/aigüe
 - AUTRE (à préciser) :

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Description des phases expérimentales du protocole :

(2 pages maximum avec de préférence un **chronogramme** ou un **tableau** permettant d'identifier les groupes expérimentaux et les différentes étapes du protocole dans le temps)

Les conditions possibles dans chaque type de souris sont listées ci-dessous :

Pour les souris immuno-déprimées (nude), 12 conditions:

1. BCP (Biphasic calcium phosphate) seul = contrôle négatif (-)
2. BCP + MOT (Moelle osseuse totale) = contrôle positif (+)
3. BCP + FSV (Fraction stromale vasculaire du tissu adipeux)
4. BCP + CSM O2D (cellules souches mésenchymateuses cultivées en conditions ostéogéniques en 2 dimensions au fond de puits de plaques de culture puis associées aux granules de BCP avant implantation)
5. BCP + CSM O3D (cellules souches mésenchymateuses cultivées en conditions ostéogéniques en 3 dimensions sur des granules de BCP dans des plaques de culture)
6. **BCP + hydrogels (différents hydrogels seront testés)**
7. BCP + MOT + hydrogels
8. BCP+ FSV + hydrogels
9. BCP + MOT + MAI (molécules anti ischémie)
10. BCP + FSV + MAI
11. BCP + CSM O2D + MAI
12. BCP + CSM O3D + MAI

Chez la souris C57BL/6 (Action du système immunitaire), 13 conditions:

13. BCP seul = contrôle (-)
14. BCP + MOT = contrôle positif (+)
15. BCP + hydrogels
16. BCP + CSM O2D
17. BCP + CSM O3D
18. BCP + CSM O2D + Hydrogels

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

19. BCP + CSM O3D + Hydrogels
20. BCP + MOT + Hydrogel + MAI
21. BCP + CSM O2D + Hydrogel + MAI
22. BCP + CSM O3D + Hydrogel + MAI
23. BCP + MOT + MALT (Molécules anti Lymphocyte T)
24. BCP + CSM O2D + MALT
25. BCP + CSM O3D + MALT

Souris nude

	Biomatériau	Cellules	Agent moléculaire	Nombre d'animaux
Contrôle biomatériau	BCP			3 (6 implants)
	BCP	MOT (murine)		3 (6 implants)
Contrôle positif	BCP	FSV (humaine)		3 (6 implants)
	BCP	MSC O2D (murine)		3 (6 implants)
	BCP	MSC O3D (murine)		3 (6 implants)
	BCP + hydrogel			3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MOT (murine)		3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	FSV (humaine)		3 (6 implants)
	BCP	MOT (murine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP	FSV (humaine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP	MSC O2D (murine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP	MSC O3D (murine)	MAI	3 (6 implants)

Souris C57BL/6

	Biomatériau	Cellules	Agent moléculaire	Nombre d'animaux
Contrôle biomatériau	BCP			3 (6 implants)
	BCP	MOT (murine)		3 (6 implants)
Contrôle positif	BCP	MSC O2D (murine)		3 (6 implants)
	BCP	MSC O3D (murine)		3 (6 implants)
	BCP + hydrogel			3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MSC O2D (murine)		3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MSC O3D (murine)		3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MOT (murine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MSC O2D (murine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP + hydrogel	MSC O3D (murine)	MAI	3 (6 implants)
	BCP	MOT (murine)	MALT	3 (6 implants)
	BCP	MSC O2D (murine)	MALT	3 (6 implants)
	BCP	MSC O3D (murine)	MALT	3 (6 implants)

Conditions expérimentales :

- **PRELEVEMENT MOT :** 5 C57BL/6 ♂ (mâles pour l'hybridation in situ de suivi des cellules dans l'hôte) *La moelle est récupérée, juste après euthanasie, à partir des 2 fémurs des souris mâles C57BL/6.*
 - 1: Récupération des 2 fémurs
 - 2: Flushing des fémurs: Le fémur est coupé à ses 2 extrémités. Il est ensuite percé au niveau de l'extrémité proximale à l'aide d'une aiguille rose fichée dans une seringue de 5 mL contenant 3 mL de milieu α -MEM. Le flushing est effectué 3 fois (1 mL à chaque fois).
 - 3 : La moelle osseuse est récupérée dans un Falcon 50.
 - 4 : Elle est ensuite passée à travers un tamis cellulaire en nylon de porosité 70 μ m placé sur un tube de 50 mL pour se débarrasser des agrégats cellulaires.
- **PRELEVEMENT FSV:** Digestion par de la collagénase d'un lipoaspirat de graisse humaine provenant de patient(e)s ayant reçu(e)s une liposuction à la clinique Brétéché. Le lipoaspirat est considéré comme déchet opératoire et donc recueilli après consentement du patient. Le choix de la technique de prélèvement est laissé au chirurgien plasticien opérant la patiente (collaboration société STEM CIS et Clinique Brétéché à Nantes).

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

La durée de différenciation des CSM avant implantation peut être de 14 ou 28 jours en fonction des objectifs et ou des cellules utilisées. Concentration cellulaire d'ensemencement : 90 000 CSM par cm² de biomatériau.

➤ IMPLANTATION:

Les souris seront mélangées avant l'implantation pour une répartition aléatoire.

Le marquage des souris par poinçonnage des oreilles sera effectué selon la nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé («Breeding and care of Laboratory Animals » volume 2, page 13)

Afin de mettre en évidence une induction osseuse ectopique, les implants seront placés en site sous cutané lombaire (2 implants/ animal) dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Les poches sont réalisées au ciseau et un tunnel sous cutané est réalisé pour que l'implant soit éloigné de la suture. Chaque poche est suturée après implantation. Les explants sont ensuite prélevés pour chaque groupe après 4 (délai court) et 8 semaines (délai long). Pour plus d'informations voir la partie « prélèvements ».

NB: 15 minutes avant implantation: marquage DIL (rouge fluo) des cellules possible pour suivi cellulaire. Marquage au DIL: 3 échantillons / 6

Pour les cellules cultivées en 2D ou les cellules de la MOT ou FSV un temps d'incubation (adhésion) des cellules au biomatériau, dans les boîtes avant implantation sera nécessaire et est de 30 mn.

Quand nécessaire, l'hydrogel est adjoind à l'implant au moment de l'injection (pas en culture).

➤ EXPLANTATION:

Délai de sacrifice = 4 ou 8 semaines

n= 6 échantillons/condition

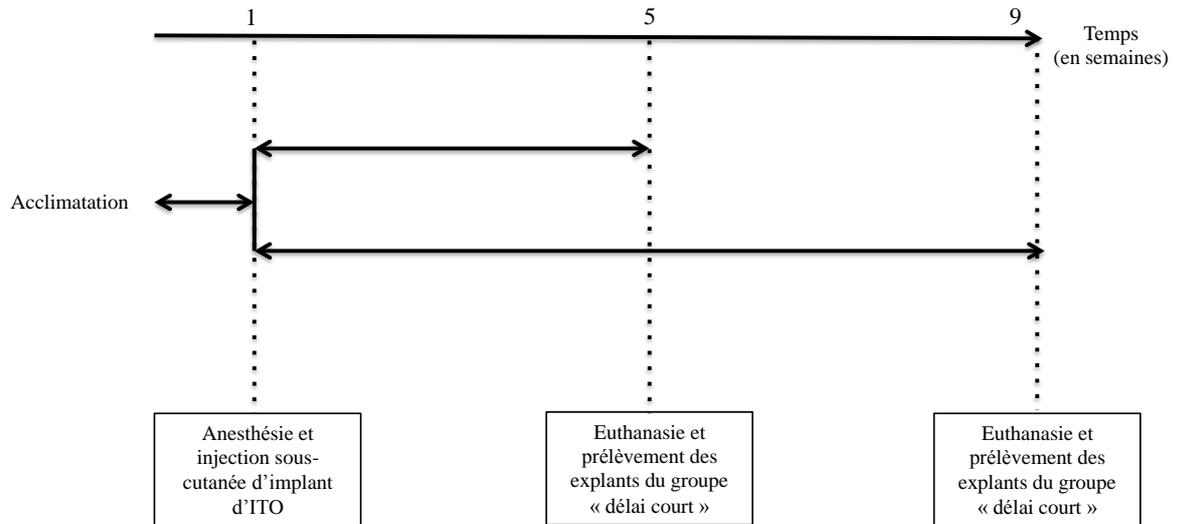
2 implants/ animal

15mg de BCP / implant

➤ OBSERVATION:

Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité thérapeutique expérimentale de la faculté de médecine de Nantes.

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE



Chronogramme de l'étude valable pour chaque groupe expérimental

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Evaluation de la douleur :

Déterminer le palier auquel votre protocole se rapporte à partir de la classification des procédures selon leur degré de sévérité (cf annexe ci-jointe en fin de saisine)

- Faible

Méthode d'anesthésie des animaux lors des phases critiques du protocole :

Anesthésiques utilisés : (Précisez la nature, les doses, les fréquences et voies d'administration...)

L'anesthésie sera assurée selon le protocole suivant : induction en chambre close d'isoflurane (Forène, Abbott, Rungis, France). L'anesthésie est réalisée sur un seul animal à la fois avec de l'isoflurane 5% à 3L/min dans une boîte de 3,7L.

L'anesthésie est ensuite maintenue à l'aide d'un masque d'isoflurane à 1% et un débit de 1 à 2 L/min.

Fréquence des anesthésies : 1 fois

Méthode d'analgésie des animaux en pré ou post chirurgical :

Analgésiques utilisés : (Précisez la nature, les doses, les fréquences et voies d'administration...)

Une injection de Buprénorphine (Temgesic 0,3mg/ml) : 0,03ml pour kg en sous cutané.

L'analgésique sera administré dans les 2/3 jours suivant l'opération (injection sous-cutanée) et en cas d'un score supérieur ou égal à 6 selon la grille comportementale (voir section « points limites »).

Devenir des animaux en fin

Intégration à un autre protocole : lequel ? (description des manipulations / expérimentations) non

-

Euthanasie : oui

Méthode d'euthanasie utilisée dans le cadre de ce protocole : inhalation de CO₂ : augmentation progressive du % de CO₂ jusqu'à perte de conscience des animaux puis saturation en CO₂ de la chambre. Trois minutes après l'arrêt de la respiration, les animaux sont retirés de la chambre et nous nous assurons de la mort de l'animal (respiration, battements cardiaque et reflexes).

Si utilisation de Soluté, nom et dose utilisée :

Justification de la méthode (le cas échéant) :

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Prélèvements (précisez la nature, la fréquence, le volume prélevé ainsi que les méthodes utilisées...)

Utilisation des prélèvements post-mortem :

- pour le même projet : oui (à décrire brièvement)
- L'explantation sera réalisée de manière aseptique. Les échantillons seront plongés dans un récipient individuel contenant un fixateur. Un code de repérage de l'échantillon sera marqué.
- Les explants seront le jour même analysés par DMA pour le suivi de leurs modifications viscoélastiques.
- Une partie des explants sera incluse dans le GMA, puis étudiée en micro tomographie puis microscopie électronique puis histologie classique descriptive après coloration au trichrome de Goldner.
- Une partie des explants sera décalcifiée puis incluse en paraffine pour réaliser une étude histomorphométrique semi quantitative de la repousse osseuse. Des études d'immunomarquage et d'hybridation in situ seront réalisées.
- Une partie des explants sera analysée en microscopie électronique pour quantifier la repousse osseuse.
- Une partie des explants sera analysée en lumière fluorescente pour analyse au microscanner, en immunohistochimie, histologie, MO et MEB
- pour un autre projet : non

Critères d'arrêt du protocole par rapport à la souffrance et points limites :

(Anticiper l'inconfort ou la détresse de l'animal en déterminant le point limite à ne pas dépasser lors du protocole)

Moyens mis en œuvre pour détecter, identifier et y mettre un terme sans délais

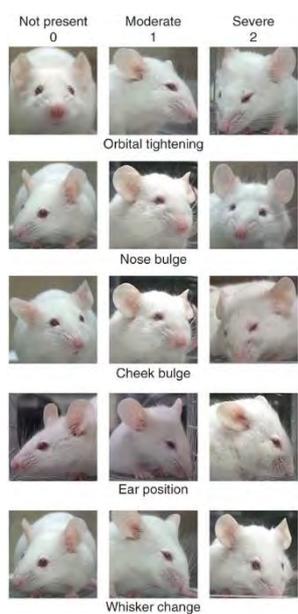
Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours. *La grille comportementale ci-dessous sera complétée pour chaque animal :*

	0 point	1 point	2 points	3 points
Perte de poids	<5%	5-12%	13-20%	>20%
Apparence physique	normale	Peu altérée	Modérément altérée	Très altérée
Comportement	normal	Peu modifié	Modérément modifié	Très modifié
Réponses comportementales aux stimuli	normales	Peu modifiées	Modérément modifiées	Très modifiées

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS DE LA LOIRE DOSSIER DE SAISINE

Si le score est égal ou supérieur à 8, l'animal sera sacrifié pour des raisons éthiques et utilisé pour des analyses histologiques.

La surveillance de la douleur sera quotidienne au moyen de l'échelle de « grimace faciale de la souris » proposée par Langford DJ et al, Nat Methods 2010 ;7 :447-9. Cette échelle analyse les expressions faciales des souris pour déterminer et quantifier la présence d'une douleur physique. Les expressions faciales sont présentées dans la figure ci-dessous



Langford DJ et al, Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nat Methods 2010 ;7 :447-449.

Figure 1: In the MGS, intensity of each feature is coded on a three-point scale. For each of the five features, images of mice exhibiting behavior corresponding to the three values are shown.

Chaque jour, chaque animal sera examiné pour rechercher les expressions faciales de douleurs. En cas de présence de grimaces faciales, les animaux recevront une dose d'analgésique (Buprénorphine). En cas de douleur non contrôlées, l'animal sera sacrifié pour raison éthique.

En cas d'apparition d'un de ces symptômes malgré le traitement antalgique adapté, l'animal sera retiré de l'étude et euthanasié dans les plus brefs délais

Autres informations utiles pour l'étude de la saisine :

-

**COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE DES PAYS
DE LA LOIRE
DOSSIER DE SAISINE**

Date :

Signature du porteur du projet : Pierre Weiss

Cette signature suppose que le responsable de l'étude et le directeur de laboratoire, ou la personne responsable de l'utilisation des animaux, reconnaissent leur pleine responsabilité et leur accord avec les procédures décrites ci-dessus. Si à un moment quelconque de cette étude, un changement dans l'utilisation des animaux doit être apporté, ils acceptent de soumettre un amendement au dossier au comité d'éthique. Les signataires en signant ce document, confirment que les personnes impliquées dans cette étude possèdent une formation adéquate en ce qui concerne les conditions de maintenance et d'expérimentation animale

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

La classification de la sévérité d'une procédure sera déterminée par le degré de douleur, de la souffrance, de la détresse ou de dommage durable que peut connaître un animal au cours d'une procédure.

A- les différentes classes de Sévérité

Selon un groupe d'experts dans ce domaine, réunis à l'initiative de la Commission européenne en juillet 2009, on peut distinguer quatre catégories de procédures :

1-Procédures sans-réanimation :

Il s'agit des procédures sous anesthésie générale, après lesquelles les animaux sont directement euthanasiés.

2-Procédures légères :

Procédures engendrant une douleur probable légère à court terme, de la souffrance ou de la détresse sans détérioration significative du bien-être animal.

3-Procédures modérées :

Procédures engendrant une douleur probable modérée à court terme, ou une douleur légère durable, de la souffrance ou de la détresse avec une détérioration modérée du bien-être animal

4- Procédures sévères :

Procédures engendrant une douleur probable sévère, ou une douleur modérée durable, de la souffrance ou de la détresse avec une détérioration sévère du bien-être animal.

B- les critères de classification

La classification tiendra compte de toutes les interventions sur un animal dans une procédure définie. Elle sera fondée sur les effets probables les plus sévères après avoir appliqué toutes les techniques de raffinement appropriées.

On doit tenir compte de plusieurs facteurs, en considérant chaque procédure au cas par cas :

- Le type de manipulation,

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

- La nature de la douleur, de la souffrance, de la détresse ou du mal-être durable provoqué par la procédure, son intensité, la durée, la fréquence et la multiplicité des techniques employées
- La souffrance cumulative dans une procédure
- Les restrictions vis-à-vis des normes de bien-être concernant l'hébergement et les soins habituels
- l'espèce animale, la maturité des animaux, le génotype, le sexe, l'âge de l'animal
- si l'animal doit être réutilisé, la sévérité réelle des procédures précédentes
- les méthodes pour réduire ou éliminer la douleur, y compris le raffinement concernant l'hébergement et les soins.
- les points limites envisagés.

C-Exemples de classification dans différents types de procédure

1-Procédure _____ *légère* _____ :

Administration d'un anesthésique, à l'exclusion d'une anesthésie réalisée dans le but d'une euthanasie.

Étude pharmacocinétique où une dose unique est administrée et un nombre limité d'échantillons de sang sont prélevés (soit au total moins de 10% du volume circulant) ; la substance n'est pas susceptible de causer d'effet indésirable détectable;

Imagerie non invasive des animaux (par exemple l'IRM), avec une sédation ou une anesthésie appropriée;

Intervention superficielle, par exemple biopsie de la queue ou des oreilles, implantation sous-cutanée non chirurgicale des mini-pompes et des transpondeurs;

Emploi de dispositifs externes de télémétrie qui provoquent des troubles mineurs aux animaux ou une interférence mineure avec leur activité normale et leur comportement;

L'administration de substances par voie sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale, par gavage, par voie intraveineuse sur les vaisseaux sanguins superficiels, lorsque la substance n'a qu'un impact léger sur l'animal, et les volumes injectés sont dans des limites appropriées pour la taille et l'espèce de l'animal;

Induction de tumeurs, ou tumeurs spontanées, qui ne produisent aucun signe clinique détectable ou effets indésirables (par exemple les petits nodules sous-cutanés non invasifs);

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

Elevage d'animaux génétiquement modifiés se traduisant par un phénotype sans effets négatifs majeurs.

Régime alimentaire modifié qui ne couvre pas tous les besoins nutritionnels des animaux et qui est susceptible d'avoir un impact clinique bénin le temps de l'étude.

Maintien en cages à métabolisme pour une durée courte (<24h);

Etudes impliquant une privation de courte durée des partenaires sociaux, la mise en cage individuelle pour des rats adultes ou des souris de souches sociables pendant une courte durée;

Etudes qui peuvent exposer les animaux à des stimuli nocifs qui sont brièvement associés à une douleur légère que les animaux peuvent éviter facilement;

Association ou accumulation des exemples suivants :

- Évaluer la composition corporelle par des mesures non invasives avec des contraintes minimales;
- Monitoring de l'ECG par des techniques non invasives avec peu ou pas de contraintes pour des d'animaux habitués;
Emploi de dispositifs externes de télémétrie qui sont susceptibles de ne causer aucun traumatisme sur des animaux socialement adaptés et qui n'interfèrent pas avec leur activité normale et leur comportement;
- Elevage d'animaux génétiquement modifiés qui présentent un phénotype sans effet indésirable cliniquement décelable;
- Ajouter des marqueurs inertes dans le régime alimentaire et en suivre le transit digestif.
- Retrait d'aliments moins de 24h chez le rat adulte;
- Essais en plein champ

2-Procédure

modérée

Application fréquente de substances d'essai qui produisent des effets cliniques modérés, et prélèvements de sang (> 10% du volume circulant) sur un animal conscient sans remplacement du volume sanguin quelques jours après;

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

Etude pour rechercher la dose aiguë, tests de toxicité chronique ou de cancérogénicité, avec des points limites non létaux;

Intervention chirurgicale sous anesthésie générale et analgésie appropriée, associée à des douleurs, souffrance ou une altération de l'état général post-chirurgicales. Voici quelques exemples: thoracotomie, craniotomie, la laparotomie, orchidectomie, lymphadénectomie, thyroïdectomie, chirurgie orthopédique, avec la stabilisation et la gestion efficace des plaies, la transplantation d'organes avec une gestion efficace des rejets, implantation chirurgicale de cathéters ou de dispositifs biomédicaux (par exemple les émetteurs de télémétrie, mini-pompes, etc.) ;

Modèles d'induction de tumeurs ou tumeurs spontanées, qui devraient provoquer une douleur modérée ou une détresse ou des troubles modérés du comportement normal;

Irradiation ou chimiothérapie avec une dose sub létale, ou avec une dose létale mais avec la reconstitution du système immunitaire. On peut s'attendre à des effets indésirables légers ou modérés, et de courte durée (<5 jours);

Elevage d'animaux génétiquement modifiés dont le phénotype présente des effets négatifs modérés;

Création d'animaux génétiquement modifiés avec interventions chirurgicales;

Utilisation de cages à métabolisme impliquant une restriction modérée du mouvement sur une période prolongée (jusqu'à 5 jours);

Etudes avec des régimes alimentaires modifiés qui ne couvrent pas tous les besoins nutritionnels des animaux et qui sont susceptibles de causer des anomalies cliniques modérées tout au long de l'étude;

Restriction alimentaire sur 48 heures chez le rat adulte;

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

Provocation de situations de fuite ou d'évitement par un stimulus auquel l'animal est incapable d'échapper, et qui devraient entraîner une détresse modérée.

3- Procédure sévère

Tests de toxicité avec la mort comme point limite, ou lorsque des accidents mortels sont prévisibles avec induction d'un état physiopathologique sévère. Par exemple, une dose unique lors de tests de toxicité aiguë (voir les directives de test de l'OCDE);

Test d'un dispositif médical lorsque son absence de maîtrise peut causer de graves douleurs ou la mort de l'animal (par exemple dispositifs d'assistance cardiaque);

Tests d'activité des vaccins caractérisés par un traumatisme persistant de l'état de l'animal, une maladie évolutive qui mène à la mort, associés à de la douleur modérée sur une longue durée;

Irradiation ou chimiothérapie avec une dose létale sans reconstitution du système immunitaire, avec production ou reconstitution du greffon contre l'hôte;

Modèles avec induction de tumeurs ou tumeurs spontanées, qui devraient provoquer une maladie létale évolutive associée à une douleur modérée de longue durée. Exemple : tumeurs causant de la cachexie, tumeurs invasives des os, tumeurs avec dissémination métastatique et tumeurs s'ulcérant;

Interventions chirurgicales ou autres chez les animaux sous anesthésie générale, qui devraient entraîner une douleur postopératoire sévère ou modérée et persistante, ou une insuffisance persistante de l'état général des animaux. Production de fractures instables, thoracotomie sans analgésie adéquate, ou traumatisme produisant plusieurs défaillances d'organes;

Transplantation d'organes, où le rejet d'organe est susceptible de conduire à un état de détresse ou une altération de l'état général des animaux (xénotransplantation, par exemple);

Elevage d'animaux présentant des troubles génétiques qui devraient entraîner une déficience

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

grave et persistante de l'état général, par exemple la maladie de Huntington, la dystrophie musculaire, modèles de névrite chronique récidivante;

Utilisation de cages de métabolisme impliquant une forte restriction de mouvement sur une période prolongée;

Choc électrique incontournable (par exemple pour produire une impuissance acquise);

Isolement complet d'espèces sociales, par exemple chiens et primates non humains, pendant des périodes prolongées

Stress induit pas une immobilisation pour obtenir des ulcères gastriques ou une insuffisance cardiaque chez le rat;

Nage forcée ou tests d'exercices avec l'épuisement comme point limite

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

Utiliser en priorité les médicaments vétérinaires prévus pour l'espèce avec les indications thérapeutiques correspondant ;

Lorsqu'aucun médicament vétérinaire autorisé¹ et approprié² n'est disponible³, vous pouvez utiliser :

① en première intention, un médicament vétérinaire autorisé pour des animaux d'une autre espèce dans la même indication thérapeutique ou pour des animaux de la même espèce dans une indication thérapeutique différente,

② si un tel médicament n'existe pas, vous pouvez alors utiliser un médicament vétérinaire autorisé destiné à une autre espèce pour une autre indication thérapeutique,

③ si les médicaments mentionnés précédemment n'existent pas, vous pouvez alors utiliser un médicament à usage humain.

NB : Les préparations extemporanées sont strictement interdites dans un EEA.

Conditions de stockage :

1./Lieu de détention :

Les médicaments détenus doivent être stockés dans un local ou dispositif :

- permettant leur séparation de tout autre produit,
- fermant à clé si les médicaments appartiennent aux catégories suivantes (articles L.5132-1 du code de santé publique) : substances dangereuses, stupéfiants, psychotropes et figurant sur les listes I et II.

2./ Enregistrement :

Les entrées et sorties par ordre chronologiques, comportant les renseignements suivants (article L .5132-2 du code de santé publique) doivent être enregistrés.

- Nom du titulaire de l'autorisation d'expérimenter utilisant le médicament

ANNEXE 1: CLASSIFICATION DES PROCEDURES SELON LEUR DEGRE DE

SÉVÉRITÉ

- Nom du médicament
- Quantité entrées et quantités retirées du stock et numéro du lot
- Date de délivrance
- Identification des animaux de destination ou d'essai
- Indication du traitement

Ces enregistrements, effectués par le responsable, sont à conserver pendant 10 ans.

Par ailleurs, en dehors des protocoles expérimentaux, les animaux malades ou blessés doivent obligatoirement être examinés par un vétérinaire inscrit à l'ordre des vétérinaires conformément aux article R* 241-9 à R* 241-15 du code rural.

ANNEXE IV : Dossier de saisine

Etude de différentes procédures d'ingénierie tissulaire osseuse sur le modèle de défaut critique de calvaria chez le rat nude.

DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ..., aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

Etude de différentes procédures d'ingénierie tissulaire osseuse sur le modèle de défaut critique de calvaria chez le rat nude.

1.2. Durée du projet :

36 mois

1.3. Date prévue de début du projet :

11 février 2013

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

Les fentes labio-maxillo-palatines représentent la malformation faciale la plus fréquente (1/700 naissances). Une des étapes essentielles dans la prise en charge est la greffe osseuse qui améliore les conditions de l'éruption dentaire et la croissance faciale. Cette intervention requiert la mise en place d'un greffon osseux autologue. Ce prélèvement peut être responsable de douleurs post-opératoires et constitue une source potentielle de complication (cicatrice et infection).

De nombreuses équipes tentent de trouver une alternative efficace à la greffe

osseuse. Ainsi les céramiques phosphocalciques peuvent constituer une alternative intéressante lorsque le site receveur est sain. Cependant les faibles capacités de cicatrisation de l'os hypotrophique (cicatriciel, hypoplasique ou irradié) ne donnent pas de bons résultats avec ces biomatériaux. Dans le but d'améliorer la cicatrisation osseuse, les procédures d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) permettent d'associer les biomatériaux avec une source cellulaire ostéogénique.

Un des modèles classiquement utilisés pour étudier la régénération osseuse est celui des défauts osseux de calvaria sur des rongeurs. Les travaux précédemment menés, utilisant ce modèle, ont montré l'intérêt d'associer une greffe de moelle osseuse totale (MOT), à une céramique pour favoriser la repousse osseuse dans ces territoires à faible trophicité. Les résultats obtenus par cette association sont comparables à ceux obtenus par la technique de référence (greffe osseuse) sur un modèle expérimental (en cours de publication).

Une autre source de cellules ostéogéniques est le tissu adipeux. En effet la fraction stromale du tissu adipeux (FSV) contient, comme la moelle osseuse, des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules ont montré un potentiel ostéogénique après association avec des céramiques phosphocalciques. Tout comme la MOT, l'utilisation de la FSV ne requiert qu'un seul temps opératoire. Le tissu adipeux est par ailleurs prélevable de manière peu traumatique. Toutefois, peu d'études portent sur le potentiel ostéogénique de la FSV totale (sans isolation des CSM) couplé à des biomatériaux.

Nous souhaitons valider les résultats de la greffe de MOT obtenus chez l'animal avec de la MOT humaine, et investiguer le potentiel de la FSV humaine pour des procédures d'ITO, avant une mise en application humaine. Pour cela, il est indispensable de comparer les greffes de MOT humaine et de FSV humaine avec les procédures d'ITO à partir de MOT murine (1), de CSM de la moelle osseuse humaine (2) et murine (3) et de CSM du tissu adipeux humain (4) dans un même modèle pré-clinique immuno-déficient chez le rat.

Pour cela une étude sur 8 conditions devra être répétée avec au moins 3 donneurs de cellules différents pour obtenir un résultat reproductible, soit un total de 78 animaux prévus. Le nombre de 6 défauts par conditions prend en compte la puissance statistique recherchée en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaires (réduire). Chaque étape de l'étude est mise en place en tenant compte du bien être de l'animal de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son sacrifice pour analyse à la fin de l'étude, en cas de douleur des animaux malgré l'injection d'analgésique durant les 7 semaines de l'étude, ceux-ci seront sacrifiés pour mettre fin aux douleurs et les explants seront analysés en tenant compte du délai atteint (raffiner).

L'objectif final de cette étude est de montrer qu'il est possible grâce à un procédé d'ITO intra-opératoire d'égaliser les résultats de la greffe osseuse autologue sans recours à un prélèvement osseux ou une procédure lourde d'ITO, et de réduire les contraintes imposées au patient en diminuant la morbidité de la procédure. Cette étude pré-clinique se justifie par les résultats obtenus sur les cellules souches de moelle osseuse et du tissu adipeux *in vitro*, résultats qui montrent une capacité de différenciation de ces cellules au contact des biomatériaux vers une voie de différenciation ostéogénique. Cette étude pré-clinique est une étape nécessaire pour le transfert vers l'homme des procédures les plus prometteuses et il n'est donc pas possible de remplacer ce modèle par un modèle *ex-vivo* qui ne nous informerait pas de la réponse de l'organisme aux différentes procédures de régénération osseuse (remplacer).

Si les résultats de l'étude pré-clinique avec de la MOT et/ou de la FSV humaines sont conformes à ceux obtenus avec de la MOT murine, une étape supplémentaire sera franchie en vue d'une application dans le traitement des fentes labio-palatines chez l'homme.

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom : Unité Thérapeutique Expérimentale : UTE
- Numéro d'agrément : C44015
- Date de délivrance de l'agrément : renouvelée en mai 2008
- Nom et prénom du responsable : Rédini Françoise
- Adresse électronique du responsable : francoise.redini@univ-nantes.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : Yohann ALLAIN (niveau II en 2004)
- Adresse électronique de ce délégataire : Yohann.Allain@univ-nantes.fr

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

CEEA Pays de la Loire

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Weiss Pierre
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : LIOAD/ U791, 1 place Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1
- Adresse électronique : pierre.weiss@univ-nantes.fr
- Téléphone : 0687741055

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Guylène HAMERY (niveau II en 2005)
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UTE UFR de médecine Nantes

- Adresse électronique : guylene.hamery@univ-nantes.fr ou ute@univ-nantes.fr
- Téléphone : 02.40.41.29.56

3.2. Le personnel

- **Compétences des personnes participant au projet :**

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ la conception des procédures expérimentales et des projets ▪ l'application de procédures expérimentales aux animaux ▪ les soins aux animaux ▪ la mise à mort des animaux | <ul style="list-style-type: none"> ●oui ○ non ●oui ○ non ● oui ○ non ● oui ○ non |
|---|--|

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ? ○
- requis par la loi ? ○
- justifié du point de vue scientifique ? ●

○ **Informations sur cette justification :**

Une étude sur des rats Lewis, une souche de rats syngéniques a permis de tester la faisabilité du modèle entre nos mains mais ne permet pas d'utiliser des cellules humaines (système immunitaire efficace). Nous souhaitons donc transférer ce modèle sur une souche de rat nude immunodéficiente afin de tester une nouvelle source de cellules (FSV) et d'utiliser des cellules humaines pour se rapprocher de l'application clinique.

3.3.3. Description du projet :

Les études seront réalisées sur des rats, « nude », issus du centre d'élevage de Charles River. Un délai d'acclimatation d'une semaine sera respecté.

Démarche A: Evaluation et comparaison de la régénération osseuse sur un modèle de défaut osseux de calvaria : Différentes sources cellulaires seront implantées de manière extemporané en association avec un biomatériau d'ingénierie tissulaire osseuse chez le rat nude.

La chirurgie sera répartie sur plusieurs jours. Pour les groupes contenant une association de biomatériau et d'une source cellulaire non cultivée, un délai de 30min d'adhérence de ces cellules au biomatériau sera respecté.

Après 7 semaines, les animaux seront euthanasiés : anesthésie par induction en chambre close d'isofluorane puis injection intracardiaque de thiopental sodique (Nesdonal® 0,5-1 mL par animal) ; les implants seront récupérés afin d'effectuer des analyses histologiques et microscopiques du tissu formé. L'explantation des calvarias sera réalisée de manière aseptique.

Démarche B: Evaluation et comparaison de la régénération osseuse sur un modèle de défaut osseux de calvaria : Différentes sources cellulaires seront cultivées et différenciées in vitro en association avec un biomatériau d'ingénierie tissulaire osseuse puis implantées chez le rat nude.

Après 7 semaines, les animaux seront euthanasiés, comme précédemment décrit, pour récupérer les implants afin d'effectuer des analyses histologiques et microscopiques du tissu formé. L'explantation des calvarias sera réalisée de manière aseptique.

OBSERVATION:

Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité thérapeutique expérimentale de la faculté de médecine de Nantes.

SOURCES CELLULAIRES :

Cellules humaines : La moelle osseuse humaine, la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux sont récupérés à partir de déchets opératoires d'opérations humaines ayant lieu le même jour (patients informés et consentants).

Moelle Osseuse Totale murine (mMOT) :

Deux rats Lewis seront utilisés pour le prélèvement de la moelle osseuse murine.

- euthanasie des animaux (Anesthésie par induction en chambre close d'isofluorane puis injection intracardiaque de nesdonal (0,5-1 mL par animal)
- section des fûts fémoraux, tibiaux et huméraux aux extrémités épiphysaires distale et proximale à l'aide d'un disque diamanté sur pièce à main sous hotte
- recueil du contenu médullaire extemporanément : instillation de 1 ml de milieu complet dans chaque os dans l'extrémité proximale du fût, puis recueil du contenu médullaire à l'extrémité opposée déclive par entraînement
- récupération et élimination du surnageant
- conservation dans un tube hépariné Venoject II (Terumo Europe, Louvain, Belgique) après comptage sur cellule de Malassez après centrifugation

Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) :

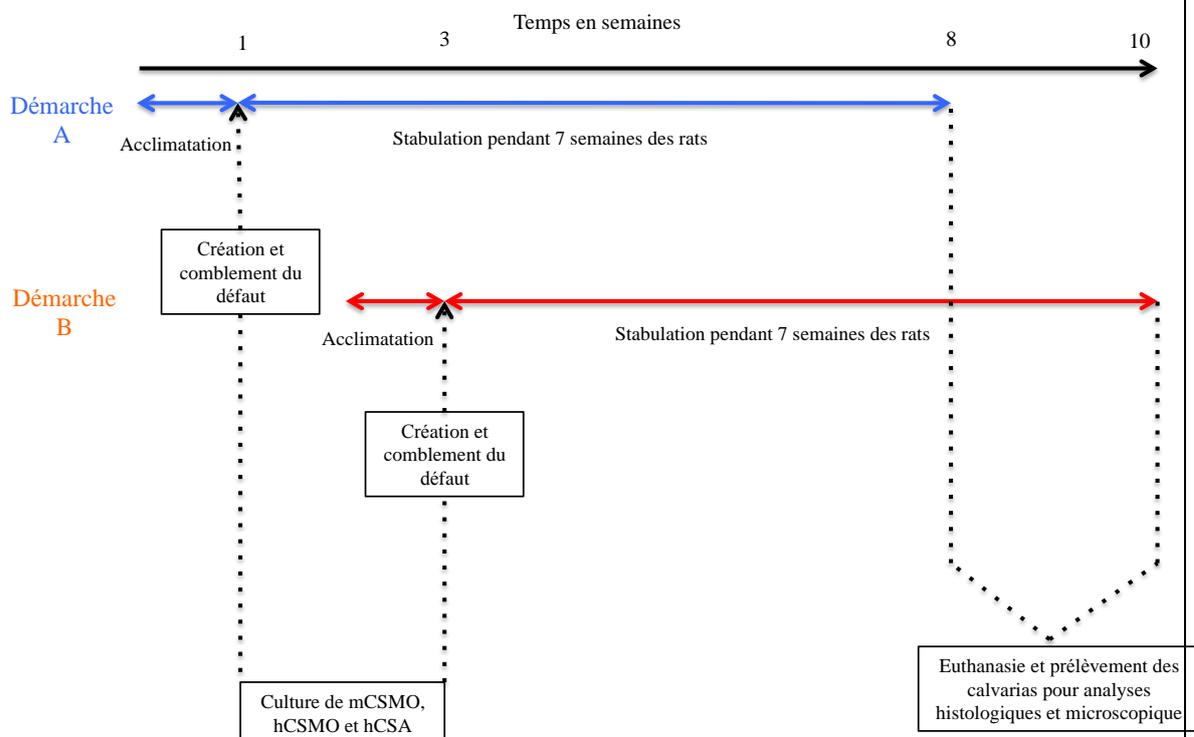
Les CSM de la moelle osseuse humaine (hCSMO) et murines (mCSMO) ont été obtenues par culture cellulaire de moelle osseuse humaine ou murine.

Les CSM adipeuses humaines (hCSA) ont été obtenues après mise en culture de hFSV obtenue par digestion enzymatique d'un lipoaspirat.

<i>N° animal</i>	<i>Défaut gauche</i>	<i>Défaut droit</i>
1	MOT humaine +Biomatériau	Greffe osseuse humaine
2	MOT humaine +Biomatériau	Greffe osseuse humaine
3	MOT humaine +Biomatériau	Greffe osseuse humaine
4	MOT humaine +Biomatériau	Greffe osseuse humaine

5	MOT humaine + Biomatérialu	Greffe osseuse humaine
6	MOT humaine + Biomatérialu	Greffe osseuse humaine
7	MOT murine + Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
8	MOT murine + Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
9	MOT murine + Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
10	MOT murine + Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
11	MOT murine + Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
12	MOT murine + Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
13	FSV humaine+ Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
14	FSV humaine+ Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
15	FSV humaine+ Biomatérialu	Biomatérialu seul = contrôle biomatérialu
16	FSV humaine+ Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
17	FSV humaine+ Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
18	FSV humaine+ Biomatérialu	Vide = Contrôle négatif
19	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu
20	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu
21	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu
22	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu
23	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu
24	CSM osseuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu
25	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu
26	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu
27	CSM adipeuse humaine + Biomatérialu	CSM osseuse murine + Biomatérialu

Exemple de tableau de répartition des différentes conditions dans les défauts de calvaria des différents rats



Chronogramme possible de l'étude de procédés d'ingénierie tissulaire osseuse en défaut critique de calvaria chez le rat nude

Le délai entre les 2 démarches peut varier en fonction du temps d'amplification des cellules et des disponibilités d'hébergement.

Ce projet a déjà fait l'objet d'une évaluation par le comité de saisine des Pays de la Loire (dossier Saisine 2012.250 CEEA PDL)

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

7 semaines après l'implantation les animaux seront sacrifiés. Anesthésie par induction en chambre close d'isoflurane puis injection intracardiaque de nesdonal (0,5-1 mL par animal)

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Des études antérieures ont permis de démontrer que le nombre de 6 défauts par groupe permet d'obtenir une puissance statistique suffisante pour observer les différences entre les groupes. Ces études ont permis d'observer que les animaux ne montrent pas de signes de souffrance suite à la création du défaut. Seules les lésions de grattage sur la zone opérée paraissent retentir sur le bien être des animaux. Pour limiter ce risque, les animaux sont isolés pendant 1 semaines après l'opération et en cas de signes de démangeaisons, un antalgique (paracétamol) est administré par voie orale aux animaux concernés à raison de 0,30mg par jour de paracétamol par animal.

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Afin de développer des techniques et protocoles chirurgicaux qui seront utilisés chez l'homme, la démonstration d'une preuve de concept sur le petit animal est nécessaire.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

- Souris (*Mus musculus*)
- Rats (*Rattus norvegicus*)
- Cobayes (*Cavia porcellus*)
- Hamsters (syriens) (*Mesocricetus auratus*)
- Hamsters (chinois) (*Cricetulus griseus*)
- Gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*)
- Autres rongeurs (*Rodentia*)
- Lapins (*Oryctolagus cuniculus*)
- Chats (*Felis catus*)
- Chiens (*Canis familiaris*)
- Furets (*Mustela putorius furo*)
- Autres carnivores (*carnivora*)

- | | |
|--|--------------------------|
| Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Caprins (<i>Capra aegagrus hircus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Ovins (<i>Ovis aries</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Bovins (<i>Bos primigenius</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Prosimiens (<i>prosimia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Ouistitis et tamarins (<i>par exemple, Callithrix jacchus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singe cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singe rhésus (<i>Macaca mulatta</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Vervets <i>chlorocebus</i> spp. (généralement soit <i>pygerythrus</i> , soit <i>sabaeus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Babouins (<i>Papio</i> spp.) | <input type="checkbox"/> |
| Saïmiris (<i>par exemple, Saimiri sciureus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres espèces de primates non humains (autres espèces de <i>Ceboidea</i> et <i>Cercopithecoidea</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Singes anthropoïdes (<i>Hominoidea</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres mammifères (autres <i>Mammalia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Poules domestiques (<i>Gallus gallus domesticus</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres oiseaux (autres <i>Aves</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Reptiles (<i>Reptilia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Grenouilles <i>Rana</i> (<i>Rana temporaria</i> et <i>Rana pipiens</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Grenouilles <i>Xenopus</i> (<i>Xenopus laevis</i> et <i>Xenopus tropicalis</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres amphibiens (autres <i>Amphibia</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Autres poissons (autres <i>Pisces</i>) | <input type="checkbox"/> |
| Céphalopodes (<i>Cephalopoda</i>) | <input type="checkbox"/> |

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

Le modèle de régénération osseuse chez le rongeur est bien décrit dans la littérature. Le choix du rat permet de travailler sur des proportions convenables d'os à régénérer et les outils d'analyses chez ces animaux sont très développés : scanner petit animal, anticorps disponibles contre les antigènes murins, outils de chirurgie adaptés.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)

Animaux non domestiques non tenus en captivité

Animaux génétiquement altérés

Animaux non domestiques non tenus en captivité

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :**

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :**

- **Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :**

Animaux génétiquement altérés

- **Animaux génétiquement modifiés** oui non

Si oui :

- **Création d'une lignée** oui non

- **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation** oui non

- Phénotype non dommageable** oui non

- Phénotype dommageable** oui non

- Souche mutante autre oui non
- Si oui :
 - Création d'un mutant oui non
 - Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation oui non
 - Phénotype non dommageable oui non
 - Phénotype dommageable oui non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

- Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ? oui non

- Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :

1

Etablissement :

- Nom :

CHARLES RIVER LABORATORIES FRANCE

- Adresse postale :

69592 L'Arbresle Cedex FRANCE

- Animaux fournis :

Rats Nude NIH et Rats Lewis

- Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :

- Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? oui non

- Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? oui non

- Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

0

Etablissement :

- Nom :

- Adresse postale :

- Animaux fournis :

- **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

oui

non

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

26 par étude soit 78 pour 3 études avec des donneurs différents

- **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

24 rats nude par étude permettent de faire 8 groupes d'étude (2 défauts par rat et 6 défauts par groupe). Afin de faire le contrôle positif d'ingénierie tissulaire osseuse chez le rat, 2 rats Lewis sont nécessaire pour isoler la moelle osseuse totale.

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

Les animaux seront utilisés après la fin de la croissance des os du crâne, à partir de 2 mois (8 semaines), afin d'avoir un os mature à régénérer.

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Les animaux utilisés sont des femelles. Ce choix permet d'éviter les rivalités de dominance que l'on observe chez les mâles et qui peuvent pousser les animaux à se battre entre eux.

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours.
La grille comportementale ci-dessous sera complétée pour chaque animal :

	0 point	1 point	2 points	3 points
Perte de poids	<5%	5-12%	13-20%	>20%
Apparence physique	normale	Peu altérée	Modérément altérée	Très altérée
Comportement	normal	Peu modifié	Modérément modifié	Très modifié
Réponses comportementales aux stimuli	normales	Peu modifiées	Modérément modifiées	Très modifiées

Si le score est supérieur ou égal à 5, l'animal recevra un antalgique. En cas d'apparition d'un de ces symptômes malgré le traitement antalgique adapté, l'animal sera retiré de l'étude et euthanasié dans les plus brefs délais.
Si le score est égal ou supérieur à 8, l'animal sera sacrifié pour des raisons éthiques et utilisé pour des analyses histologiques.

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :

- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.



E- La recherche en vue de la conservation des espèces.



F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.



G - Les enquêtes médico-légales.



4.2 Nombre de procédures expérimentales :

1

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

Création d'un défaut osseux au niveau de la calvaria et traitement par des procédures d'ingénierie tissulaire osseuse

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure sert à créer 2 défauts au niveau de la calvaria (os du crâne) des animaux afin de les traiter ensuite par des procédures d'ingénierie tissulaire osseuse et de quantifier la repousse osseuse selon les procédures mises en place. Cette étape est essentielle pour déterminer l'approche la mieux adaptée pour prendre en charge des pertes osseuses chez l'homme.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Les animaux sont répartis par groupes de 6. En effet, 6 défauts sont réalisés par groupe d'étude et un même rat (qui aura 2 défauts) sera traité par 2 procédures différentes afin de répartir les procédures dans différents rats et de limiter les impacts d'une perte de l'animal si son sacrifice s'avère nécessaire (en cas de douleur au delà du point limite précédemment décrit. 4 lots de 6 rats, à raison de 2 défauts par rat – donc 8 techniques d'ITO testées. 6 défauts par techniques permettent des résultats statistiquement valables.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?



précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?



précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?



précisez les animaux concernés :

4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

- légère
 modérée
 sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ? Ooui Onon

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ? Ooui Onon

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

ANNEXE V : Dossier de saisine

**Etude de différentes procédures d'ingénierie tissulaire osseuse sur
le modèle de défaut critique de calvaria chez le rat**

DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ..., aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

Étude de différentes procédures d'ingénierie tissulaire osseuse sur le modèle de défaut critique de calvaria chez le rat.

1.2. Durée du projet :

5 ans

1.3. Date prévue de début du projet :

1 novembre 2014

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

Les fentes labio-maxillo-palatines représentent la malformation faciale la plus fréquente (1/700 naissances). Une des étapes essentielles dans la prise en charge est la greffe osseuse qui améliore les conditions de l'éruption dentaire et la croissance faciale. Cette intervention requiert la mise en place d'un greffon osseux autologue. Ce prélèvement peut être responsable de douleurs post-opératoires et constitue une source potentielle de complication (cicatrice et infection).

De nombreuses équipes tentent de trouver une alternative efficace à la greffe

osseuse. Ainsi les céramiques phosphocalciques peuvent constituer une alternative intéressante lorsque le site receveur est sain. Cependant les faibles capacités de cicatrisation de l'os hypotrophique (cicatriciel, hypoplasique ou irradié) ne donnent pas de bons résultats avec ces biomatériaux. Dans le but d'améliorer la cicatrisation osseuse, les procédures d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) permettent d'associer les biomatériaux avec une source cellulaire ostéogénique.

Un des modèles classiquement utilisés pour étudier la régénération osseuse est celui des défauts osseux de calvaria sur des rongeurs. Les travaux précédemment menés, utilisant ce modèle, ont montré l'intérêt d'associer une greffe de moelle osseuse totale (MOT), à une céramique pour favoriser la repousse osseuse dans ces territoires à faible trophicité. Les résultats obtenus par cette association sont comparables à ceux obtenus par la technique de référence (greffe osseuse) sur un modèle expérimental.

Une autre source de cellules ostéogéniques est le tissu adipeux. En effet la fraction stromale du tissu adipeux (FSV) contient, comme la moelle osseuse, des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules ont montré un potentiel ostéogénique après association avec des céramiques phosphocalciques. Tout comme la MOT, l'utilisation de la FSV ne requiert qu'un seul temps opératoire. Le tissu adipeux est par ailleurs prélevable de manière peu traumatique. Toutefois, peu d'études portent sur le potentiel ostéogénique de la FSV totale (sans isolation des CSM) couplé à des biomatériaux.

En plus des différentes sources cellulaires, le mélange de cellules à différents matériaux biocompatibles ayant un potentiel ostéoconducteur émerge de nos jours comme une nouvelle stratégie de traitement.

L'étude du potentiel ostéo-inducteur de procédures d'ingénierie tissulaire associant biomatériaux et cellules progénitrices issues de la moelle osseuse ou de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux passe par une étape de preuve de concept avec des cellules humaines. Malgré le potentiel immunoprivilégié des cellules souches, il a été démontré que le système immunitaire de l'hôte va diminuer la régénération osseuse dans le cas de cellules non-autologues. Ainsi l'immunodépression des animaux par des traitements empêchant le rejet de la greffe s'avère nécessaire pour se rapprocher d'une situation clinique et favoriser la régénération du tissu osseux.

Le nombre de 6 défauts par conditions prend en compte la puissance statistique recherchée en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaires. Chaque étape de l'étude est mise en place en tenant compte du bien-être de l'animal de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son sacrifice pour analyse à la fin de l'étude, en cas de douleur des animaux malgré l'injection d'analgésique durant les semaines de l'étude, ceux-ci seront sacrifiés pour mettre fin aux douleurs et les explants seront analysés en tenant compte du délai atteint.

L'objectif final de cette étude est de montrer qu'il est possible grâce à un procédé d'ITO d'égaliser les résultats de la greffe osseuse autologue sans recours à un prélèvement osseux ou une procédure lourde d'ITO, et de réduire les contraintes imposées au patient en diminuant la morbidité de la procédure. Cette étude pré-clinique se justifie par les résultats obtenus sur les cellules souches de moelle osseuse et du tissu adipeux *in-vitro*, résultats qui montrent une capacité de différenciation de ces cellules au contact des biomatériaux vers une voie de différenciation ostéogénique. Cette étude préclinique est une étape nécessaire pour sélectionner les procédures induisant une repousse osseuse significative dans un défaut maxillo-facial.

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom : Unité Thérapeutique Expérimentale : UTE
- Numéro d'agrément : C44015
- Date de délivrance de l'agrément : renouvelée en mai 2008
- Nom et prénom du responsable : Rédini Françoise
- Adresse électronique du responsable : francoise.redini@univ-nantes.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : Yohann ALLAIN (niveau II en 2004)
- Adresse électronique de ce délégataire : Yohann.Allain@univ-nantes.fr

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

CEEA Pays de la Loire : 6

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Weiss Pierre
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : LIOAD/ U791, 1 place Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1
- Adresse électronique : pierre.weiss@univ-nantes.fr
- Téléphone : 0687741055

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : Guylène HAMERY (niveau II en 2005)
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : UTE UFR de médecine Nantes
- Adresse électronique : guylene.hamery@univ-nantes.fr ou ute@univ-nantes.fr
- Téléphone : 02.40.41.29.56

3.2. Le personnel

- Compétences des personnes participant au projet :

- la conception des procédures expérimentales et des projets ●oui ○ non
- l'application de procédures expérimentales aux animaux ●oui ○ non
- les soins aux animaux ● oui ○ non
- la mise à mort des animaux ● oui ○ non

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ? ○
- requis par la loi ? ○
- justifié du point de vue scientifique ? ●

○ Informations sur cette justification :

Une étude en calvaria sur des rats Lewis, une souche de rats syngéniques a permis de tester la faisabilité de ce modèle. Nous souhaitons maintenant comparer différentes procédures d'ingénierie tissulaire ayant prouvé leur potentiel et tester l'efficacité des cellules humaines avant une étude clinique.

3.3.4. Description du projet :

Les études seront réalisées sur des rats non consanguins (Wistar ou Sprague Dawley), issus du centre d'élevage agréé (Charles River ou Janvier). Un délai d'acclimatation d'une semaine sera respecté.

Démarche A: Evaluation et comparaison de la régénération osseuse sur un modèle de défaut osseux de calvaria : Différentes sources cellulaires seront implantées de manière extemporanée en association avec un biomatériau d'ingénierie tissulaire osseuse chez le rat.

La chirurgie sera répartie sur plusieurs jours. Pour les groupes contenant une association de biomatériau et d'une source cellulaire non cultivée, un délai de 30min d'adhérence de ces cellules au biomatériau sera respecté.

Après 7 semaines, les animaux seront euthanasiés (cf procédure expérimentale 3) et les implants seront récupérés afin d'effectuer des analyses histologiques et microscopiques du tissu formé et de la vascularisation. L'explantation des calvarias sera réalisée de manière aseptique.

Démarche B: Evaluation et comparaison de la régénération osseuse sur un modèle de défaut osseux de calvaria : Différentes sources cellulaires seront cultivées et différenciées *in-vitro* en association avec un biomatériau d'ingénierie tissulaire osseuse puis implantées chez le rat.

La procédure est la même mais vise à comparer des comblements utilisant des cellules non-cultivées vs des cellules cultivées *in vitro*. Après 7 semaines, les animaux seront euthanasiés, comme décrit plus loin, pour récupérer les implants afin d'effectuer des analyses histologiques et microscopiques du tissu formé et de la vascularisation. L'explantation des calvarias sera réalisée de manière aseptique.

OBSERVATION:

Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité thérapeutique expérimentale de la faculté de médecine de Nantes et/ou par les expérimentateurs du projet, notamment lors du gavage quotidien (cf plus bas).

SOURCES CELLULAIRES :

Cellules humaines : La moelle osseuse humaine et la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux sont récupérés à partir de déchets opératoires d'opérations humaines ayant lieu le même jour (patients informés et consentants).

Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) :

Les CSM de la moelle osseuse humaine (hCSMO) seront obtenues par culture cellulaire de moelle osseuse humaine.

Les CSM adipeuses humaines (hCSA) seront obtenues après mise en culture de FSV obtenue par digestion enzymatique d'un lipoaspirat de graisse humaine.

IMMUNOSUPPRESSION :

Les rats recevant des cellules d'origine humaine ne sont pas génétiquement modifiés pour être immuno-déprimés, une immunosuppression pharmacologique sera donc mise en place. Le modèle de rat Wistar immuno-déprimé par de l'administration *per os* de ciclosporine-A a déjà été testé ne montrant aucun effet indésirable et aucune réponse immunitaire vérifiée par sérologie sur toute la durée de l'étude.

Ainsi les rats utilisés (Wistar femelles de 300g) recevront une administration *per os* de ciclosporine-A à une dose de 15mg/kg/jour.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

7 semaines après l'implantation les animaux seront sacrifiés. Anesthésie par induction en chambre close d'isoflurane (3% d'isoflurane à un débit de 1L/min) puis injection intracardiaque d'un radio-opacifiant : le sulfate de baryum.

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

L'un des buts recherchés lors de cette étude est d'analyser la capacité de vascularisation d'un os hypotrophique lors de sa régénération par ingénierie tissulaire. Afin d'observer la microvascularisation sur la zone d'intérêt (intra-osseuse) il est nécessaire de remplir l'appareil vasculaire à l'aide d'un agent radio-opaque qui permettra l'imagerie par microscanner à rayons X de haute définition sur l'ensemble du site d'intérêt. Il est donc nécessaire d'effectuer l'injection du radio-

opacifiant sur un animal avec un système cardio-vasculaire fonctionnel afin d'atteindre les zones de microvascularisation. L'animal ne se réveillera pas à la suite de cette procédure terminale.

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Des études antérieures ont permis de démontrer que le nombre de 6 défauts par groupe permet d'obtenir une puissance statistique suffisante pour observer les différences entre les groupes. Ces études ont permis d'observer que les animaux ne montrent pas de signes de souffrance suite à la création du défaut. Seules les lésions de grattage sur la zone opérée paraissent retentir sur le bien-être des animaux. En cas de signes de démangeaisons, un antalgique (paracétamol) est administré par voie orale aux animaux concernés à raison de 0,30mg par jour de paracétamol par animal.

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Afin de développer des techniques et protocoles chirurgicaux qui seront utilisés chez l'homme, la démonstration d'une preuve de concept sur le petit animal est nécessaire afin de posséder un modèle avec une repousse osseuse orthotopique intégré.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

- Souris (*Mus musculus*)
- Rats (*Rattus norvegicus*)
- Cobayes (*Cavia porcellus*)
- Hamsters (syriens) (*Mesocricetus auratus*)
- Hamsters (chinois) (*Cricetulus griseus*)
- Gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*)
- Autres rongeurs (*Rodentia*)
- Lapins (*Oryctolagus cuniculus*)
- Chats (*Felis catus*)
- Chiens (*Canis familiaris*)
- Furets (*Mustela putorius furo*)
- Autres carnivores (*carnivora*)
- Chevaux, ânes et croisements (*Equidae*)
- Porcs (*Sus scrofa domesticus*)
- Caprins (*Capra aegagrus hircus*)
- Ovins (*Ovis aries*)
- Bovins (*Bos primigenius*)
- Prosimiens (*prosimia*)
- Ouistitis et tamarins (*par exemple, Callithrix jacchus*)
- Singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*)
- Singe rhesus (*Macaca mulatta*)

- Vervets *chlorocebus* spp. (généralement soit *pygerythrus*, soit *sabaeus*)
- Babouins (*Papio* spp.)
- Saimiris (par exemple, *Saimiri sciureus*)
- Autres espèces de primates non humains (autres espèces de *Ceboidea* et *Cercopithecoidea*)
- Singes anthropoïdes (*Hominoidea*)
- Autres mammifères (autres *Mammalia*)
- Poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*)
- Autres oiseaux (autres *Aves*)
- Reptiles (*Reptilia*)
- Grenouilles *Rana* (*Rana temporaria* et *Rana pipiens*)
- Grenouilles *Xenopus* (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*)
- Autres amphibiens (autres *Amphibia*)
- Poissons zèbres (*Danio rerio*)
- Autres poissons (autres *Pisces*)
- Céphalopodes (*Cephalopoda*)

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

Le modèle de régénération osseuse chez le rongeur est bien décrit dans la littérature. Le choix du rat permet de travailler sur des proportions convenables d'os à régénérer (plus proche de la clinique que la souris) et les outils d'analyses chez ces animaux sont très développés : scanner petit animal, anticorps disponibles contre les antigènes murins, outils de chirurgie adaptés.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? oui non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)

Animaux non domestiques non tenus en captivité

Animaux génétiquement altérés

Animaux non domestiques non tenus en captivité

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :

- Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :

- Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :

Animaux génétiquement altérés

- Animaux génétiquement modifiés oui non

Si oui :

- Création d'une lignée oui non
- Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation oui non
 - Phénotype non dommageable oui non
 - Phénotype dommageable oui non

- Souche mutante autre oui non

Si oui :

- Création d'un mutant oui non
- Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation oui non
 - Phénotype non dommageable oui non
 - Phénotype dommageable oui non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

- **Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?**

● oui ○ non

- **Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :**

2

Etablissement 1:

- **Nom :**

CHARLES RIVER LABORATORIES FRANCE

- **Adresse postale :**

69592 L'Arbresle Cedex FRANCE

- **Animaux fournis :**

Rats Wistar Han IGS – rats OFA

Etablissement 2:

- **Nom :**

JANVIER LABS

- **Adresse postale :**

CS 4105 Le Genest Saint Isle, 53941 St Berthevin Cedex FRANCE

- **Animaux fournis :**

Rats Wistar – Rats Sprague Dowley

- **Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :**

- **Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** ○ oui ● non

- **Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** ○ oui ● non

- **Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

- **Nom :**

- **Adresse postale :**

- **Animaux fournis :**

- **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

0

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

oui

non

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

27 par étude soit 72 pour 3 études avec des donneurs différents

- **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

27 rats par étude permettent de faire 9 groupes d'étude (2 défauts par rat et 6 défauts par groupe).

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

Les animaux seront utilisés après la fin de la croissance des os du crâne, à partir de 2 mois (8 semaines), afin d'avoir un os mature à régénérer.

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Les animaux utilisés sont des femelles. Ce choix permet d'éviter les rivalités de dominance que l'on observe chez les mâles et qui peuvent pousser les animaux à se battre entre eux.

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours.
La grille comportementale ci-dessous sera complétée pour chaque animal :

	0 point	1 point	2 points	3 points
Perte de poids	<5%	5-12%	13-20%	>20%
Apparence physique	normale	Peu altérée	Modérément altérée	Très altérée
Comportement	normal	Peu modifié	Modérément modifié	Très modifié
Réponses comportementales aux stimuli	normales	Peu modifiées	Modérément modifiées	Très modifiées

Si le score est supérieur ou égal à 5, ou si une démangeaison de la zone crânienne apparaît l'animal recevra un analgésique (buprénorphine 0.03mg/kg en sous-cutané). En cas d'apparition d'un de ces symptômes malgré le traitement analgésique adapté, l'animal sera retiré de l'étude et euthanasié dans les plus brefs délais et utilisé pour analyses.

Si le score est égal ou supérieur à 8, l'animal sera sacrifié pour des raisons éthiques et utilisé pour des analyses histologiques.

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :

- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;

- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;

- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.

E- La recherche en vue de la conservation des espèces.

F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.

G - Les enquêtes médico-légales.

4.2 Nombre de procédures expérimentales :

1

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

Création d'un défaut osseux au niveau de la calvaria et traitement par des procédures d'ingénierie tissulaire osseuse

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure sert à créer 2 défauts au niveau de la calvaria (os du crâne) des animaux afin de les traiter ensuite par des procédures d'ingénierie tissulaire osseuse et de quantifier la repousse osseuse et la néovascularisation selon les procédures mises en place. Cette étape est essentielle pour déterminer l'approche la mieux adaptée pour prendre en charge des pertes osseuses chez l'homme.

Sous anesthésie gazeuse (isoflurane), et après injection d'un analgésique en sous-cutané (buprénorphine), la peau de l'animal est incisée au niveau du crâne et le périoste est dégagé pour mettre à nu l'os de la calvaria. Deux trous de 5mm de diamètres sont effectués à l'aide d'une tréphine (pièce à main) en prenant soin de ne pas endommager la dure-mère. Une solution physiologique est régulièrement versée sur l'os pour hydrater la zone et réduire la formation de poussières d'os. Le comblement par ingénierie tissulaire est réalisé, un lambeau musculaire est créé pour maintenir les granules en place et la peau est suturée avec du fil résorbable.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Les animaux sont répartis par groupes de 3 ou 6. En effet, 6 défauts sont réalisés par groupe d'étude et un même rat (qui aura 2 défauts) sera traité par 2 procédures différentes afin de répartir les procédures dans différents rats et de limiter les impacts d'une perte de l'animal si son sacrifice s'avère nécessaire (en cas de douleur au-delà du point limite précédemment décrit. 3 lots de 9 rats pour permettre de comparer 9 techniques (contrôles inclus).

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Le prélèvement de la calvaria sera effectué après euthanasie de l'animal (point 3.3.3)

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Un antalgique morphinomimétique sera administré en injection sous cutané, en post-opératoire immédiat. De plus comme indiqué au paragraphe traitant du point critique (3.4.13), en fonction de l'évaluation de la douleur sur les animaux nous renouvelerons l'injection si nécessaire les jours suivants : (Buprénorphine (Buprecare ®0,3mg/ml) : 0,03ml pour kg en sous cutané), ainsi que l'administration de paracétamol par voie orale (dilué dans les biberons d'eau à raison de 0,30mg de paracétamol par jour par rat)

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

Les analyses histologiques et histomorphométriques nécessaires à l'étude seront réalisées après prélèvement de la calvaria et donc euthanasie de tous animaux.

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

Administration orale d'un immunosuppresseur : la ciclosporine A

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure permet l'injection de cellules humaines dans un modèle de rat immunocompétent sans obtenir de réponse immunitaire entraînant une situation de rejet de greffe.

La ciclosporine A est administrée par voie orale par gavage à la dose de 15 mg/kg/j à l'aide d'une solution diluée à 15 mg/ml. Cette solution a été reconstituée à partir d'une solution buvable à 100 mg/ml (Néoral, Novartis Pharma, Basel, Suisse) et diluée dans l'huile d'olive afin d'obtenir la concentration souhaitée. Sur des rats de 300g, la quantité administrée ne dépasse donc pas les 0.3mL.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Les 3 lots de 9 rats (permettant d'analyse de 9 procédures différentes contrôle et traitement de référence inclus) seront traités tous les jours par le traitement immunosuppresseur pour ne pas induire de biais entre le contrôle ne recevant pas de cellules humaines et les autres groupes expérimentaux.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Le « gavage » sera effectué avec une canule adaptée et un manipulateur maîtrisant la technique et aucune douleur n'est prévue lors de cette procédure. Comme indiqué au paragraphe traitant du point critique (3.4.13), en fonction de l'évaluation de la douleur sur les animaux nous effectuerons l'administration de paracétamol par voie orale (dilué dans les biberons d'eau à raison de 0,30mg de paracétamol par jour par rat).

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

Les analyses histologiques nécessaires à l'étude seront réalisées après prélèvement de la calvaria et donc euthanasie de tous animaux.

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 3 :

Injection intra-cardiaque d'un radio-opacifiant lors de l'euthanasie des rats pour analyse par microscopie à rayons X.

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère

- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Cette procédure terminale est prévue comme expliquée dans le point 3.4.4 afin de permettre l'analyse de la microvascularisation osseuse sur le site de la calvaria que l'on cherche à régénérer.

Après induction d'une anesthésie gazeuse par isoflurane (5% à 3L/min) les animaux sont maintenus sous masques (isoflurane 2% à 1L/min).

Après l'ouverture de la cavité abdominale, une thoracotomie est réalisée. Un cathéter est ensuite planté et collé au niveau de la pointe du ventricule gauche. Le cathéter est ensuite relié au travers d'une pompe péristaltique à un récipient contenant le produit de contraste chaud (50% Sulfate de baryum (Micropaque)-1,5% de gélatine- PBS). Après section de l'oreillette droite, jusqu'à 200 ml de produit de contraste sont injectés dans la circulation sanguine jusqu'à blanchissement des extrémités des animaux.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Tous les animaux des groupes précédemment décrits subiront cette procédure lors de leur euthanasie (8 semaines après la création/comblement des défauts de calvaria).

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Le prélèvement de la calvaria sera effectué après euthanasie de l'animal (point 3.3.3)

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Cette procédure sera effectuée sous anesthésie des animaux par isoflurane. L'animal sera endormi et euthanasié par la procédure et donc aucune douleur intégrée n'est prévue étant donné que l'animal ne se réveillera pas.

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ? ■

précisez les animaux concernés :

Les analyses histologiques et histomorphométriques nécessaires à l'étude seront réalisées après prélèvement de la calvaria et donc euthanasie de tous animaux.

- animal gardé en vie ? □

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ? □

précisez les animaux concernés :

4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

- légère
 modérée
 sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ? Ooui Onon

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ? Ooui Onon

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements

Vincent Hivernaud, Bruno Lefourn, Jérôme Guicheux, Pierre Weiss, Franck Festy, Anne-Claire Girard & Regis Roche

Aesthetic Plastic Surgery

ISSN 0364-216X

Aesth Plast Surg

DOI 10.1007/s00266-015-0503-y



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media New York and International Society of Aesthetic Plastic Surgery. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Autologous Fat Grafting in the Breast: Critical Points and Technique Improvements

Vincent Hivernaud^{1,2,3} · Bruno Lefourn⁵ · Jérôme Guicheux^{2,3,4} · Pierre Weiss^{2,3,4} · Franck Festy¹ · Anne-Claire Girard¹ · Regis Roche¹



Received: 2 February 2015 / Accepted: 12 May 2015

© Springer Science+Business Media New York and International Society of Aesthetic Plastic Surgery 2015

Abstract

Background Breast augmentation or reconstruction is a major challenge in esthetic and reconstructive surgery. While autologous fat grafting (AFG) provides a natural filler and seems easy to harvest, AFG in breast surgery is still problematic especially due to the high resorption rate associated with megavolume transfer. Despite this pending issue, there is growing interest in this method, which is becoming more and more widespread, as can be seen by the recent increase in the number of clinical studies. This review aims to highlight recent knowledge in the technique of AFG to the breast and recent refined procedures to improve fat viability and long-term success of the graft.

Methods Clinical publications and trials of AFG to the breast from the past 5 years were examined. Attention was focused on the different AFG steps and the clinical outcomes, in order to highlight the strengths and weaknesses of the available protocols.

Results Recent studies have concentrated on new techniques to improve fat viability and graft intake. However, all of these studies use different protocols at each step of the procedure. Furthermore, results may vary depending on the technique used for fat harvesting and processing.

Conclusion This review points out the recent advances in breast AFG techniques and their associated outcomes and complications. The bibliography has been carefully examined to reach a consensus so that recommendations could be made for each step of the technique with the aim of improving graft viability and long-term volume maintenance.

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

Keywords Lipotransfer · Autologous fat grafting · Breast surgery · Protocols improvement

Anne-Claire Girard and Regis Roche have contributed equally.

✉ Vincent Hivernaud
vincent.hivernaud@hotmail.fr;
vincent.hivernaud@univ-nantes.fr

- ¹ STEMCIS, Plateforme CYROI, Sainte Clotilde, Ile de la Réunion, France
- ² Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
- ³ INSERM, UMRS 791, LIOAD, Nantes Cedex 1, France
- ⁴ CHU Nantes, Pole Hospitalo-universitaire 4 OTONN, Nantes Cedex 1, France
- ⁵ Département de Chirurgie Plastique et Reconstructive, Clinique Bretéché, Nantes Cedex 1, France

Introduction

According to the International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS) [1] breast augmentation and reconstruction represented around 20 % of plastic surgery procedures carried out in 2011. Surgical implants are predominantly used. However, prosthetic breast reconstruction is not without risk, since many cases of leakage or rupture, displacement, infection, and capsular contracture have been reviewed [2, 3]. Moreover, even if implants may last for many years, some of them need to be revised or replaced and they might present sometime complications such as capsular contracture.

An alternative is to use natural fillers for breast reconstruction. By utilizing natural fillers, surgeons use tissue from the patient, such as a flap taken from somewhere in the body and transferred to the breast. The flap can be musculocutaneous (dorsal, abdominal, or transversal) or adipo-cutaneous (DIEP). Finally, subcutaneous adipose tissue alone can be harvested via lipoaspiration and used as a natural filler in autologous fat grafting (AFG), alone or in combination with a flap.

AFG is a safe and easily adjustable technique that results in natural filling of the breast. Even if AFG use is rapidly expanding, the question about its legitimacy continues to be raised because of its main limits: the low rate of long-term graft maintenance [4] and the formation of oil cysts.

It is a fact that the results obtained with the AFG procedure are highly dependent upon the protocol and the experience of the surgeon [5], with these two parameters influencing cell death and resorption. Fortunately, an increasing number of studies and clinical trials are aiming to develop new techniques that limit graft resorption, leading to improvements in AFG efficiency.

The aim of this review is to discuss the pros and cons of AFG to the breast and to outline the different studies and procedures available, in order that recommendations can be made so that the procedures can be optimized to obtain long-lasting results.

Autologous Fat Grafting to the Breast: « The Pros and Cons »

Subcutaneous white adipose tissue is composed of two cell fractions: the adipocyte fraction providing fat volume [6] and the stromal vascular fraction (SVF) that contains numerous cell types (endothelial cells, pericytes, stromal cells, and hematopoietic cells) [7]. It is now widely accepted that these two fractions are critical for graft survival, with the efficacy of AFG being dependent upon their viability.

One of the major strengths of AFG to the breast compared to implant-based reconstruction is the natural aspect and palpation that it gives to the breast. AFG combined with liposuction can provide an esthetically pleasing result for the patient and is easy to perform by surgeons with minimal invasiveness. Another important point is that AFG to the breast gives an unlimited time effect, whereas a prosthesis usually needs to be replaced and does not age with the patient. Finally, the SVF of adipose tissue is a great source of mesenchymal stem cells (MSC), the reason for the increased interest in this tissue over the last decade. With advances in our knowledge of the SVF and cell-assisted lipotransfer, the trophic effect of stromal/stem cells on scars and irradiated zones, as well as the beneficial effects on angiogenesis and skin rejuvenation have been demonstrated. These effects can probably be linked to

growth factor secretion by adipose stromal cells (ASC) [8] as well as their ability to differentiate into multiple lineages [9].

Nevertheless, AFG to the breast is also associated with limits and complications. Complications will depend upon the experience of the surgeon and the AFG protocol that is used. In 2013 Leopardi et al. [4] and Largo et al. [10] reviewed previous studies on breast AFG, focusing on the complications that were encountered. With regard to fat injection, the possible complications are: fat necrosis, oil cyst formation, and calcification. These are frequently reported and are not dependent upon the protocol used. Liponecrosis is believed to be caused when an excess of fat is injected, inhibiting the complete vascularization of the graft and causing cell death due to ischemia and nutrient deprivation. Cyst formation is often minor and can be easily detected by palpation or imaging. Of the minor complications, inflammation, striae, bruising, or superficial infections can occur.

One limitation of AFG to the breast comes with the patient morphology. For some patients, large volumes of fat for grafting cannot be harvested (at least not in a single operation without risking deformities of the donor site) especially for Cell-Assisted Lipotransfer (see the dedicated paragraph).

In recent years, a major concern as far as AFG to the breast is concerned, was the possible mammographic interference with cancer diagnosis due to tissue calcification [11]. However, in the 2013 study by Rubin et al, mammographic changes after AFG were less important than those following breast reduction, a commonly accepted procedure [12]. Therefore, care should be taken when analyzing mammographic images following AFG, with a high level of experience required to discern benign calcification from oncological dangers.

The two main remaining issues concerning AFG to the breast are the questions of the possible pro-cancerous role of injected adipose tissue (discussed in the safety paragraph) and the high resorption rate in the months following injection.

The principal limit of this technique addressed in this review is the low maintenance volume due to the use of large volumes of fat [13–15]. The efficacy is estimated to be approximately 50 % with nearly all techniques (Table 1). Most of the resorption occurs in the 3–6 months following adipose tissue injection. Nevertheless, it should be noted that many protocols have been developed since Coleman's LipoStructure[®], enhancing our knowledge concerning fat processing prior to grafting.

To summarize, AFG to the breast is an extremely promising technique with few complications, but protocol improvements are still required in order to offer the best possible outcome with enhanced fat maintenance.

Table 1 Recent studies concerning Autologous Fat Grafting to the breast, showing the protocols used and the mid/long-term outcomes following surgery

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Canmulla	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Yoshimura et al. [25]	Cell-assisted lipotransfer	40	-	Saline solution with epinephrine 0.001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Group A & B: wash + decantation Group C: 700 g 3 min Half of the collected tissue is used for SVF isolation	Group A&C: SVF is mixed with fat Group B: SVF is injected separately	Gradual resorption in the first 2 months More natural than implant	At 6 months 1 case in group B: fibrous breast tissue and fibrosis on the sternum At 24 months Cysts (2) Microcalcification (2)
Zocchi et al. [26]	Breast AFG protocol	181	BRAVA	Saline solution with adrenaline 2 mg/L	Teflon-coated 2 mm	60-cc syringe with controlled depression	Decantation on a vibration table	2-mm cannula Manual reshaping	Average persistent volume at 1 year: 55 %	At 8 years Less than 4 % of liponecrosis, microcyst and microcalcifications
Delay et al. [27]	Author's experience	880	3D morphological study in some cases	-	Blunt 4 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3200 rpm for 3 min	Overcorrection (140 %)	Gradual resorption in the first 3-4 months (30-40 %) Volume stable at least 5-6 years	Oily cysts 15 % 1 infection Fat necrosis in 3 %
Illouz et al. [28]	Author's experience	820	-	Saline solution with adrenaline 1:500 000	-	Syringe	Decantation	2.5-mm cannula	-	Echymosis (76) Striae (36) Hematomas (12) Infections (5)
Panettiere et al. [29]	AFG in irradiated reconstructed breast	61	-	Saline solution with lidocaine 0.5 % and epinephrine 1:200,000	1 hole bullet tip 3 mm	10-cc syringe	Wash with saline solution and decantation	14G needle and overcorrection (10-15 %) Multiple injection sessions	Best esthetic outcome with lipotransfer at 3 months Functional improvement after 3 months with lipotransfer	No complications at 3 months
Rigotti et al. [18]	Compare incidence of local and regional recurrence of breast cancer before and after AFG	137	-	Cold saline solution with epinephrine 1:400,000 and 0.02 % lidocaine	Coleman's instrumentation	-	Centrifugation at 3000 rpm	2-cc syringe	Statistically not more recurrence since the utilization of lipotransfer	-

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Ueberreiter et al. [30]	AFG protocol	85	–	Saline solution with lidocaine 0.05 %, adrenaline 1 mg/L and sodium bicarbonate 0.105 % Infiltration and aspiration are simultaneous	3.8 mm with 0.9 mm apertures	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Fat trap and decantation in injection syringe	10-cc syringe	Approximately 50 % of injected volume at 6 months	2 subcutaneous granuloma
Yoshimura et al. [31]	Cell-Assisted Lipotransfer	15	–	Saline solution with epinephrine 0.0001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Centrifugation 700 g for 3 min Half of the collected tissue is used for SVF isolation	10- or 20-cc syringe with 16 or 18G needle	Graft survival ranged from 40 to 80 %	At 1 year no cyst formation (>5 mm) or microcalcifications were detected (n = 8)
Caviggioli et al. [32]	AFG in post-mastectomy pain syndrome (PMPS)	63 + 35	Skin expander and silicone prosthesis	Coleman's technique	–	–	Centrifugation 3000 rpm for 5 min	18G needle	Pain decrease in AFG group compared to control group	–
Del Vecchio et al. [33]	Use of BRAVA and breast AFG	25	BRAVA	–	–	–	Centrifugation from 20 to 40 g	BRAVA for 2–4 weeks	64 % tissue yield at 6-month for 12 patients	At 6 months no oil cysts, fat necrosis, or breast masses
Kamakura et al. [34]	Cell-Assisted Lipotransfer	20	–	Saline solution with 1 % lidocaine and epinephrine	3 mm three-hole blunt	–	Half of the collected tissue is washed and gravity filtered The other half is used for SVF isolation	Thumb-brush syringe adapter	Physician satisfaction (69 %) and patient satisfaction (75 %) at 9 months	At 9 months liponecrotic cyst (11 %)
Salgarello et al. [35]	AFG with Platelet-Rich Plasma	10 + 25	–	Saline solution with Xylocaine 2 % and epinephrine 1:500,000	Inner diameter 3 mm 2 holes blunt	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min 1- or 3-cc syringes with 2.7-cc fat/0.3-cc PRP 10 % in group A and with 0.9-cc fat/0.09-cc saline solution in group B	Injection with a 17G single-hole blunt cannula	No significant differences between the AFG with or without PRP in terms of outcomes, complications or session number	Fat necrosis (7 per group): Oil cyst (4 per group) Complex cystic images (4 per group)
Cigna et al. [36]	Secondary AFG after implant reconstruction	20	Breast implant	Anesthetic solution	3 mm	10-cc syringe	Centrifugation at 3000 rpm for 3 min	1 and 2.5-cc syringes overcorrection 20–25 %	Improvement of cosmetic outcomes	At 1-year Fat necrosis (1)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Gentile et al. [37]	AFG enhanced by stromal vascular fraction (CAL) and PRP	10 + 13 + 10	-	Cold saline solution with adrenaline 0.2 %	3 mm	60-cc syringe	Centrifugation at 3000 rpm Group PRP: 1-cc fat with 0.4-cc PRP Group eSVF: half of the collected tissue is used for SVF isolation Group control: Coleman's procedure	1-2-mm cannulas Specific microcannulas for eSVF group	Volume maintenance at 18 months: 65 % for PRP group, 61 % for SVF group and 30 % for control group	Small cystic formation and microcalcification (1)
Khoury et al. [38]	Use of BRAVA and breast AFG	81	BRAVA	-	2.7 mm 12 holes	Constant 300 mmHg syringe pulling	Centrifugation in bags 15 g for 3 min	2-5-cc syringe and 2.4 mm single-sidehole Wear of BRAVA after operation	90-78 % graft survival depending on the injected volume	At 1-year Calcifications (16 %)
Pérez-Cano et al. [39]	Cell-Assisted Lipotransfer	71	-	Tumescent solution	-	Syringe	Wash with saline solution and decantation Half of the collected tissue is used for SVF isolation	Thumb-controlled syringe adapter	Statistical improvement in the LENT-SOMA score	Injection site cysts (14.9 %) At 12-month Small cysts (46 patients)
Petit et al. [16]	Locoregional recurrence after AFG	321	-	Different protocols	-	-	-	-	No difference in locoregional recurrence between AFG and control except for patient with intraepithelial neoplasia	-
Rubin et al. [12]	Compare mammographic changes after AFG versus Breast reduction	27	-	Saline solution with epinephrine 0.001 %	Inner diameter 2.5 mm	Liposuction device	Half of the collected tissue is used for SVF isolation	-	No difference in abnormality rates for cyst and calcification More scarring and masses requiring biopsy in the breast reduction group	At 12 months Oil cysts 55 (25.5 %) Scarring 38 (17.6 %) Calcifications, benign/fat necrosis 37 (17.1 %) Calcifications warranting biopsy 10 (4.6 %) Mass or distortion warranting biopsy 6 (2.8 %)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Auclair et al. [40]	Composite breast augmentation	197	Breast implant BRAVA for revision augmentation	Tumescent solution	1.5 mm for fat overlay 12 holes and 3.5–4 mm for submuscular primary augmentation and revision augmentation	Syringe for fat overlay and liposuction device for other	Centrifugation (Coleman for fat overlay or low G-Force)	14G side hole blunt cannula	Average volume maintenance of 57 % in 20 patients at 1 year	At 1-year cystic mass (2)
Bonomi et al. [41]	Immediate and delayed reconstructive surgery	31	Latissimus dorsi (LD) flap and/or implant-based reconstruction	Saline solution with marcaine 0.25 % and adrenaline 1:200,000	3 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	2-mm cannula 30 % overcorrection	Patient satisfaction (29 patients rated good or above)	Fat necrosis (2) oil cysts (1) cancer recurrence (1 at 4 years)
Costantini et al. [42]	Radiological evaluation of breast AFG	24	-	Saline solution with epinephrine 1:500,000	-	Syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	17G blunt cannula	AFG do not interfere with early diagnosis Ultrasounds are best for identification of oil cyst and MRI for fat necrosis	At 1 year, benign calcifications (3) Simple cysts (6) Oil cysts (23) Liponecrosis (8) Benign nodules (2) Cancer recurrence (1)
Fiaschetti et al. [43]	Imaging evaluation after AFG + PRP	15	-	Klein solution	-	-	Centrifugation 3000 rpm for 4 min Mix with PRP	Coleman microcannula	MRI allows a good volume estimate. At 6 months there is a 15.36 % or resorption and 28.23 % at 12 months	At 12 months by ultrasound: oil cyst (45.83 %) cytosteatonecrotic areas (12.5 %) by MRI: oil cyst (4.17 %) cytosteatonecrotic areas (16.67 %) by mammography: microcalcifications (20.83 %)
Hoppe et al. [44]	AFG protocol	28	-	Saline solution with lidocaine 0.05 %, adrenaline 1 mg/L and sodium bicarbonate 0.105 % Infiltration and aspiration are simultaneous	-	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Decantation in 50-cc syringes for 5–10 min	10-cc syringes	Generally 4–6 procedures, irradiated patients needed a higher amount of fat. 68 % good or excellent results.	At 6 months, liponecrosis (2.59 %), infection (0.74 %) and granuloma (0.74 %)

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Peltoniemi et al. [45]	Comparison of CAL versus conventional AFG	10 + 8	-	Saline solution containing 1-cc epinephrine 1:1000, 12.5-cc sodium bicarbonate 8 mval and 500 mg lidocaine each 1000-cc saline 0.9 %	3.8 mm	Continuous water jet and 0.5 bar negative pressure	Decantation in fat trap. For CAL, half the harvested tissue is used for SVF isolation	10-cc syringes and controlled injector	54 % (AFG) and 50 % (AGF + CAL) volume survival measured by MRI. No significant volume benefit with CAL	At 6 months, no complications but late, oil cysts (1 in each group)
Petit et al. [17]	Safety of AFG in patients with intra epithelial neoplasia	59 + 118	-	Coleman's technique					A significant increase of local events after AFG in patients with intraepithelial neoplasia	At 5 years Local event incidence (18 % in AFG group and 3 % in control group)
Khourri et al. [46]	Use of BRAVA and breast AFG	476	BRAVA	-	12 holes, 2.7 mm	300 mmHg syringe	Centrifugation in bags 15 × g for 2 min	2.4 mm single-hole cannula	After 6 months or more, 79.8 % graft retention	Fat necrosis (19) Small palpable nodules (15 %) Minor infection (7) Pneumothorax (1)
Maione et al. [47]	AFG in post-mastectomy pain syndrome (PMPS)	57 + 35	Conservative breast surgery and radiotherapy	Coleman's technique			Centrifugation 3000 rpm for 5 min	18G angiography needle	AFG significantly decreased pain in patients with PMPS following lumpectomy and radiotherapy	-
Mestak et al. [82]	PureGraft vs Centrifugation for breast AFG	15 + 15	-	Saline solution with 1 % adrenaline	3-mm Mercedes cannula	60-cc syringe	Filtration in Puregraft with two washes in Ringer for one group Centrifugation 3000 rpm, 3 min for the other group	9 cm type III Coleman cannula	After 1 year, patient satisfaction is the same in the two groups	Infection (1) Solitary cysts (3)
Small et al. [48]	Investigate donor site for breast AFG	46 + 27	-	Tumescent solution with lidocaine 4:10 000 and epinephrine 1:1000000	3-4 mm	10-cc syringe	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	3-cc syringes	45 % retention at 140 days and no difference between graft from abdomen or from thighs	-

Table 1 continued

Study	Purpose/context	Number of patients	Breast preparation	Infiltration method	Cannula	Aspiration method	Processing of the fat	Reinjection	Outcomes	Complications associated with AFG
Spear et al. [15]	Breast AFG	10	-	-	3 mm	Liposuction device (500–600 mmHg)	Centrifugation 3000 rpm for 3 min	blunt cannula	Volume retention at 1 year 36 % for the right breast and 39.2 % for the left breast	Fat necrosis
Uda et al. [49]	Use of BRAVA and breast AFG	14	BRAVA	Tumescent solution	3 mm	Liposuction aspirator (<350 mmHg)	Centrifugation 1200×g for 3 min	Blunt Coleman's cannula connected to 2.5-cc syringes Wear of BRAVA after operation	Better results in non-irradiated breasts	Fat lysis (1) Cellulitis (1) Cysts (5) Calcification (1)

Safety Concerns About AFG to the Breast

Even though breast autologous fat grafts are used worldwide, there is concern about the interaction between stem cells contained in the grafted adipose tissue and any possible residual cancerous cells from a mastectomy procedure. This debate on the role of stem cells in the fat transfer is of further concern when considering cell-assisted lipotransfer and the supra-physiological concentration of stem cells associated with this procedure.

There are numerous in vitro and in vivo models available to investigate the possible pro-cancerous role of fat injection; however, these models do not accurately simulate clinical results while often giving contradictory results [16–19]. There is currently a lack of large controlled studies with long-term follow-up to study this issue leaving the topic understudied. Several individual cases have been reported in which adipose tissue injection led to increased tumor growth and even cancer relapse [20, 21]. The mechanisms involved in these phenomena remain to be identified, but may be cancer dependent such as patients with intraepithelial neoplasia or other undetermined factors.

Despite these concerns, in 2012, the ASPS Fat Graft Task Force did not find “any reports suggesting an increased risk of malignancy associated with fat grafting” and so far, clinical reviews have not revealed any increased cancerous relapse when using AFG to the breast [18, 22, 23].

Recent Studies

AFG to the breast is of great interest in breast surgery with 12 clinical studies currently registered on the clinical-trial.gov website (research that contains the key words “fat graft”, “fat grafting”, “adipose tissue injection”) [24].

In addition to these clinical trials, Table 1 resumes clinical studies published on breast AFG in the last 5 years.

This table highlights the main issue with breast AFG, which is the high resorption rate of the graft in the months following injection: 15–40 and 20–55 % resorption at 3 and 6 months, respectively (Table 1).

The table also demonstrates that currently, several different protocols are being used by surgeons. This demonstrates the complexity that surrounds adipose tissue handling in AFG and makes it difficult to compare the outcomes.

Moreover, one of the most striking observations is that despite the deleterious effect of high-speed centrifugation being demonstrated, over the past years, 17 studies have used centrifugation steps equal or above 700×g. This underlines the importance of determining a clear protocol for the purification of fat prior to reinjection.

A further piece of information that is highlighted by this table is that it now seems to be commonly accepted that microinjection of small lipid aliquots is employed in order to enhance fat revascularization upon reinjection.

Finally, the most recent breast AFG studies highlight the growing interest in enhancing harvested fat with a graft supplement (with SVF or platelet-rich plasma: PRP).

Processing of Adipose Tissue

Lipotransfer can be divided into four steps: infiltration, lipoaspiration, fat processing, and injection. Although numerous protocols are currently used in clinics for all of these steps, several studies compared the different methods with the common aim of reducing fat resorption [52–57].

Infiltration

Lipoaspiration can be carried out while simultaneously or previously injecting a physiological solution (wet lipoaspiration). Dry lipoaspiration, without infiltration, is no longer used for AFG because of the amount of associated blood loss [50]. The standard ratio for infiltration is commonly 1-cc infiltrated for 1 cc of fat tissue removed, but a higher ratio can be used with tumescent lipoaspiration techniques. The infiltration solution can contain local anesthetic (to avoid peri- and post-operative pain) and vasoconstrictor drugs (adrenaline) to prevent bleeding. Although adrenaline has been proven harmless at low doses, the use of local anesthetic (e.g., lidocaine) is still an issue. Indeed, these drugs have a cytotoxic effect on ASC or can affect their metabolism. Therefore, these drugs must be used at an appropriate concentration to prevent any damage to the tissue [51, 52]. Their use increases the importance of tissue washing prior to reinjection in order to avoid any prolonged contact.

Lipoaspiration

Harvesting Site

As far as fat viability and graft outcome are concerned, several studies have been unable to demonstrate a significant difference between harvesting sites [48, 53, 54]. Furthermore, the most common source for the harvesting of fat grafts is the abdomen [11].

Cannulae

In 2009 Erdim et al. evaluated the influence of cannula size and showed that a cannula that is too small could damage the tissue [55]. The inner diameter of the cannula varies

between 2 and 4 mm, with the choice of cannula dependent upon the surgeon carrying out the technique (Table 1). Aside from the cannula size, the number and the size of the holes in the cannula is important. In fact a higher number of holes will enable faster fat harvesting with a concomitant reduction in depression pressure [56, 57]. The diameter of the holes will also affect the size of the harvested lobules, with smaller lobules supposedly being more viable, thus making revascularization easier [56].

Aspiration

The lipoaspiration cannula can either be connected to a syringe, so that aspiration can be carried out manually, or be power assisted. In all cases, the negative pressure caused by aspiration is a critical factor in graft survival [58]. Indeed, in 2001, Shiffman demonstrated that a depression of over 700 mmHg (by manual or by power-assisted liposuction) should not be used for lipotransfer [59]. Cheriyan obtained the same conclusion comparing –250 and –760 mmHg pressures [60]. A questionnaire was sent to the members of the American Society of Plastic Surgeons in 2013, with 55 % of the responders using manual suction instead of other techniques [11].

Pulling of the plunger should be carried out with caution because it will determine the negative pressure inflicted on the tissue [61]. With this in mind, special syringes with a controlled plunger can be used (e.g., Macrofill by Adip's-culpt). In any case, manual or power-assisted systems that enable the control of negative pressure (e.g., K-VAC Syringe by Lipocosm) are preferable.

A further factor that has given contradictory results is the effects of direct exposure to air [62]. Further data should be obtained to determine if non-closed systems should be avoided or not.

In addition to assisted aspiration, several other technological advances have been developed in an attempt to improve the quantity and the quality of harvested fat. Water-assisted lipoaspiration (WAL) uses continuous infiltration that enables “pre-dissection” of the tissue prior to its aspiration (e.g., BodyJet by human med) [30, 44] but this also results in a greater residual interstitial liquid phase.

Some devices also improve the speed of aspiration by making the cannula vibrate during the aspiration process (e.g., PAL by microaire). This technique allows easier and faster aspiration with less effort. However, even if it is possible to regulate the intensity of the cannula vibration, this technique might be more suited to performing high volume liposuction rather than lipotransfer due to the damage done to the harvested tissue with the vibrating cannula.

Purification

The purification step aims to remove the interstitial liquid whilst at the same time ensuring the viability of the graft cells. The two main purification protocols that are mostly used nowadays are decantation and centrifugation. In 2013, 45 % of surgeons used a decantation process and 34 % used centrifugation to purify the graft before AFG to the breast [11].

Decantation

The decantation process is easy to perform and does not necessarily require any additional devices. It can be performed directly in syringes or in a special device designed to trap the fat tissue and to isolate the liquid fraction (e.g., Lipocollector by human med; Tissu-Trans Filtron by Shippert Medical). Even if it is probably the cheapest and easiest to use for surgeons, the main limit of this process is that a significant fraction of liquid will still be trapped in the adipose fraction and will be the first to be reabsorbed after reinjection [30]. The remaining infiltration liquid can also be responsible for a higher concentration of pro-inflammatory cytokines secreted by the adipose tissue during aspiration. This may trigger inflammation at the recipient site, with recruitment of immune cells that can eventually lead to increased graft resorption [63].

Centrifugation

Due to this limitation in the decantation process, since the 1990s the lipoaspirate can also be centrifuged to remove the liquid fraction and improve graft uptake [11, 62, 64, 65]. Moreover, in 2010, Condé-Green found a greater concentration of ASC in the centrifuged fat than with the decantation method alone [61]. However, this step requires a centrifuge and probably more time to carry out than simple decantation. Since Coleman described the purification step with 3 min of centrifugation at 3000 rpm (rarely mentioned but corresponding to 900–1200 g, depending upon the rotor used), many studies have investigated the role of centrifugation (speed and time) on the viability and the maintenance of the reinjected tissue [61, 63, 65–67]. Caution must be taken with this centrifugation step to preserve the integrity of the adipose tissue. Indeed, the centrifugation speed is correlated with fat tissue compaction but also with the release of oil due to the death of adipocytes. A balance must then be found between interstitial liquid removal and adipose tissue damage. Tissue damage can lead to an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) or Interleukin 6 (IL6) [63]. Hoareau and Kurita have both shown a decrease in survival with

centrifugation forces higher than $400\times g$ for 1 min [63, 67]. However, there are some protocols at the moment that still use a centrifugation step of 3 min or more at 3000 rpm. On the other hand, some protocols use one or several low speed/time centrifugation(s) [66, 68]. There are some new protocols that use a similar approach to reduce or limit damage to the tissue through the use of manual centrifugation ($15\times g$). There is however little data in the literature to make conclusions regarding such a method.

Alternative Processes

The aim of the filtration method is the same as that of the decantation or centrifugation methods: removal of the liquid fraction to purify the fat before reinjection. It is accomplished by passing the lipoaspirate through a filter (e.g., PureGraft by Cytori or Lipivage by Genesis Biosystem) to remove particles below the chosen size. In 2013, Zhu found less oil and greater viability with this system compared to high-speed centrifugation [69].

Some protocols also integrate additional washing steps (e.g., Macrofill by Adip'sculpt; PureGraft by Cytori) that aim to remove the remaining infiltration solution [61, 69, 70], to get rid of most of the local anesthetic, vasoconstrictors, inflammatory molecules, and death factors (released during liposuction) that may damage the tissue and limit graft success [51, 63]. In 2013, only 28 % of surgeons were using a washing step with breast AFG [11].

Reinjection

The final step of AFG is the reinjection of the adipose tissue. This step usually requires the use of different sized syringes (from 1 cc to 50 cc) depending on the quantity of adipose tissue to graft. The injection is carried out with a retrograde movement that deposits a small amount of fat tissue in multiple directions via microtunneling at the recipient site. If the graft deposit is too large it will take longer for vascularization to reach the center of the graft, resulting in fat necrosis (Fig. 1).

Therefore, the injection of small aliquots of fat is now commonly accepted, with a cannula of 2 mm being preferred for fat reinjection (Table 1). Surgeons usually graft in all tissue planes (except glandular areas) [56]. No consensus is available however on whether a particular grafting zone is preferable even though muscular zones are more vascularized and could thus prove to be good recipients.

To protect the injected tissue from injection-related shear stress, automated devices have been developed. These devices aim to inject the fat with rigorous continuous pressure. Control of the injection (with an adipose tissue injector) was shown to improve in vivo fat retention in a

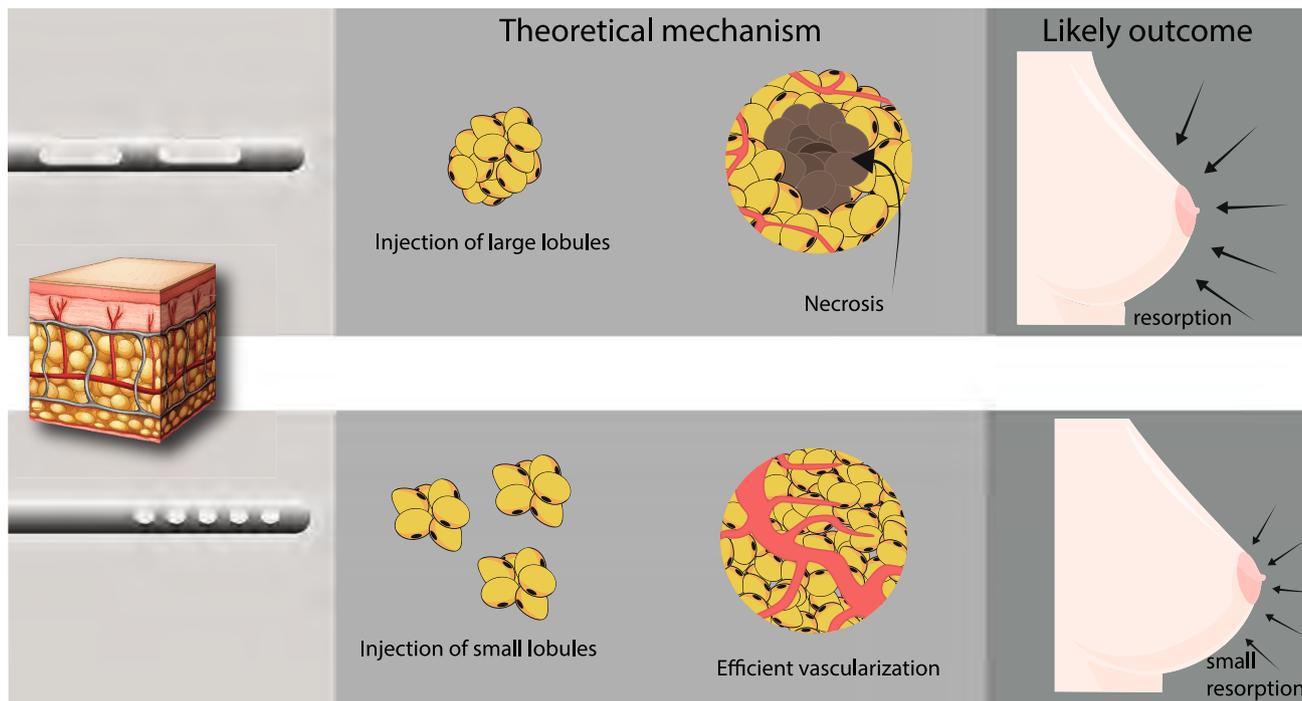


Fig. 1 Injection of small lobules of fat enhances revascularization of the graft and long-term survival

nude mouse model compared to a modified Coleman's method following simple decantation [71].

Finally, care must be taken not to overgraft in the breast. Faced with resorption, many surgeons try to overcome this limit by “overcorrection” of the recipient site. However, exceeding breast volume might lead to an inverse effect with increased graft pressure resulting in tissue damage [27, 56].

More Complex Protocols

In the last five years, a new approach has been developed to improve fat grafting through the addition of stem cells or growth factors [25, 31, 34, 35, 37, 39]. In all of these protocols, whether the addition of PRP, SVF, or ASC is implied, the supra-physiological concentrations of stem cells and growth factors is a sensitive issue in reconstructive breast surgery with a risk of cancer relapse [72].

PRP Enriched Grafts

In surgical fields, great interest has been demonstrated in platelet concentrates, notably in PRP, which is easy to use and only requires a blood sample. This blood derived formula contains a concentrated number of platelets that releases several growth factors (contained in the alpha-granules) such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF β), vascular

endothelial growth factor (VEGF), and epidermal growth factor (EGF). These growth factors are responsible for high angiogenesis and proliferation potential in vitro [73]. Because of its properties, the use of PRP in breast AFG has been considered. There are still limited and conflicting results in the literature. In 2011, Salgarello et al. showed no benefit of using PRP with Coleman AFG, whilst in 2012 Gentile et al. reported a 1-year graft survival of 69 % compared to 39 % for the Coleman technique alone [35, 37]. PRP clearly has a concentration-dependent effect, with standardization of PRP preparation still unavailable. These factors and the numerous available protocols [74] can explain the contradictory results that have been obtained. More studies with a higher number of patients will be required to reach a consensus on the use of PRP at a defined concentration.

Cell-Assisted Lipotransfer (CAL)

Over the past decade, studies have shown a great deal of interest in the SVF mainly because of its ASC content and its ability to secrete pro-angiogenic factors [75, 76]. Thus, new procedures have emerged, consisting of the injection of a stem cell enriched fat graft. The common name for this protocol is Cell-Assisted Lipotransfer (CAL) [25].

The goal of this approach is to inject more SVF cells to promote vascularization and survival of the graft thanks to the presence of more endothelial precursors and pro-

Table 2 Guidelines for the different steps of AFG to the breast (according to the literature new data)

Procedure step	Tips
Infiltration	Usually conducted with a 1/1 ratio. While adrenalin can be used without problem, local anesthetics should be avoided. If necessary, local anesthetics should be used with appropriate concentration (maximum 0.4 mg/mL), and the tissue should be washed
Harvesting	Use a low depression (less than 0.5 atm or 375 mmHg), and a small cannula (2–4 mm in diameter) with multiple holes to decrease the pressure in order to preserve the tissue and to harvest small fat lobules. Devices that accelerate fat tissue harvesting may damage the fat graft if they are not used with caution
Processing	Washing steps are important in order to remove infiltration drugs and inflammatory molecules. Low-speed centrifugation (less than 400 g) or equivalent should be used to remove the liquid part so that a sufficient fat density is maintained for reinjection
Reinjection	Neovascularization of the graft is critical for its survival. It is therefore important to inject small adipose aliquots in order to decrease hypoxic stress. Preferably use a small cannula (2 mm diameter or less) with small holes. Additional care of the recipient site (BRAVA) or enhanced lipotransfer (CAL) might be suited for low trophicity breast (e.g., after radiotherapy)

angiogenic factors like the vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by the SVF [8]. Moreover, the enriched grafts contain more ASC that may be able to differentiate in the adipocyte lineage in situ to overcome the death of adipocytes that occurs during AFG. Finally, the immunoregulatory potential of ASC [77] may decrease the inflammation that is responsible for a sub-optimal outcome, causing adipocyte death. In the CAL protocol, the SVF is isolated of half of the harvested fat and then combined with the other half to create a stromal cell enriched fat graft. Several devices are now used in clinical practice to isolate the adipose SVF. These devices often use enzymatic digestion to digest the tissue and allow the isolation of the SVF cells as a pellet following centrifugation of the digested tissue [78].

So far the results obtained with CAL do not allow us to reach any conclusion as far as the superiority of this technique is concerned when compared with conventional fat transfer [45]. There is still a lack of real comparative studies with an objective assessment of graft survival. Moreover, the higher cost and quantity of tissue required for CAL remain limiting factors. It is likely that the CAL technique may not be suited to every AFG application. However, SVF seems to improve scar healing and might be suitable for low trophicity recipient sites [79].

ASC Enriched Graft

Last year, Trojahn Kølle et al. published a study carried out with volunteers in which fat grafts were compared with fat grafts enriched with cultured ASC. Even if this study was conducted on bolus injections of fat, the improvement in fat survival at 121 days (80.9 vs. 16.3 %) has now raised interest in cultured ASC supplemented fat for AFG [80]. We can expect in future breast AFG studies with cultured ASC to assess safety and cost effectiveness of this concept. However, this protocol is not a one-step procedure, with additional costs, time and the possibility of contamination

related to the expansion of stromal cells. Furthermore, the intensive expansion of stromal cells increases the mutation risk in these cells (abnormal caryotype).

Breast Expansion System

Focusing on the recipient site, Khouri has developed the BRAVA system. The principle of this device is to extend the breast skin to make it a more favorable recipient for fat injection. The device applies a negative pressure (from 15 to 33 mmHg) to the breast area to (1) untighten the skin, increasing recipient volume, and (2) increasing blood supply via mechanotransduction effects [14]. Several studies and a clinical trial have supported the use of this technique and have demonstrated good results [26, 33, 38, 40, 49]. However, the BRAVA is quite expensive and its use is unwieldy for the patient. Considering its cost and its cumbersome nature it might be better suited for selected patients, for example with a “hostile” recipient breast (post-radiotherapy [49]) or those who want a large augmentation with limited procedures [81]. Nowadays, 8 % of American plastic surgeons are using this device prior to AFG [11].

Guidelines

In Table 2, we resume some tips that, according to the literature, can help to improve outcome for breast AFG. There is still no ideal protocol but we believe that the recent knowledge can be used to avoid deleterious procedures.

Conclusion

AFG to the breast is now a standard practice for breast reconstruction and augmentation procedures. However, there remain serious limitations as far as graft intake is

concerned. To improve outcome, many studies have focused on finding new approaches to treat the fat before reinjection. Here, we summarized current knowledge for each step of the AFG to the breast technique.

We believe it is possible to improve long-term outcomes by respecting both adipocyte and stromal fractions during the entire AFG to the breast process. Graft survival can be improved by controlled aspiration with low negative pressure (<700 mmHg) and with multi-small-holed canulae. Before reinjection the fat needs to be concentrated while care is taken to preserve cell survival (positive balance between liquid removal and fat damages).

In the past 10 years, many research groups have shown interest in “stem cell enriched” grafts, especially the CAL protocol with SVF. It is still not clear if this protocol is better than conventional fat grafting. It might be promising for hostile hypotrophic recipient sites (an irradiated breast for example) justifying the higher cost, the necessity to harvest more tissue (half of it is digested) and the supplementary operation time that is required (approximately 2 h more). For all other applications high graft maintenance can be achieved by carefully processing the fat with simple and low-cost techniques.

The future of AFG to the breast is yet to be written; but it is clear that since the advent of the optimized Coleman's lipostructure, a great deal of fat grafting knowledge has been gathered and we now have more clues about how to handle fat in order to offer the best esthetic outcomes for patients.

Acknowledgments Vincent Hivernaud, Franck Festy, Anne-Claire Girard and Regis Roche are employed by STEMCIS.

References

- International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS) Global statistics for year 2011: <http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics>. Accessed 31 July 2014
- Oulharj S, Pauchot J, Tropet Y (2013) PIP breast implant removal: a study of 828 cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:302–307
- Cunningham B, McCue J (2009) Safety and effectiveness of Mentor's MemoryGel implants at 6 years. *Aesthet Plast Surg* 33:440–444
- Leopardi D, Thavaneswaran P, Mutimer KL, Olbourne NA, Maddern GJ (2013) Autologous fat transfer for breast augmentation: a systematic review. *ANZ J Surg* 84:225–230
- Gutowski KA, Force AFGT (2009) Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg* 124:272–280
- Wronska A, Kmiec Z (2012) Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* 205:194–208
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641–648
- Baer PC, Geiger H (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295
- Largo RD, Tchang LA, Mele V, Scherberich A, Harder Y, Wettstein R, Schaefer DJ (2013) Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:437–448
- Kling RE, Mehrara BJ, Pusic AL, Young VL, Hume KM, Crotty CA, Rubin JP (2013) Trends in autologous fat grafting to the breast: a national survey of the American Society of Plastic Surgeons. *Plast Reconstr Surg* 132:35–46
- Rubin JP, Coon D, Zuley M, Toy J, Asano Y, Kurita M, Aoi N, Harii K, Yoshimura K (2012) Mammographic changes after fat transfer to the breast compared with changes after breast reduction: a blinded study. *Plast Reconstr Surg* 129:1029–1038
- Del Vecchio DA, Del Vecchio SJ (2014) The graft-to-capacity ratio: volumetric planning in large-volume fat transplantation. *Plast Reconstr Surg* 133:561–569
- Khoury RK, Rigotti G, Cardoso E, Khouri RK, Biggs TM (2014) Megavolume autologous fat transfer: part I. Theory and principles. *Plast Reconstr Surg* 133:550–557
- Spear SL, Pittman T (2014) A prospective study on lipoaugmentation of the breast. *Aesthet Surg J* 34:400–408
- Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, Rietjens M, De Lorenzi F, Garusi C, Rossetto F, Martella S, Manconi A, Bertolini F, Curigliano G, Veronesi P, Santillo B, Rotmensz N (2012) Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann Oncol* 23:582–588
- Petit JY, Rietjens M, Botteri E, Rotmensz N, Bertolini F, Curigliano G, Rey P, Garusi C, De Lorenzi F, Martella S, Manconi A, Barbieri B, Veronesi P, Intra M, Brambullo T, Gottardi A, Sommarino M, Lomeo G, Iera M, Giovino V, Lohsiriwat V (2013) Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* 24:1479–1484
- Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, Baroni G, Galiè M, Molino AM, Mercanti A, Micciolo R, Sbarbati A (2010) Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthet Plast Surg* 34:475–480
- Zhang Y, Daquinag A, Traktuev DO, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, March KL, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG (2009) White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res* 69:5259–5266
- Chaput B, Foucras L, Le Guellec S, Grolleau JL, Garrido I (2013) Recurrence of an invasive ductal breast carcinoma 4 months after autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 131:123–124
- Smit JM, Tielemans HJ, de Vries B, Tuinder SM (2014) Recurrence of invasive ductal breast carcinoma 10 months after autologous fat grafting. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67:e127–e128
- Agha RF, Fowler AJ, Herlin C, Goodacre TE, Orgill DP (2014) Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 68:143–161
- Gale KL, Takha EA, Ball G, Tan VKM, McCulley SJ, Macmillan RD (2015) A case controlled study of the oncological safety of fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. Publish Ahead of Print
- Registered clinical trials. <http://www.clinicaltrial.gov>. Accessed 24 May 2014

25. 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. *Aesthet Plast Surg* 32:48–55
26. Zocchi ML, Zuliani F (2008) Bicompartmental breast lipotransferring. *Aesthet Plast Surg* 32:313–328
27. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R (2009) Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J* 29:360–376
28. Illouz YG, Sterodimas A (2009) Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience. *Aesthet Plast Surg* 33:706–715
29. Panettiere P, Marchetti L, Accorsi D (2009) The serial free fat transfer in irradiated prosthetic breast reconstructions. *Aesthet Plast Surg* 33:695–700
30. Ueberreiter K, von Finckenstein JG, Cromme F, Herold C, Tanzella U, Vogt PM (2010) BEAULI™—a new and easy method for large-volume fat grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 42:379–385
31. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K (2010) Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 16:169–175
32. Caviggioli F, Maione L, Forcellini D, Klinger F, Klinger M (2011) Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome. *Plast Reconstr Surg* 128:349–352
33. Del Vecchio DA, Bucky LP (2011) Breast augmentation using preexpansion and autologous fat transplantation: a clinical radiographic study. *Plast Reconstr Surg* 127:2441–2450
34. Kamakura T, Ito K (2011) Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. *Aesthet Plast Surg* 35:1022–1030
35. Salgarello M, Visconti G, Rusciani A (2011) Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art. *Plast Reconstr Surg* 127:2176–2185
36. Cigna E, Ribuffo D, Sorvillo V, Atzeni M, Piperno A, Calò PG, Scuderi N (2012) Secondary lipofilling after breast reconstruction with implants. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:1729–1734
37. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, Floris M, Fiaschetti V, Floris R, 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 Transl Med* 1:341–351
38. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, Baker TJ (2012) Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg* 129:1173–1187
39. Pérez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, Sassoon E, Delay E, Weiler-Mithoff EM (2012) Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol* 38:382–389
40. Auclair E, Blondeel P, Del Vecchio DA (2013) Composite breast augmentation: soft-tissue planning using implants and fat. *Plast Reconstr Surg* 132:558–568
41. Bonomi R, Betal D, Rapisarda IF, Kalra L, Sajid MS, Johri A (2013) Role of lipomodelling in improving aesthetic outcomes in patients undergoing immediate and delayed reconstructive breast surgery. *Eur J Surg Oncol* 39:1039–1045
42. Costantini M, Cipriani A, Belli P, Bufi E, Fubelli R, Visconti G, Salgarello M, Bonomo L (2013) Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation. *Clin Radiol* 68:27–33
43. Fiaschetti V, Pistolese CA, Fornari M, Liberto V, Cama V, Gentile P, Floris M, Floris R, Cervelli V, Simonetti G (2013) Magnetic resonance imaging and ultrasound evaluation after breast autologous fat grafting combined with platelet-rich plasma. *Plast Reconstr Surg* 132:498e–509e
44. Hoppe DL, Ueberreiter K, Surlemont Y, Peltoniemi H, Stabile M, Kauhanen S (2013) Breast reconstruction de novo by water-jet assisted autologous fat grafting—a retrospective study. *Ger Med Sci* 11:Doc17
45. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariemi K, Mikkonen R, Kuokkanen H, Herold C (2013) Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 66:1494–1503
46. Khouri RK, Khouri RK, Rigotti G, Marchi A, Cardoso E, Rotemberg SC, Biggs TM (2014) Aesthetic applications of brava-assisted megavolume fat grafting to the breasts: a 9-year, 476-patient, multicenter experience. *Plast Reconstr Surg* 133:796–807
47. Maione L, Vinci V, Caviggioli F, Klinger F, Banzatti B, Catania B, Lisa A, Klinger M (2014) Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome following breast conservative surgery and radiotherapy. *Aesthet Plast Surg* 38:528–532
48. Small K, Choi M, Petruolo O, Lee C, Karp N (2014) Is there an ideal donor site of fat for secondary breast reconstruction? *Aesthet Surg J* 34:545–550
49. Uda H, Sugawara Y, Sarukawa S, Sunaga A (2014) Brava and autologous fat grafting for breast reconstruction after cancer surgery. *Plast Reconstr Surg* 133:203–213
50. Heymans O, Castus P, Grandjean FX, Van Zele D (2006) Liposuction: review of the techniques, innovations and applications. *Acta Chir Belg* 106:647–653
51. Girard A-C, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran MK, Delarue P, Hulard O, Lefebvre-d'Helencourt C, Roche R, Hoareau L, Festy F (2013) New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthet Plast Surg* 37:144–152
52. Moore JH, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzakowski Z, Noto PF, Caro JF (1995) Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthet Plast Surg* 19:335–339
53. Li K, Gao J, Zhang Z, Li J, Cha P, Liao Y, Wang G, Lu F (2013) Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthet Plast Surg* 37:153–158
54. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA (2004) In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 113:391–397
55. Erdim M, Tezel E, Numanoglu A, Sav A (2009) The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:1210–1214
56. Khouri RK, Rigotti G, Cardoso E, Khouri RKJ, Biggs TM (2014) Megavolume autologous fat transfer II. *Plast Reconstr Surg* 133:1369–1377
57. Del Vecchio D, Fichadia H (2012) Autologous fat transplantation—a paradigm shift in breast reconstruction, breast reconstruction—current techniques. In: Marzia Salgarello (ed) www.intechopen.com, p 217–236
58. Tambasco D, Arena V, Grusso F, Cervelli D (2013) Adipocyte damage in relation to different pressures generated during manual lipoaspiration with a syringe. *Plast Reconstr Surg* 131:645–646
59. Shiffman MA, Mirrafati S (2001) Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg* 27:819–826
60. Cheriyan T, Kai Kao H, Qiao X, Guo L (2014) Low harvest pressure enhances autologous fat graft viability. *Plast Reconstr Surg* 133:1365–1368
61. Condé-Green A, de Amorim NF, Pitanguy I (2010) Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and

- mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:1375–1381
62. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, Huang C, Gabbay J, Ghadjar K, Miller TA (2007) Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg* 119:323–331
 63. Hoareau L, Bencharif K, Girard A-C, Gence L, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R (2013) Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 66:712–719
 64. Coleman SR, Saboeiro AP (2007) Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 119:775–787
 65. Allen RJ, Canizares O, Scharf C, Nguyen PD, Thanik V, Saadeh PB, Coleman SR, Hazen A (2013) Grading lipoaspirate: is there an optimal density for fat grafting? *Plast Reconstr Surg* 131:38–45
 66. Ferraro GA, De Francesco F, Tirino V, Cataldo C, Rossano F, Nicoletti G, D'Andrea F (2011) Effects of a new centrifugation method on adipose cell viability for autologous fat grafting. *Aesthet Plast Surg* 35:341–348
 67. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K (2008) Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 121:1033–1042
 68. Delay E, Streit L, Toussoun G, La Marca S, Ho Quoc C (2013) Lipomodelling: an important advance in breast surgery. *Acta Chir Plast* 55:34–43
 69. Zhu M, Cohen SR, Hicok KC, Shanahan RK, Strem BM, Yu JC, Arm DM, Fraser JK (2013) Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system. *Plast Reconstr Surg* 131:873–880
 70. Dos-Anjos Vilaboa S, Llull R, Mendel TA (2013) Returning fat grafts to physiologic conditions using washing. *Plast Reconstr Surg* 132:323–326
 71. Chung MT, Paik KJ, Atashroo DA, Hyun JS, McArdle A, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Tevlin R, Duldulao C, Hu MS, Walmsley GG, Parisi-Amon A, Momeni A, Rimsa JR, Commons GW, Gurtner GC, Wan DC, Longaker MT (2014) Studies in fat grafting: part I. Effects of injection technique on in vitro fat viability and in vivo volume retention. *Plast Reconstr Surg* 134:29–38
 72. Spartalis ED, Tomos P, Konofaos P, Dimitroulis D, Kouraklis G (2014) Letter to Editor Breast reconstruction with autologous fat graft; does platelet-rich plasma affect patient's survival? *Int J Clin Exp Med* 7:329–330
 73. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Vento AMD, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24:3095–3100
 74. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, Kusumoto K (2014) Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs* 17:186–192
 75. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B (2011) Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 3:25–33
 76. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, Herbert BR (2012) Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* 10:172–188
 77. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118–129
 78. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228
 79. Tabit CJ, Slack GC, Fan K, Wan DC, Bradley JP (2012) Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes. *Aesthet Plast Surg* 36:704–713
 80. Stig-Frederik Trojahn K, Anne F-N, Anders Bruun M, Jens Jørgen E, Roberto SO, Peter VG, Jens K, Maria K, Bo Sonnich R, Maj-Lis Møller T, Carsten T, Ebbe D, Krzysztof Tadeusz D (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
 81. Del Vecchio D, Rohrich RJ (2012) A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions. *Plast Reconstr Surg* 130:511–522
 82. Mestak O, Sukop A, Hsueh YS, Molitor M, Mestak J, Matejovska J, Zarubova L (2014) Centrifugation versus PureGraft for fat-grafting to the breast after breast-conserving therapy. *World J Surg Oncol* 12:178–186

Thèse de Doctorat

Vincent HIVERNAUD

Chirurgie reconstructrice et médecine régénératrice osseuse : utilisation du tissu adipeux et de ses dérivés

Reconstructive surgery and bone regeneration: Use of adipose tissue and its derivated

Résumé

Le tissu adipeux est une source cellulaire d'intérêt en clinique humaine. La lipoaspiration permet un prélèvement a-traumatique de ce tissu. Ce lipoaspirat est utilisé en chirurgie plastique et reconstructrice pour combler des défauts de tissu mou via la technique de lipotransfert. Mais l'intérêt clinique de tissu adipeux ne se situe pas seulement dans son volume. En effet, depuis une dizaine d'années maintenant, le tissu adipeux est à l'étude pour son contenu en cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules sont présentes dans la fraction stromale vasculaire (FSV) du tissu adipeux. La FSV est isolable du reste du tissu dans un délai intra-opératoire. La présence de CSM, mais aussi de progéniteurs endothéliaux et de nombreux facteurs de croissance font de la FSV une source cellulaire d'intérêt pour la médecine régénératrice.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés au potentiel clinique du tissu adipeux. D'abord les différentes techniques actuelles de lipotransfert ont été comparées dans une étude pré-clinique. Dans un second temps, le potentiel de la FSV en association à des biomatériaux osseux a été évalué dans des modèles pré-cliniques de perte osseuse maxillo-faciale. Le but étant de développer un nouveau procédé d'ingénierie tissulaire osseuse intra-opératoire.

Mots clés

Tissu adipeux, ingénierie tissulaire osseuse, chirurgie plastique et reconstructrice, fraction stromale vasculaire, contexte clinique

Abstract

Human adipose tissue is a cellular source of great interest in clinic. It can be harvested harmlessly by lipoaspiration. The lipoaspirat is already used in plastic and reconstructive surgery to fill soft tissues defects with the lipotransfer technique. However, the clinical interest of adipose tissue does not only lies in its volume. Indeed, since the last decade, researches are made on the mesenchymal stem cells (MSC) present in the adipose tissue. Those cells are contained in the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue. FSV cells can be isolated from the adipose tissue in an intra-operative timing. The presence of MSC but also endothelial progenitors and numerous growth factors drive great interest for the SVF as a cellular source for regenerative medicine.

In this thesis, we investigated the clinical potential of adipose tissue. First, the different protocols of autologous fat grafting (lipotransfer) were compared in a pre-clinical model. Then, the potential of SVF cells associated to bone substitute was evaluated in pre-clinical models of maxillo-facial bone loss. The aim was to develop a new intra-operative strategy of bone tissue engineering.

Key Words

Adipose tissue, bone tissue engineering, plastic and reconstructive surgery, stromal vascular fraction, clinical interest