



Analyse moléculaire du tissu adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique et effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains (ASCs)

Bérengère Chignon-Sicard

► To cite this version:

Bérengère Chignon-Sicard. Analyse moléculaire du tissu adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique et effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains (ASCs). Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4008 . tel-01822409

HAL Id: tel-01822409

<https://theses.hal.science/tel-01822409>

Submitted on 25 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT

Analyse moléculaire du tissu adipeux
humain en fonction de sa localisation
anatomique et effet du PRP (Plateled Rich
Plasma) sur les progéniteurs adipeux
humains (ASCs)

Bérengère CHIGNON-SICARD

Laboratoire iBV, UMR7277 CNRS- UMR1091 INSERM
« Cellules Souches et Différenciation »

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en **Sciences**
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Monsieur Christian DANI

Soutenue le : 21 mars 2018

Devant le jury, composé de :

Pr P BOILEAU	Nice	Président
Pr G MAGALON	Marseille	Rapporteur
Pr A MOJALLAL	Lyon	Rapporteur
Pr L CASTEILLE	Toulouse	Examineur
Pr C DESNUELLE	Nice	Examineur
M. J AUBERT	Nice	Invité



THÈSE DE DOCTORAT

Analyse moléculaire du tissu adipeux
humain en fonction de sa localisation
anatomique et effet du PRP (Platelet Rich
Plasma) sur les progéniteurs adipeux
humains (ASCs)

Bérengère CHIGNON-SICARD

Laboratoire iBV, UMR7277 CNRS- UMR1091 INSERM
« Cellules Souches et Différenciation »

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en **Sciences**
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Monsieur Christian DANI

Soutenue le : 21 mars 2018

Devant le jury, composé de :

Pr P BOILEAU	Nice	Président
Pr G MAGALON	Marseille	Rapporteur
Pr A MOJALLAL	Lyon	Rapporteur
Pr L CASTEILLE	Toulouse	Examineur
Pr C DESNUELLE	Nice	Examineur
M. J AUBERT	Nice	Invité

TITRE :

Analyse moléculaire du tissu adipeux
humain en fonction de sa localisation anatomique
et effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les
progéniteurs adipeux humains (ASCs)

JURY :

Président du Jury :

Professeur Pascal BOILEAU Chirurgien Orthopédiste, CHU Nice

Rapporteurs :

Professeur Guy MAGALON Chirurgien Plastique Réparatrice et Esthétique CHU
Marseille

Professeur Ali MOJALLAL Chirurgien Plastique Réparatrice et Esthétique CHU
Lyon

Examineurs :

Professeur Louis CASTEILLA Directeur de Stromalab Université de Toulouse

Professeur Claude DESNUELLE Neurologue CHU Nice

Invités :

Monsieur Jérôme AUBERT Directeur de recherche GALDERMA

Directeur de thèse :

Monsieur Christian DANI Laboratoire « cellules souches et différenciation » Nice
iBV UMR 7277 CNRS – UMR 1091 INSERM

Titre de la thèse Analyse moléculaire du tissu adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique et effet du PRP (Platelet Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains (ASCs)

Mots-clés ASCs, cellules souches, PRP, greffe adipocytaire

Résumé

Différents domaines en Chirurgie Plastique et Esthétique ont évolué au cours de ces dernières années et notamment le transfert et injection de Tissu Adipeux autologue. Les premières données cliniques ont été présentées sans véritable appui scientifique. Cette thèse a pour objet de confirmer les données cliniques retrouvées et de permettre d'améliorer cette technique par des preuves scientifiques.

Deux questions sont à considérer :

- 1) Le tissu adipeux a-t-il selon son origine anatomique des caractéristiques différentes et certaines régions seraient-elles à privilégier lors d'une autogreffe ?
- 2) Existe-t-il des facteurs de croissances autologues permettant de stimuler la prise de greffe, la prolifération et la différenciation des cellules greffées ?

La première partie de ce travail a consisté à analyser le tissu adipeux en fonction du site de prélèvement. A cet effet, nous avons analysé le tissu adipeux provenant de 2 sites anatomiques : le genou et le menton. Le choix topographique découle d'une raison technique et d'une raison théorique. Nos résultats suggèrent que les deux sites étudiés ont des origines embryonnaires différentes, et montrent que ces deux sites présentent une signature moléculaire et une fonctionnalité différentes.

La seconde partie porte sur l'effet *in vitro* de facteurs de croissances autologues humains. Nous avons analysé la prolifération et la différenciation de cellules souches adipogéniques (ASCs) humaines. Nous avons pour cela utilisé des concentrés plaquettaires issus de prélèvements sanguins autologues, et donc utilisables en pratique thérapeutique humaine. Il s'agit du PRF (plaquette riche en fibrine) et du PRP (plaquette riche en plasma). Les résultats de l'étude montrent que la présence de PRF ou de PRP dans le milieu de culture permet une augmentation drastique de la prolifération cellulaire d'environ 4 à 5 fois. A contrario, les résultats obtenus montrent un blocage partiel de la différenciation adipocytaire, quelque soit le moment et le temps de mise en contact. Nous avons alors étudié par quelle voie de blocage la différenciation était induit et avons montré l'implication de la voie du TGFB qui dans ces conditions de culture induit un blocage partiel de la différenciation des ASCs vers un adipocyte mature. Notre étude montre qu'en parallèle à l'effet antiadipogénique, la différenciation s'oriente vers des cellules myofibroblastes-like. Nous avons alors testé l'effet de l'ajout d'un inhibiteur du TGFB (SB431542) dans le milieu de culture et avons observé une relance de la différenciation cellulaire vers la voie adipogénique confirmant que le PRP a un effet antiadipogénique et promyofibroblastique. Par ailleurs, nous avons analysé la composition du PRP utilisé en dosant les taux de facteurs de croissance présents.

En conclusion, ce travail permet de confirmer l'augmentation de la prolifération cellulaire des ASCs en présence de PRP autologue. Ceci nous permet donc une transposition clinique immédiate en utilisant en peropératoire l'association PRP et prélèvement de tissu adipeux lors d'un lipofilling. Ce travail permet également de mettre en lumière la probable différence de fonction des adipocytes prélevés en fonction de leur site anatomique d'origine. Ceci a probablement une conséquence sur l'évolution long terme de ces greffes de tissu adipeux en fonction d'une modification pondérale.

Thesis title Effects of Platelet-Rich Plasma on human adipose progenitors and molecular analysis of human adipose tissues according to their anatomic localisation

Keywords ASCs, Stem Cells, PRP, fat grafting

Abstract

Different fields in plastic and aesthetic surgery have evolved in recent years including the transfer and injection of autologous adipose tissue. The first clinical data was presented without any real scientific support. The purpose of this thesis is to improve this technic by adding scientific evidence.

There are two questions to consider:

- 1) Do adipose tissues have different characteristics according to their anatomical origin, and should certain regions be preferred for autografting?
- 2) Are there autologous growth factors to stimulate engraftment, proliferation and differentiation of grafted cells?

The first part of this work consisted in analyzing the adipose tissue according to the fat depot. For this purpose, we analyzed the adipose tissues from 2 anatomical sites: the knee and the chin. The rational of this choice comes from a technical reason and a theoretical reason. Our results suggest that the two sites studied have different embryonic origins, and show that these two sites have a different molecular signature and functionality.

The second part of the work deals with the in vitro effect of autologous human growth factors, on the proliferation and differentiation of human adipose stem cells (ASCs). For this purpose, we used platelet concentrates from blood samples, which can therefore be used in human therapeutic practice. It is the PRF (fibrin-rich platelet) and the PRP (platelet-rich plasma). The results of the study show that the presence of PRF or PRP in the culture medium allows a drastic increase in ASC proliferation of about 4 to 5 times. In contrast, the results show a partial inhibition of adipocyte differentiation, whatever the period and the time of contact. We analyzed the composition of different PRP sources and we identified the involvement of the TGFB pathway in the anti adipogenic effects of PRP. In contrast, the antiadipogenic effect was concomitant with the differentiation of ASCs towards myofibroblasts-like cells.

In conclusion, this work allows us immediate clinical transposition using PRP during lipofilling. This work also makes it possible to highlight the probable difference in function of the adipocytes taken according to their original anatomical site. This likely has a consequence on the long term evolution of these adipose tissue grafts in case of a weight change.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

« Sans la curiosité de l'esprit, que serions nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles. »

Marie Curie

Madame, vous avez enseigné et passionné mon arrière grand mère

Merci pour cette transmission de Passion

Cette thèse est dédiée au Professeur Pierre DESNUELLE

Pierre DESNUELLE (8 août 1911, 8 décembre 1986)

Académicien des sciences 1977, 1986

Président de la Société française de biochimie et de Biologie moléculaire

1932 : Licencié es sciences physiques de la faculté de Lyon

1932 : Ingénieur chimiste de l'école supérieure de chimie de Lyon

1935 : Docteur es sciences physiques

1937 : Bourse Rockefeller

1939 : Chargé de recherche CNRS

1943 : Maître de conférence faculté de Marseille

1943-1962 : Directeur du laboratoire national des matières grasses

1954 : Directeur du centre de 3ème cycle de chimie biologique à la faculté de Marseille

1966 : Membre de l'académie des sciences (section chimie)

1967 : Fondateur et Directeur du centre de biochimie et biologie moléculaire du CNRS

Membre de la société de chimie biologique (Paris, Président), de la biochemical Society (Londres), de la Society of American Biological Chemists et de l'International Union of Biochemistry (Durham, Californie, Secrétaire Général)

Officier de la Légion d'honneur : Commandeur dans l'ordre du mérite : Officier dans l'ordre des palmes académiques

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1. Les cellules souches et leur topographie corporelle.
 - 1.1 Qu'est-ce qu'une cellule souche ?
 - 1.2 Les différents mécanismes de division d'une cellule souche.
 - 1.3 Les différents types et sources de cellules souches
 - 1.3.1 Historique
 - 1.3.2 Les cellules souches embryonnaires : ESC
 - 1.3.3 Les cellules souches pluripotentes induites : iPS
 - 1.3.4 Les cellules souches adultes et présentation des cellules souches adipocytaires hMAD
 - 1.4 Topographie corporelle des cellules souches.
 - 1.4.1 la peau
 - 1.4.2 la moelle osseuse
 - 1.4.3 le TA
2. Le tissu adipeux (TA):
 - 2.1. Le TA
 - 2.2. Les adipocytes
 - 2.3. Les composants du TA
 - 2.4. Topographie et rôle de l'adipocyte blanc
 - 2.5. Topographie et rôle de l'adipocyte brun
 - 2.6. Le lipofilling
3. Le PRP et le PRF
 - 3.1. Rappel sur les plaquettes
 - 3.2. PRP
 - 3.3. PRF
 - 3.4. Données cliniques et scientifiques sur PRP et PRF
 - 3.5. Conclusions
4. Quelles sont les données scientifiques récentes sur l'amélioration potentielle de la prise de TA (PRP, SVF et ASCs)
 - 4.1. Analyse de l'association SVF, PRP, ASCs *in vitro*
 - 4.2. Etudes cliniques

HISTOIRE DE MA THESE

OBJECTIF METHODES RESULTATS

DISCUSSION

CONCLUSION

Articles parus

Annexes

ABBREVIATIONS

AH : acide hyaluronique

ASCs : Adipose Stromal/ stem Cells : cellules souches progénitrices d'origine adipocytaire

CAL : Cell assisted lipotransfer

CSM : cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales

CSH : cellule souche hématopoïétique

ESC embryonic stem cell : cellule souche embryonnaire

hMAD : cellule souche humaine d'origine adipeuse utilisées au laboratoire

IPs : Induced pluripotent stem cells : cellules souches pluripotentes induites

MB : membrane basale

MEC : matrice extra cellulaire

MO : microscopie électronique

PDGF : platelet-Derived Growth factor

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

PRF : Fibrine Riche en Plaquettes

SVF : Facteur Vasculaire stromal

SVF : sang de veau foetal

TA : tissu adipeux

TGF- β : Transforming Growth Factor β

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

RESUME

TITRE : Analyse moléculaire du Tissu Adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique et Effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains.

Différents domaines en Chirurgie Plastique et Esthétique ont évolué au cours de ces dernières années et notamment le transfert et injection de Tissu Adipeux autologue. Les premières données cliniques ont été présentées sans véritable appui scientifique. Cette thèse a pour objet de confirmer les données cliniques retrouvées et de permettre d'améliorer cette technique par des preuves scientifiques.

Deux questions sont à considérer :

- 1) Le tissu adipeux a-t-il, selon son origine anatomique, des caractéristiques différentes et certaines régions seraient-elles à privilégier lors d'une autogreffe ?
- 2) Existe-t-il des facteurs de croissance autologues permettant de stimuler la prise de greffe, la prolifération et la différenciation des cellules greffées ?

La première partie de ce travail a consisté à analyser le tissu adipeux en fonction du site de prélèvement anatomique. A cet effet, nous avons analysé le tissu adipeux provenant de 2 sites anatomiques: le genou et le menton. Le choix topographie découle d'une raison technique et d'une raison théorique. Nos résultats suggèrent que les deux sites étudiés ont des origines embryonnaires différentes, et montrent que ces deux sites présentent une signature moléculaire et une fonctionnalité différentes.

La seconde partie porte sur l'effet *in vitro* de facteurs de croissance autologues humains. Nous avons analysé la prolifération et la différenciation de cellules souches adipogéniques (ASCs) humaines. Nous avons, pour cela, utilisé des concentrés plaquettaires issus de prélèvements sanguins autologues, et donc utilisables en pratique thérapeutique humaine. Il s'agit du PRF (fibrine riche en plaquettes) et du PRP (plasma riche en plaquettes). Les résultats de l'étude montrent que la présence de PRF ou de PRP dans le milieu de culture permet une augmentation drastique de la prolifération cellulaire de 4,5 fois. A contrario, les résultats obtenus montrent un blocage partiel de la différenciation adipocytaire, quelque soit le moment et le temps de mise en contact. Nous avons alors étudié par quelle voie de blocage la différenciation était induite et avons montré l'implication de la voie du TGFB qui dans ces conditions de culture induit un blocage partiel de la différenciation des ASCs vers un adipocyte mature. Notre étude montre qu'en parallèle à l'effet antiadipogénique, la différenciation s'oriente vers des cellules myofibroblastes-like. Nous avons alors testé l'effet de l'ajout d'un inhibiteur du TGFB (SB431542) dans le milieu de culture et avons observé une relance de la différenciation cellulaire vers la voie adipogénique confirmant que le PRP a un effet antiadipogénique et promyofibroblastique. Par ailleurs, nous avons analysé la composition du PRP utilisé en dosant les taux de facteurs de croissance présents.

En conclusion, ce travail permet de confirmer l'augmentation de la prolifération cellulaire des ASCs en présence de PRP autologue. Ceci nous permet donc une transposition clinique immédiate en utilisant en peropératoire l'association PRP et prélèvement de tissu adipeux lors d'un lipofilling. Ce travail permet également de mettre en lumière la probable différence de fonction des adipocytes prélevés en fonction de leur site anatomique d'origine. Ceci a probablement une conséquence sur l'évolution à long terme de ces greffes de tissu adipeux en fonction d'une modification pondérale.

RESUME des articles publiés :

Cette thèse tire son origine d'une première étude que nous avons publiée en 2012 dans le journal PRS Plastique Reconstruction Surgery. Il s'agit d'une étude clinique ouverte randomisée en double aveugle comparant le temps de cicatrisation avec ou sans application unique peropératoire de concentré plaquettaire autologue type PRF. En résultat, le temps de cicatrisation était significativement diminué avec application de PRF.

Nous avons donc imaginé que ces concentrés plaquettaires pouvaient également jouer un rôle sur les cellules adipocytaires en boostant la prise de greffe.

Efficacy of leukocyte- and platelet-rich fibrin in wound healing: a randomized controlled clinical trial.

Chignon-Sicard B, Georgiou CA, Fontas E, David S, Dumas P, Ihrai T, Lebreton E. Plast Reconstr Surg. 2012 Dec;130(6):819e-829e.

Deux articles publiés et une revue découlent directement de cette thèse.

Le premier article publié en 2015 étudie la caractérisation des cellules souches adipocytaires provenant de prélèvements du genou et de la région sous mentale.

Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells.

Kouidhi M, Villageois P, Mounier CM, Ménigot C, Rival Y, Piwnica D, Aubert J, **Chignon-Sicard B*** and Dani C*. Stem Cells Int. 2015;2015:592090.

*contribution égale

Le second article publié plus récemment (2017) expose l'effet du PRP sur la prolifération et la différenciation cellulaire des ASCs. Il montre une augmentation drastique de la prolifération cellulaire de 4.5 fois, un blocage partiel de la différenciation adipocytaire par la voie du TGFB qui est inhibé par le PRP et est relancé en rajoutant du SB431245 (inhibiteur du TGFB). Parallèlement à cet effet antiadipogénique, le PRP oriente la différenciation vers la création de cellules myofibroblastique-like.

Platelet-rich plasma respectively reduces and promotes adipogenic and myofibroblastic differentiation of human adipose-derived stromal cells via the TGF β signalling pathway.

Chignon-Sicard B, Kouidhi M, Yao X, Delerue-Audegond A, Villageois P, Peraldi P, Ferrari P, Rival Y, Piwnica D, Aubert J, Dani C.
Sci Rep. 2017 Jun 7;7(1):2954.

Autologous Fat Grafts: Can We Match the Donor Fat Site and the Host Environment for Better Postoperative Outcomes and Safety?

Christian Dani · Rémi Foissac · Annie Ladoux · **Bérengère Chignon-Sicard**

Article · Jul 2017

Curr Surg Rep (2017) 5 :14

DOI 10.1007/s40137-017-0178-1

Des études annexes à cette thèse ont permis de publier quatre articles :

Le premier portant sur la caractérisation moléculaire des cellules progénitrices adipocytaires dérivées de cellules hiPSC. Cette étude a permis de montrer que **PAX3 (facteur de transcription)** est un **nouveau marqueur des cellules progénitrices brunes humaines** et est un marqueur de leur destin moléculaire.

Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: role of Pax3.

Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Takashima Y, Villageois P, Carrière A, Svensson M, Bagnis C, **Chignon-Sicard B**, Svensson PA, Casteilla L, Smith A, Dani C.

Stem Cells. 2014 Jun;32(6):1459-67.

Le second article porte sur **l'expression des marqueurs à la surface des cellules souches adipocytaires humaines** lors de leur prolifération et différenciation. Nous avons constaté que 100% des **cellules non différenciées expriment le CD73 et CD105**. Au contraire **CD146 et CD140/PDFGRA** marquent des sous populations cellulaires différentes. Pendant la différenciation cellulaire, l'expression de CD73 est maintenue alors que celle du CD105 est inhibée dans les cellules très différenciées. Ces données confirment le fait que les cellules souches humaines d'origine adipocytaire représentent un mélange hétérogène de cellules et les marqueurs à la surface des cellules peuvent permettre de distinguer ces sous populations cellulaires.

Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells.

Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Villageois P, **Chignon-Sicard B**, Dani C.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 18;430(3):871-5.

Le troisième article porte sur une application clinique : La lipostructure moderne : L'utilisation potentielle du PRF. L'étude analyse de manière subjective 232 patients ayant bénéficiés d'une lipostructure faciale avec et sans PRF. Cette analyse comporte certains biais mais permet d'obtenir une des premières études cliniques sur les injections de graisses couplées à du PRF. Les résultats montrant une meilleure prise de tissu adipeux en présence de PRF mais doivent être confirmés par des analyses IRM pré et post opératoires.

Modern lipostructure: the use of platelet rich fibrin (PRF).
Braccini F, **Chignon-Sicard B**, Volpei Ch, Choukroun J.
Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 2013;134(4-5):231-5.

Le quatrième article publié, a étudié l'expression des gènes des cellules adipocytaires provenant de plusieurs sites anatomiques.

Homeotic and Embryonic Gene Expression in Breast Adipose Tissue and in Adipose Tissues Used as Donor Sites in Plastic Surgery.
Foissac R, Villageois P, **Chignon-Sicard B**, Georgiou C, Camuzard O, Dani C.
Plast Reconstr Surg. 2017 Mar;139(3):685e-692e

INTRODUCTION

Le corps humain est constitué d'une juxtaposition d'environ 100 000 milliards de cellules. Il existe plus de 200 types cellulaires différents : cellule sanguine, cellule cutanée, cellule nerveuse, cellule musculaire, cardiaque, cérébrale, hépatique, etc... Parvenues à l'âge adulte différencié, certaines cellules ne peuvent plus se diviser ni se reproduire, ce sont par exemple les cellules spécialisées du muscle, du cœur et du cerveau. Mais d'autres conservent le potentiel de se reproduire tout au long de la vie. Ce sont les cellules souches adultes à distinguer des cellules souches embryonnaires dont nous parlons plus loin.

Les cellules souches possèdent deux propriétés remarquables :

- **la capacité à se reproduire** pour former deux cellules-filles identiques à la cellule mère. Ce processus de mitose se répète indéfiniment tant que les cellules restent indifférenciées.
- **la capacité à se différencier**, quand elles sont exposées à certains agents ou facteurs de différenciation, pour évoluer vers des cellules différentes de la cellule mère. Cette différenciation donne naissance à des cellules spécialisées pour former tous les tissus qui apparaissent au cours du développement humain.

1. LES CELLULES SOUCHES ET LEUR TOPOGRAPHIE CORPORELLE

Les cellules souches embryonnaires sont de découverte récente. Elles posent encore beaucoup d'interrogations scientifiques, d'espoirs thérapeutiques et de questionnements éthiques, dans un domaine marqué également par une forte compétition internationale et des enjeux financiers importants.

1.1. Qu'est-ce qu'une cellule souche ?

Une cellule souche est une cellule indifférenciée ayant un potentiel de différenciation en au moins un type cellulaire.

Elle se caractérise par :

- Son **auto-renouvellement**, qui est la capacité pour une cellule à proliférer indéfiniment tout en maintenant un état indifférencié. Les cellules souches peuvent se multiplier par division symétrique ou asymétrique, nous y reviendrons plus loin.
- Sa **potentialité de différenciation** qui est la capacité pour une cellule à évoluer vers un ou plusieurs types de cellules matures.

Selon leurs capacités de différenciation, on distingue plusieurs types de cellules souches (Figure 1 et Figure 2):

- **Les cellules souches totipotentes** : Issues de l'ovocyte fertilisé, ces cellules souches embryonnaires sont capables de se différencier en tous types cellulaires embryonnaires et extra embryonnaires, on peut les retrouver dans l'embryon de cinq jours.
- **Les cellules souches pluripotentes** : Descendantes des cellules totipotentes, elles ont un potentiel de différenciation vers presque tous les types cellulaires. Elles ont le potentiel de donner, *in vitro* et *in vivo*, les trois feuillets embryonnaires qui vont constituer l'organisme à l'exception du placenta d'origine extra embryonnaire.
- **Les cellules souches multipotentes** : Ces cellules sont capables de se différencier en un grand nombre de cellules mais toujours de la même famille (nombre limité de type cellulaire qui généralement constitue un organe entier). Ce type cellulaire correspond aux cellules souches mésenchymateuses qui nous intéressent ici puisque capables de se différencier en un grand nombre de cellules, adipocytes, fibroblastes, kératinocytes, ostéoblastes, chondrocytes, myocytes etc...
- **Les cellules souches unipotentes** : Ces cellules sont capables de s'auto renouveler mais peuvent seulement se diviser et reproduire un seul type cellulaire, le leur.
- **Les cellules pro génitrices** : Ces cellules présentent une capacité limitée d'auto renouvellement et se différencient en un type cellulaire défini.

En plus de leur capacité d'auto renouvellement et de différenciation, les cellules souches se caractérisent par leur capacité à se maintenir en un **état de quiescence**. La quiescence est la phase G0 du cycle cellulaire dans laquelle sont bloquées les cellules en absence de facteurs mitotiques. Il s'agit d'une phase de dormance pendant laquelle ces cellules ont une faible activité métabolique et une petite taille. Lors de cet état de quiescence, les cellules souches sont protégées et moins soumises aux agressions. En fait, les cellules souches sont dans un état léthargique protecteur. Elles se «réveillent» lors d'une fracture osseuse par exemple et se divisent permettant de régénérer les tissus lésés. Des études récentes montreraient un impact du jeûne sur ces cellules souches.

Une caractéristique de la cellule souche est sa propriété de division. La cellule pro génitrice possède cette même capacité mais leur nombre de division est plus limité.

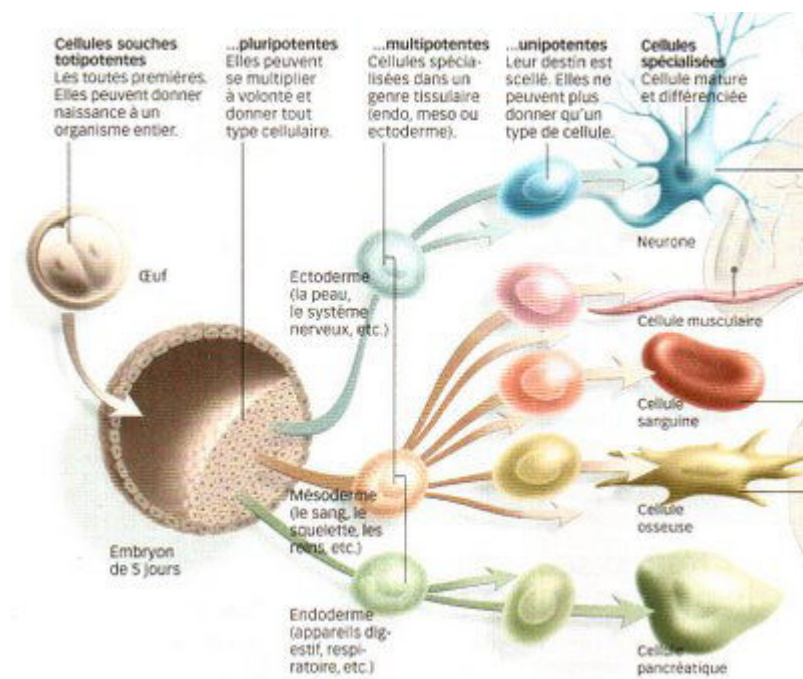


Figure 1 : schéma des différents types de cellules souches : totipotentes, pluripotentes, multipotentes, unipotentes

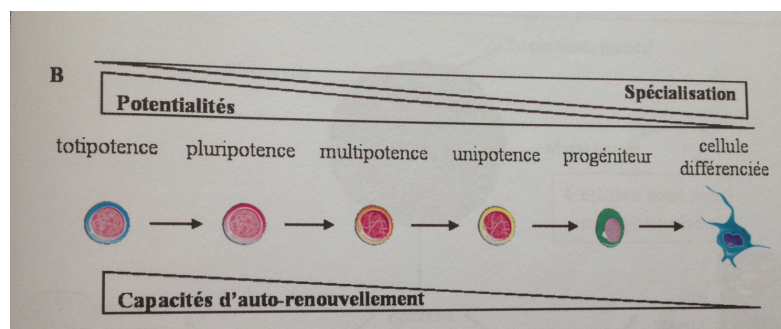


Figure 2 : Caractéristiques d'une cellule souche.

Les cellules souches se différencient par leur capacité d'auto renouvellement et de différenciation. A noter que, plus la cellule se différencie, plus elle perd cette capacité à proliférer. (Thèse maumus 2009)

1.2. Les différents mécanismes de division d'une cellule souche.

Les cellules souches sont capables d'effectuer deux types de division cellulaire (figure 3) :

L'une, classique, **symétrique** qui génère 2 cellules souches identiques.

L'autre, **asymétrique**, qui génère d'un côté un progéniteur, cellule plus différenciée,

et de l'autre une cellule souche. Ainsi, c'est l'utilisation de la division asymétrique qui permet à une population souche de maintenir son nombre plus ou moins constant lors de la production de cellules différenciées.

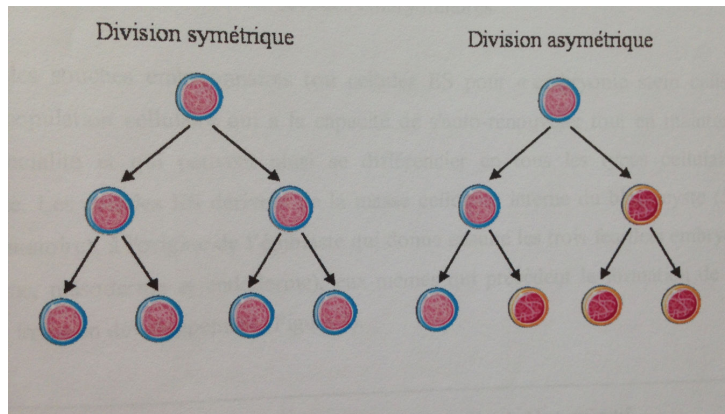


Figure 3 : les cellules souches sont capables de s'auto renouveler soit par division symétrique en générant deux cellules identiques à la cellule mère, soit par division asymétrique en donnant d'une part des cellules identiques à la cellule mère et d'autre part une cellule destinée à se différencier (maumus 2009)

Il existe deux étapes dans la création d'une cellule différenciée :

-la **différenciation proprement dite**, durant laquelle une cellule subit un changement **qualitatif de phénotype**, tel l'apparition de nouvelles protéines membranaires, due à l'activation de l'expression d'un gène donné. Une différenciation est donc un événement ponctuel.

-la **maturation** où la cellule subit un changement **quantitatif de phénotype**. Cela correspond à l'augmentation de la production de certaines protéines, et est donc étalée dans le temps.

On distingue ainsi trois phases lors de la formation d'un tissu différencié :

Une première phase : phase de prolifération sans différenciation pendant laquelle les cellules souches se divisent et soit se renouvellent, soit créent des cellules déterminées. Cette phase ne comprend que des divisions mitotiques.

Dans la phase suivante, qualifiée d'intermédiaire, où les cellules prolifèrent et en même temps se différencient. Les cellules déterminées sont des cellules de transit, elles subissent à la fois des mitoses et une maturation/différenciation. Elles deviennent donc de plus en plus matures, tout en continuant à se diviser.

La dernière phase est une phase de maturation. Les cellules ne se divisent plus et ne font plus que se différencier, jusqu'à donner des cellules matures, dotées de tout le matériel nécessaire à leur fonction.

Entre la première phase (prolifération sans différenciation) et la troisième (différenciation sans prolifération), la phase intermédiaire est très flexible, permettant des périodes de maturation plus ou moins longues, différente selon les lignées cellulaires.

1.3. Les différents types et sources de cellules souches

Les quatre grands types de cellules souches chez le mammifère sont :

- **Les cellules souches embryonnaires** qui sont isolées à partir de la masse interne du blastocyte et sont totipotentes.
- **Les cellules souches périnatales** contenues dans le sang du cordon du nouveau né et du placenta.
- **Les cellules souches adultes** qui sont retrouvées dans la majorité des tissus adultes (moelle osseuse, graisse, peau).
- **Les cellules souches iPS** qui sont des cellules souches humaines adultes reprogrammées en cellules souches embryonnaires.

1.3.1. Historique

Les travaux, initiés par Leroy Stevens et Barry Pierce dans les années 1950 sur l'étude des tératocarcinomes murins, ont permis d'isoler les cellules souches embryonnaires (en abrégé ES pour embryonic stem). Ces cellules sont capables de générer toutes les cellules sanguines et proviennent de la moelle osseuse. La première greffe de moelle osseuse est effectuée en 1958.

En 1981, les cellules souches embryonnaires sont identifiées pour la première fois à partir d'embryon de souris par deux équipes indépendantes **Evans et Kaufman** et celle de **Martin**. (1,2)

Ces cellules montrent une intense activité de prolifération *in vitro* tout en gardant un état indifférencié quand elles sont cultivées sur des cellules nourricières, des fibroblastes de souris, qui produisent la cytokine LIF (leukemia inhibitory factor) connue pour inhiber la différenciation des ESC.

La masse cellulaire interne d'un blastocyte a la propriété de donner naissance *in vivo* aux trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) à l'origine de tous les tissus d'un être humain adulte. Cette propriété de pluripotence *in vivo* est très rapidement perdue au cours du développement embryonnaire.

En 1981, ces chercheurs, réussissent chez l'embryon de souris, à conserver *in vitro* les cellules à l'état de pluripotence et à les faire proliférer indéfiniment :

Nous assistons alors à la « naissance des cellules souches embryonnaires ».
(ES)

Ces lignées cellulaires sont génétiquement normales, à la différence des lignées de tumeurs malignes. À tout moment, y compris après plusieurs années de culture, il reste possible de faire différencier ces cellules en n'importe quel type cellulaire. Ces travaux ont été couronnés par le prix Nobel de médecine en 2007.

En 1998, ces résultats ont été reproduits chez l'homme par la dérivation des premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines. Thomson et al, à partir de cellules de blastocytes humains, ont réussi à obtenir pléthore de lignées génétiquement différentes. (3)

Une standardisation des conditions de culture de ces cellules ES est devenue indispensable car des différences techniques de la densité d'ensemencement du milieu de culture, des facteurs de croissance, de la méthode et du nombre de repiquages... entraînent des différences de leurs caractéristiques. Un consortium de chercheurs travaillant sur les cellules ES humaines à travers le monde a été créé, « the International Stem Cell Initiative » ISCI afin d'en standardiser les caractéristiques de production. (4)

Par des approches de cytométrie de flux pour la caractérisation des antigènes de surface et par des approches de RT-PCR ou de « microarray » pour l'étude des profils d'expression génique, sur 59 lignées de cellules souches embryonnaires provenant de 17 laboratoires à travers le monde, un profil des différentes ESC humaines a pu être dégagé avec la reconnaissance de marqueurs communs :

- des facteurs de transcriptions : Nanog, Oct-4, TDGF1, DNMT3B, GABRB3 et GDF3
- des antigènes glycolipidiques : SSEA-3 et SSEA-4
- les antigènes à keratane sulfate TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 et GCT343
- les protéines CD9, CD90, l'alkaline phosphatase et l'HLA de classe 1

En **2007** de nouvelles cellules souches sont créées (5) : **les cellules souches pluripotentes induites (iPS)**

En 2009/2010, (5) il a été montré, chez des souris, que des neurones issus de cellules souches embryonnaires (CSE) greffées dans le cortex visuel se connectent aux autres neurones environnants en évitant les régions du cerveau dont elles ne sont pas spécifiques, par exemple, se connecter aux neurones de la moelle épinière. Alors que des CSE greffées dans la moelle s'y sont installées sans se connecter au cortex visuel ni à d'autres organes. Si ceci se vérifie aussi chez la souris adulte, une nouvelle piste de régénération physique de lésions nerveuses cérébrales serait ouverte.

En **2012**, découverte et Autorisation de mise sur le marché sous condition du premier médicament à base de cellules souches : **le Prochymal**.

Le Prochymal, produit par le laboratoire américain Osiris Therapeutics, serait administré aux enfants atteints d'une maladie rare, nommée réaction aiguë du

greffon contre l'hôte (GVHD), chez qui les autres traitements, à base de stéroïdes notamment, auront été inefficaces. Elle se produit lorsque le receveur d'une greffe de moelle osseuse est victime d'agression par les lymphocytes d'un donneur incompatible. Les symptômes sont variés et se manifestent par des douleurs abdominales, la chute de cheveux, des troubles digestifs et pulmonaires, entre autres, et s'avère mortelle chez 80 % des enfants. Jusqu'à présent, il n'y avait pas d'alternative thérapeutique à la corticothérapie, mais ce médicament de thérapie cellulaire est soumis à des conditions de production et d'utilisation très réduite.

En regroupant toutes les données émanant des différents essais menés depuis, Osiris Therapeutics a démontré à Santé Canada que le Prochymal fournissait des résultats cliniques significatifs chez 61 à 64 % des personnes atteintes de GVHD qui ne répondaient pas aux autres traitements, après 28 jours de thérapie. De plus, le médicament augmente le taux de survie de ces enfants.

Ce traitement doit encore faire ses preuves et des études cliniques bien conduites permettront d'améliorer l'utilisation de ce traitement.

Néanmoins, le Prochymal se compose de cellules souches mésenchymateuses obtenus par prélèvement de moelle osseuse récupérées chez des donneurs adultes en bonne santé. Après mise en culture, un seul donneur suffit à fournir 10.000 doses. Le médicament est conçu pour contrôler les réactions inflammatoires, promouvoir la régénération tissulaire mais aussi prévenir la formation de cicatrices. Les mécanismes d'action ne sont pourtant pas encore bien maîtrisés.

En septembre 2013, un centre de production en France voit le jour, il s'agit de la plus importante usine européenne (cellforcore) de médicaments cellules. Plusieurs études de thérapie cellulaire sont en cours et de nombreuses souhaitent voir le jour. Ce challenge est un terrain de réflexion des investisseurs puisque un fond de 28 milliards d'euros est levé.

Actuellement en France et dans le monde de nombreuses études cliniques sont toujours en cours.

1.3.2. Les cellules souches embryonnaires : ESC

Les cellules souches embryonnaires (ESC « embryonic stem cells) sont l'unique population cellulaire capable de **s'auto renouveler** tout en maintenant une **pluripotentialité**. Elles peuvent se différencier en tous types cellulaires. Elles dérivent de la masse cellulaire interne du blastocyte (5^{ème} jour préimplantatoire) pouvant alors donner les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme).

L'ectoderme donnera alors, entre autre, le système nerveux, l'épiderme les muqueuses et les organes sensoriels.

Le mésoderme donnera le système circulatoire (cœur, vaisseaux sanguins et lymphatiques), les muscles, le système squelettique, le tissu conjonctif ainsi que les organes génitaux.

L'endoderme donnera l'appareil digestif et l'appareil respiratoire. (figure 4)

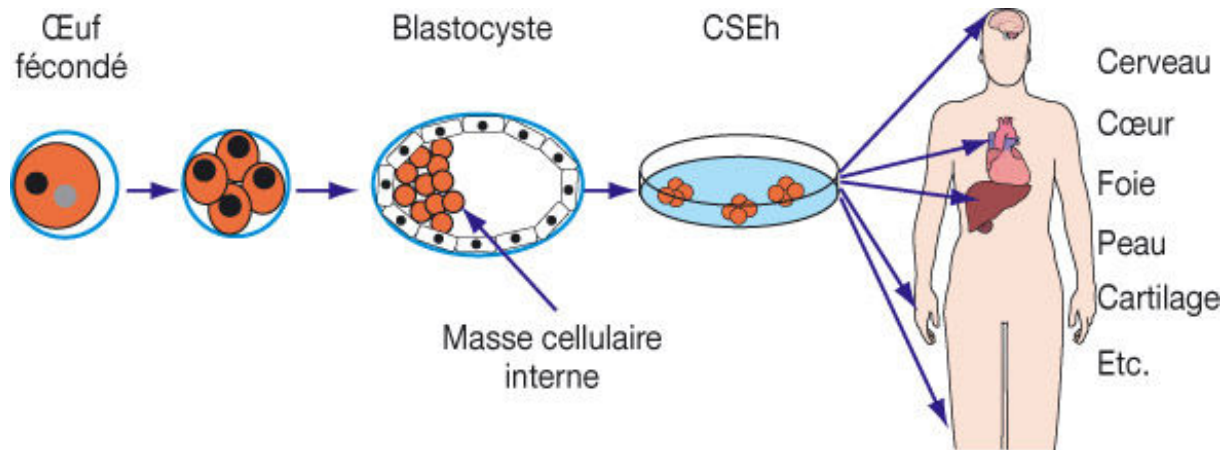


Figure 4 : Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes et sont capables de produire des cellules cardiaques, hépatiques osseuses ou nerveuses.

1.3.3. Les cellules souches pluripotentes induites ou iPS

Transformer une cellule adulte spécialisée en cellule immature capable de redonner n'importe quelle sorte de cellules de l'organisme est devenu possible suite aux travaux d'un chercheur japonais de l'Université de Kobé. Ces travaux ont permis à Shinya Yamanaka de recevoir le prix Nobel de médecine 2012.

Takahashi et Yamanaka, ont montré pour la première fois que l'expression ectopique de 4 facteurs de transcriptions était nécessaire au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires, Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4, dans des conditions de culture de cellules souches embryonnaires, pouvaient reprogrammer des cellules somatiques murines induisant ainsi des cellules souches pluripotentes (iPS cells) (5). Leurs travaux montrent ainsi que ces quatre facteurs de transcription permettent de reprogrammer n'importe quelle cellule différenciée en cellule type iPS en laboratoire (Figure 5). Ce sont des cellules souches adultes différenciées (celles de la peau par exemple) reprogrammées génétiquement pour retrouver les mêmes potentialités que les cellules souches pluripotentes embryonnaires.

John Gurdon a également joué un rôle de pionnier dans la compréhension de la reprogrammation cellulaire.

Ses travaux, conduit au départ chez la souris, ont ensuite été réalisés sur les fibroblastes d'épiderme humain. (6)

Les iPS sont semblables aux cellules ES en terme de morphologie, de prolifération, d'antigène de surface, d'expression génique, de statut épigénétique et des gènes spécifiques de la pluripotence. De plus, ces cellules peuvent se différencier dans tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires *in vitro* et *in vivo* dans les tératomes.

Au cours des trois dernières années, des progrès ont été faits pour générer ces cellules souches reprogrammées sans utiliser des vecteurs viraux intégratifs mais des adénovirus ou plasmides non-intégratifs (7) mais aussi en jouant seulement sur les conditions de culture (8).

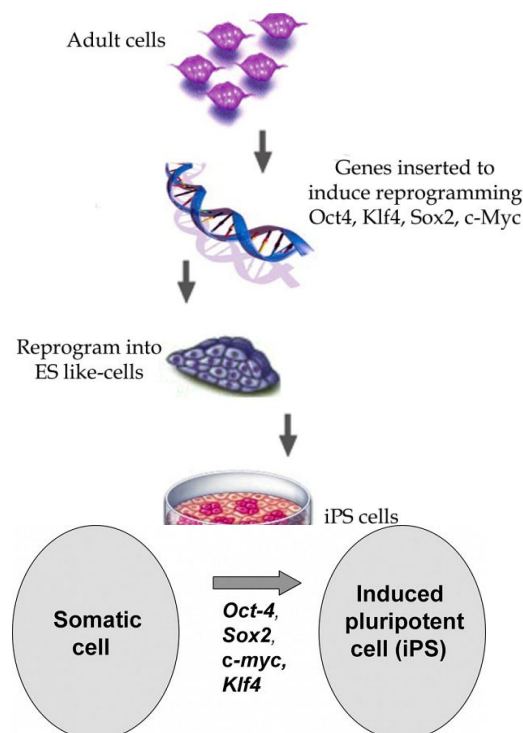


Figure 5 : Transformation en une cellule iPS

Ce type de cellules présente les avantages des cellules souches sans leurs inconvénients.

Les cellules iPS ont les mêmes atouts que les cellules souches embryonnaires humaines : elles prolifèrent à l'infini et peuvent se différencier en tous types de cellules de l'organisme. Mais elles ont des avantages supplémentaires: elles sont **faciles d'accès**, par simple biopsie chez l'adulte, et leur utilisation ne pose **pas de problèmes éthiques**.

De plus, les cellules iPS peuvent provenir de **donneurs sélectionnés pour leur patrimoine génétique**. Cela permet de cultiver des cellules malades et de modéliser des pathologies pour les étudier. Dans le cadre de la médecine

régénérative, il est possible de choisir un donneur compatible avec le receveur à traiter pour éviter un rejet de greffe, ce qui présente un intérêt certain.

L'utilisation de ces cellules est très récente et quelques zones d'ombres persistent. On estime par exemple que la **reprogrammation n'est pas complète**, dans le sens où des modifications du génome acquises au cours de la vie de la cellule persistent après la reprogrammation (modifications épigénétiques). Il est également légitime de se demander si la reprogrammation elle-même n'induit pas de mutations ou de modifications génétiques pouvant par la suite altérer le fonctionnement de ces cellules iPS.

1.3.4. Les cellules souches adultes

Chez l'individu, une réserve de cellules souches persiste après la naissance : les cellules souches adultes, que l'on trouve dans la plupart des tissus humains. Leur rôle est essentiel et permet la réparation et la régénération tissulaire. Elles assurent la pérennité du fonctionnement des organes en remplaçant les cellules qui sont mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion. Les cellules souches adultes du sang, de la peau, des intestins fonctionnent en permanence, tout au long de la vie. Malheureusement, d'autres organes, comme le cœur et le pancréas, ne renferment pas de cellules souches adultes connues à ce jour et n'ont donc aucune possibilité de régénération post lésionnelle.

Les cellules souches adultes ont plusieurs avantages d'utilisation thérapeutique, le premier étant que leur usage ne soulève pas de question éthique. Elles ne dérivent pas d'un prélèvement embryonnaire mais peuvent être obtenues chez l'individu chez qui elles seront utilisées. Dans ce cas d'utilisation autologue, le risque de rejet est évité sans nécessité d'utiliser des thérapies adjuvantes contre l'immunité. Par contre, elles offrent moins de débouchés thérapeutiques que les cellules ES puisqu'elles ne peuvent produire que quelques types cellulaires apparentés au tissu d'origine.

On peut distinguer deux types de comportement pour les cellules souches adultes selon qu'il s'agit de : cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou de cellules souches stromales mésenchymateuses (CSM)

1.3.4.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Ces cellules sont les plus connues. Elles sont multipotentes et capables d'auto-renouvellement. Elles peuvent se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire sanguine : le lignage myéloïde (erythrocytes, macrophages, granulocytes) et le lignage lymphoïde (lymphocytes).

Les CSH sont rares, leur nombre diminue avec l'âge. Pour les utiliser *ex vivo* comme cellules souches, elles doivent être prélevées au niveau de la moelle osseuse selon

des techniques invasives, douloureuses et susceptibles de provoquer des complications ou effets secondaires.

Les CSH à l'état quiescent dans la moelle osseuse sont localisées à proximité des ostéoblastes qui fournissent l'ensemble des facteurs nécessaires à leur maintien dans cet état, alors que leur prolifération et leur différenciation sont localisées au niveau des capillaires sanguins.

1.3.4.2. Les cellules souches stromales mésenchymateuses ou (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales (CSM) sont essentiellement isolées à partir de la **moelle osseuse mais également à partir du tissu adipeux**. Elles sont probablement présentes dans la plupart des tissus adultes. (figure 6) Ce sont ces cellules qui ont intéressées notre travail.

Leurs fonctions sont nombreuses : synthèse d'une matrice extracellulaire, tolérance immunologique, développement embryonnaire, inflammation, fibrose.

Ces cellules CSM ont en premier lieu été décrites dans la moelle osseuse dans les années 1970 et sont capables de se différencier en os (8)

Les CSM présentent **trois propriétés essentielles** :

1) Elles sont isolées grâce à leur **propriété d'adhérence au plastique** et elles prolifèrent *in vitro*

Lorsqu'elles proviennent du tissu adipeux, elles se nomment les cellules **ASCs** (adipose stromal cells) : cellules souches stromales d'origine adipeuse.

2) **Elles expriment différents marqueurs à leur surface : CD105, CD73, CD44, CD90, CD71 et stro-1 mais également les molécules d'adhésion CD106, CD166, ICAM-1 et CD29.**

Par contre, elles n'expriment ni les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11, ni les molécules co stimulantes CD80, CD86 ou CD40, ni les molécules d'adhésion CD31, CD18 ou CD56. L'absence d'expression du marqueur CD34 par les CSM est clairement admise chez l'homme.

3) **Les cellules CSM ont montrées une capacité de différenciation *in vitro* en adipocyte, chondrocyte, ténocyte, hépatocyte, cellule produisant de l'insuline, cellule endothéliale, neurone, myocyte, cardiomyocyte et ostéoblaste. Elles sont donc multipotentes.**

Nous savons désormais que la culture induit des modifications dans l'expression des marqueurs de surface par rapport à leur état natif. Ainsi, les ASCs perdent l'expression de la molécule CD34 qu'elles expriment *in vivo*.

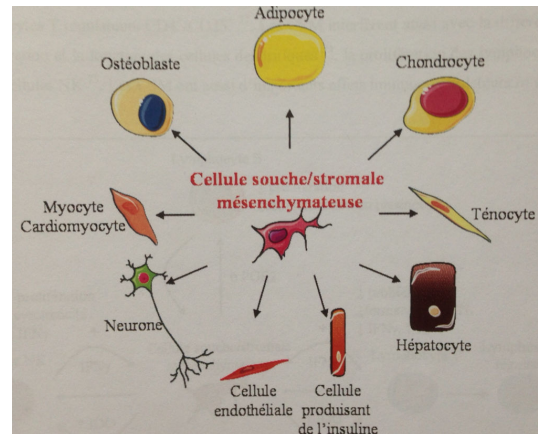


Figure 6 : Les cellules souches stromales mésenchymateuses sont susceptibles de se différencier en différents types cellulaires>.(cousin 2006)

1.3.4.3. Les cellules souches du follicule pileux

L'épiderme de la peau et ses structures associées subissent un renouvellement incessant et utilisent deux types de cellules souches. Les premières se situent dans la couche basale de la peau et créent toutes les couches stratifiées de l'épithélium intra folliculaire. Les secondes, participent à la régénération du poil et de la glande sébacée.

1.3.4.4. Définition des cellules souches d'origine adipocytaire hMAD

Les cellules **hMADS** représentent les ASCs utilisées pour les étapes préliminaires de notre travail et de mise au point technique. Ceci nous a permis ensuite de prélever du TA chez différents sujets afin d'analyser les cellules souches d'origine adipocytaire humaines prélevées en prospectifs.

Ces cellules hMADS (pour human Multipotent Adipose tissue-Derived Stem) ont été caractérisées lors d'une thèse de sciences antérieure menée au laboratoire. Elles sont produites par cultures d'ASCs obtenues à partir de déchets opératoires provenant de l'exérèse chirurgicale de tissu adipeux blanc chez des nouveaux nés ou des enfants âgés de moins de 8 ans. Une analyse transcriptomique réalisée au cours de leur différenciation vers les lignages adipocytaire et ostéoblastique a permis d'identifier les marqueurs de surface CD90, CD105, CD73.

1.4. Topographie corporelle des cellules souches

Les cellules souches adultes peuvent donc être prélevées chez l'homme au niveau de différents sites anatomiques. La moelle osseuse, le tissu adipeux, la peau étant les zones topographiques les plus souvent utilisées mais il existe de nombreux autres sites utilisables.

1.4.1. La peau

La peau est un tissu essentiel du corps, elle protège des infections et de la déshydratation, et permet de ressentir des sensations telles que la pression ou la chaleur. Exposée à de multiples agressions, la peau se renouvelle constamment durant toute la vie. Ce renouvellement est assuré par différentes cellules souches. Chez l'humain, comme chez les autres mammifères, la peau est constituée de trois parties : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme contient lui-même plusieurs couches de cellules appelées kératinocytes. Le derme, situé en dessous contient les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (ou annexes épidermiques). Une couche basale sépare l'épiderme du derme. L'hypoderme, couche la plus profonde, contient des cellules adipeuses mais également les glandes sudoripares (Figure 7).

On connaît à ce jour plusieurs types de cellules souches de peau :

- **Les cellules souches épidermiques**, responsables de la régénération quotidienne des 3 couches de l'épiderme. Elles sont localisées dans la couche basale de l'épiderme.
- **Les cellules souches du follicule pileux**, assurent le renouvellement constant des follicules pileux. Elles peuvent également régénérer l'épiderme et les glandes sébacées si ces tissus sont endommagés. Les cellules souches de follicule pileux sont localisées tout le long du follicule pileux.

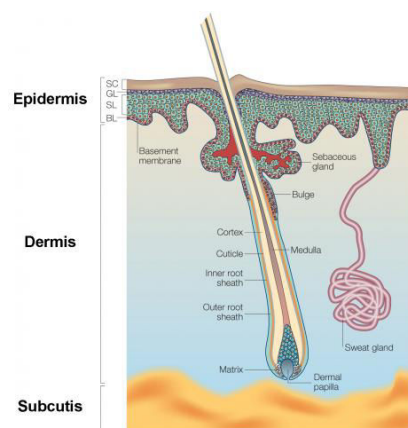


Figure 7 : coupe schématique de la peau définissant la peau en trois couches : épiderme, derme et hypoderme.

1.4.2. La moelle osseuse

Elle fut la première source de cellules souches dont les caractéristiques sont maintenant bien connues. Nous n'avons pas retenus cette source dans notre travail et n'en parlerons pas plus ici.

1.4.3. La graisse

Le tissu adipeux est une source importante de cellules souches. Le prélèvement est facile à réaliser lors d'une simple lipoaspiration par un Chirurgien Plasticien. Le TA obtenu correspond au matériel d'étude de ce travail et sa description fait l'objet du chapitre suivant.

2. LE TISSU ADIPEUX - TA

Longtemps relégué au rang de tissu inerte puis de tissu seulement impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique, le statut du tissu adipeux s'est considérablement modifié. En effet, il a récemment été montré que le tissu adipeux des mammifères peut produire l'ensemble des cellules qui constituent le sang, en particulier les cellules de l'immunité innée. Ce tissu adipeux contient également les ASCs qui semblent représenter des cellules extrêmement prometteuses quant à la thérapie cellulaire régénérative. Le TA représente une source très importante de prélèvement de ASCs, sa masse représente environ 20% de la masse totale chez l'homme.

2.1. Le Tissu Adipeux (TA)

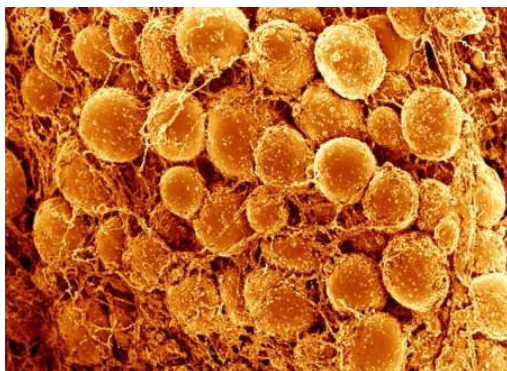


Figure 8 : tissu adipeux vu en microscopie électronique

Chez le mammifère, il existe deux types de TA :

- Le TA **brun** est spécialisé dans la fonction de thermogénèse, grâce à l'expression d'une protéine mitochondriale découplante UCP1 (Uncoupling Protein 1). Il a un rôle métabolique. Il est beaucoup plus vascularisé que le TA blanc. Les adipocytes y sont multiloculaires et riches en mitochondries. Le TA brun est abondant chez les mammifères hibernants. Dans l'espèce humaine, il est très présent à la période néonatale puis s'atrophie rapidement après la naissance. (9)
- Le TA **blanc** est prépondérant chez l'homme. Il se développe puis se maintient tout au long de la vie. Alors que le TA brun dissipe l'énergie sous forme de chaleur, le TA blanc stocke l'énergie pour la relarguer lors des besoins et est un maillon majeur de l'homéostasie énergétique corporelle.

Les adipocytes blancs sont le lieu de mise en réserve des nutriments lipidiques sous forme de triglycérides. Le déstockage de ses réserves par l'adipocyte se fait par la lipolyse qui correspond au catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol. La lipolyse est sous contrôle hormonal (Catécholamine, ACTH, Glucagon). A l'inverse, la lipogénèse est l'ensemble des réactions métaboliques conduisant à la synthèse des lipides à partir de glucose, d'eau, d'acides gras et de triglycérides. Elle a lieu uniquement dans les hépatocytes et les adipocytes.

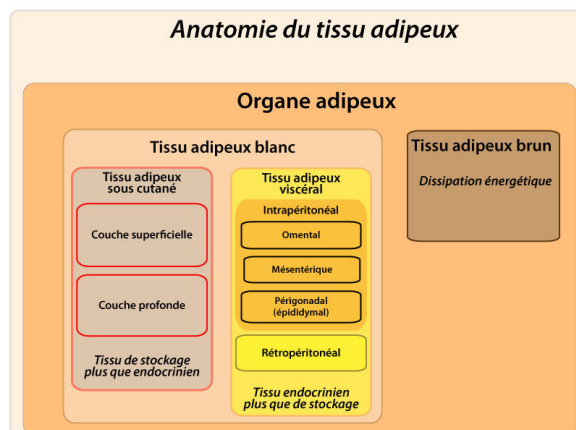


Figure 9 : Le TA est composé majoritairement d'adipocytes matures remplis de triglycérides, ainsi que de leurs précurseurs les préadipocytes, et d'une fraction stroma-vasculaire qui contient des cellules sanguines, des cellules endothéliales et des macrophages.

Le TA, en plus de sa fonction d'homéostasie énergétique via le stockage des lipides sous forme de triglycérides, est un véritable organe endocrine actif sécrétant plus de 600 facteurs comme la leptine et l'adiponectine regroupés sous le nom d'adipokines.

2.2. Les Adipocytes

L'adipocyte est la cellule différenciée spécialisée du TA (Figure 10). Il existe deux variétés d'adipocytes, les adipocytes blancs et les adipocytes bruns.

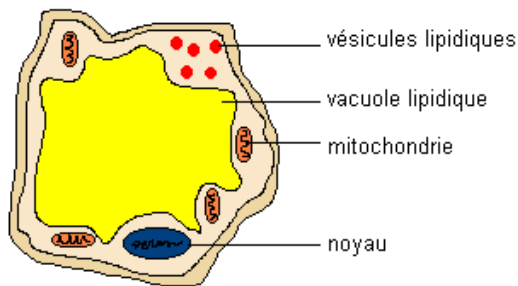


Figure 10 : schéma d'un adipocyte

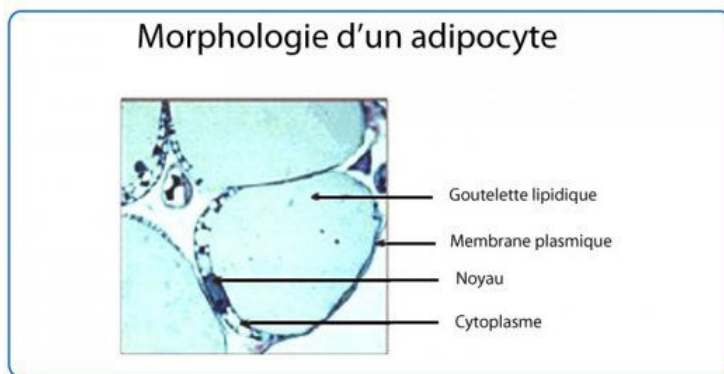


Figure11 : Photo des adipocytes permettant de visualiser l'adipocyte, son noyau, sa membrane cytoplasmique ainsi que les vacuoles lipidiques.

Les adipocytes blancs renferment dans leur cytoplasme une volumineuse vacuole lipidique (figure 11) contenant des triglycérides. L'adipocyte blanc est une cellule uniloculaire alors que l'adipocyte brun est multiloculaire. Ce sont des cellules sphériques, d'un diamètre d'environ une centaine de micromètres voire plus. Leur cytoplasme est refoulé en périphérie formant une mince couronne cytoplasmique contenant l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique granulaire et lisse, des

mitochondries.

Du fait du passage dans les solvants des graisses, la vacuole lipidique disparaît sur les préparations standards de MO, après inclusion en paraffine, pour l'observer, il est nécessaire de faire des coupes à congélation et d'utiliser des colorants des graisses comme l'huile rouge ou les Soudans (noir, par exemple). Le noyau, aplati, est refoulé contre la membrane plasmique. Une fine MB entoure la membrane plasmique.

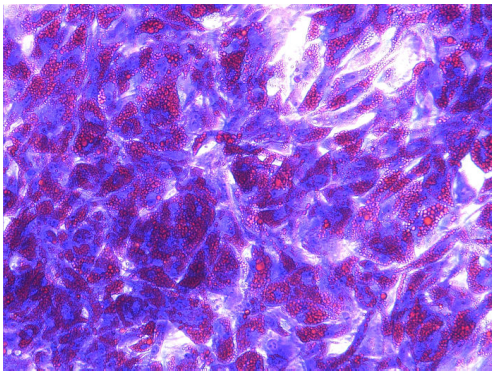


Figure 12 : coupe histologique de TA permettant de visualiser des adipocytes différenciés présentant des vacuoles lipidiques colorées au rouge.

Les adipocytes sont groupés en petits lobules séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène.

2.3. Les composants du TA:

Le TA présente de nombreux composants cellulaires. (figure 13)

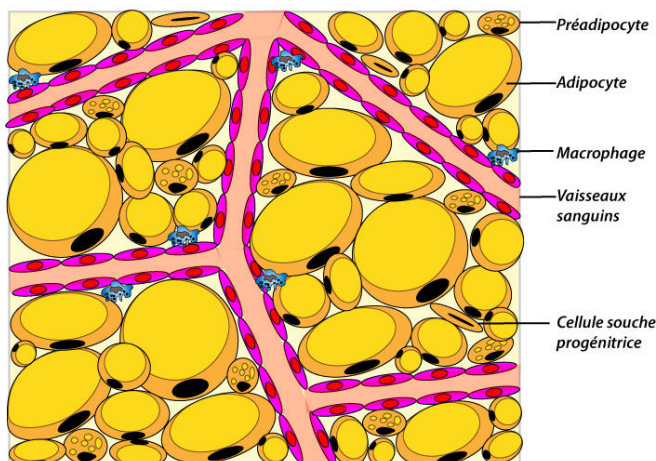


Figure 13 : Schématique du tissu adipeux et de sa composition cellulaire.

Lors de la dissociation et la digestion du tissu adipeux par de la collagénase, on distingue deux fractions cellulaires :

- **la fraction adipocytaire** qui correspond aux adipocytes matures, les cellules différenciées qui contiennent une vacuole lipidique (ces cellules ne se différencient plus).

Et

- **la fraction vasculaire stromale (SVF)** qui contient différents types cellulaires notamment des cellules souches (ASCs). Cette fraction contient également les cellules fibroblastiques, les cellules endothéliales, les cellules sanguines mais également les péricytes. Parmi les cellules de type fibroblastique, on retrouve des cellules précurseurs d'adipocytes mais aussi des cellules progénitrices multipotentes, capables de se différencier *in vitro*, suivant les conditions de culture, en d'autres types cellulaires d'origine mésenchymateuses tels que les ostéoblastes ou les chondrocytes. La composition de la SVF correspond environ à : moins de 5% de préadipocytes, moins de 5% de cellules endothéliales, 5 à 10% de cellules souches adipocytaires, moins de 5% de fibroblastes, moins de 5% de pericytes, 30 à 40% de cellules immuno modulatrices et 20% d'autres types cellulaires non encore identifiés.



Culture de ASCs

2.4. Topographie et rôle de l'adipocyte blanc

2.4.1 Topographie de l'adipocyte blanc chez l'homme

Le tissu adipeux blanc est principalement localisé au niveau de trois zones.

La première, le pannicule adipeux sous-cutané, est diffuse et régulière chez le fœtus et le nouveau-né. En fonction du sexe, le TA est inégalement réparti. Chez l'homme, sa localisation prépondérante sera au niveau de la partie supérieure du corps (nuque, épaule, thorax, épigastre). Chez la femme, le TA se localisera de manière prépondérante à la partie inférieure du corps (hanches, cuisses, fesses). La seconde localisation du TA se nomme le TA viscéral. Il est constitué de compartiments intra et rétro péritonéaux. La troisième se localisera au niveau des orbites et des faces palmaires des mains et des pieds. Les deux premières localisations correspondent à des réserves énergétiques qui fondent lors du jeûne, alors que la troisième joue un rôle de soutien et de protection mécanique et est peu sensible au jeûne. Il est à noter que ce tissu adipeux varie en localisation avec l'âge. En effet, le tissu adipeux sous cutané a tendance à s'amoinrir avec l'âge, alors que le tissu adipeux abdominal a tendance lui à augmenter en quantité. L'origine embryologique du TA blanc n'est pas encore bien établie. Le développement du TA blanc, contrairement au tissu adipeux brun qui a lieu au cours de la vie embryonnaire, débute tardivement au cours de la gestation (10) et se produit principalement à la naissance. Leur développement laisse supposer que ces adipocytes blancs ont une origine mésodermique. Une origine neurectodermique n'est pas démontrée mais elle est actuellement en discussion. En effet, l'étude menée en 1975 par Le Lievre et al indique que la crête neurale pourrait générer des cellules de type adipocytaire dans certaines zones de la tête et du cou. Par ailleurs, des cellules souches multipotentes capables de se différencier en adipocytes ont été isolées de la cornée, elle-même dérive de la crête neurale (11). Ainsi l'origine des adipocytes n'est pas clairement définie. Leur origine embryonnaire diffère-t-elle de par leur localisation topographie (tête, corps; profond, superficie). D'autres types cellulaires ont des origines embryonnaires différents, c'est le cas des chondrocytes ou des péricytes.

2.4.2 Rôle des adipocytes blancs : stocker l'énergie

Une des fonctions principales du TA blanc est de **stocker l'énergie en excès** sous forme de lipides, qui sont ensuite mobilisées par d'autres tissus en réponse à des besoins métaboliques en période de restriction alimentaire. L'adipocyte blanc assure donc la synthèse, le stockage et la libération des lipides. La **synthèse** des lipides (ou lipogénèse) est stimulée par l'insuline. Cette synthèse

s'effectue à partir de différents substrats (triglycérides d'origine alimentaire et glucose). Le **stockage** des lipides se fait sous forme de triglycérides. L'adipocyte est capable d'accumuler des quantités incroyablement élevées de TG, qui sont stockés au sein de gouttelettes lipidiques intracellulaires entourées de protéines appelées périlipines, sans causer de lipotoxicité. C'est à cette réserve que l'organisme fait appel lorsque les réserves de glucides sont épuisées (jeûne, efforts physiques, lutte contre le froid, etc.), ou inutilisables (diabète grave). L'**hydrolyse** des triglycérides (ou lipolyse), stimulée par les catécholamines, libère dans le sang des acides gras non estérifiés.

La lipolyse est due à l'action de deux lipases présentes dans le cytoplasme des adipocytes et qui sont activés par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline, qu'il s'agisse des hormones médullo-surrénaliennes ou des transmetteurs venus des terminaisons sympathiques). Le récepteur bêta-3-adrénergique représente le principal régulateur de la lipolyse adipocytaire aussi bien dans les adipocytes du tissu adipeux blanc que dans ceux du tissu adipeux brun. Ce récepteur de l'adrénaline et de la noradrénaline, principalement exprimé dans les adipocytes (et dans le tube digestif), diffère du récepteur bêta-1 (surtout exprimé dans le cœur) et du bêta-2 (essentiellement exprimé dans l'arbre bronchique). Les acides gras non estérifiés que les adipocytes libèrent ainsi dans le sang sont utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques.

La zone de réserve principale d'énergie du corps humain est représentée par le TA qui représente une masse moyenne de 10 à 15 kilogrammes et peut théoriquement fournir de l'énergie en période de jeûne sur environ 35 jours. Le glucose circulant disponible ne représente, quant à lui, que 20 grammes, ce qui couvre une durée de fourniture d'énergie en période de jeûne de 40 minutes.

2.4.3 Le TA est un organe endocrinien. L'adipocyte blanc est une cellule sécrétrice endocrine et auto-paracrine.

Les adipocytes, longtemps considérés comme des cellules de stockage des lipides, intervenant comme isolant thermique et mécanique, ont acquis un statut de cellules sécrétrices avec la **découverte de la leptine**. Longtemps considéré comme un organe inerte de stockage et de libération des lipides en fonction des besoins métaboliques, le TA apparaît aujourd'hui comme un véritable organe endocrinien capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre **en sécrétant ses propres peptides de signalisation appelés adipokines**. Ces médiateurs ont un impact sur de nombreux tissus cibles, comme le foie ou les muscles squelettiques, et participent directement au contrôle général de la balance énergétique. Certaines de **ces adipokines, comme la leptine ou l'adiponectine**, activent des circuits neuronaux dans l'hypothalamus ou d'autres régions cérébrales avec un impact sur la régulation systémique de la dépense énergétique et le catabolisme lipidique

(12). En plus de la production de ces adipokines, le TA, en condition de stress, sécrète aussi des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, avec des actions autocrines et/ou paracrines et qui contribuent aussi au contrôle de l'homéostasie énergétique (voir liste figure 14). La production et la sécrétion de ces adipokines et de ces cytokines par le TA sont régulées par la masse adipeuse et le statut physiologique de l'organisme (13).

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

figure 14 : facteurs sécrétés par les adipocytes

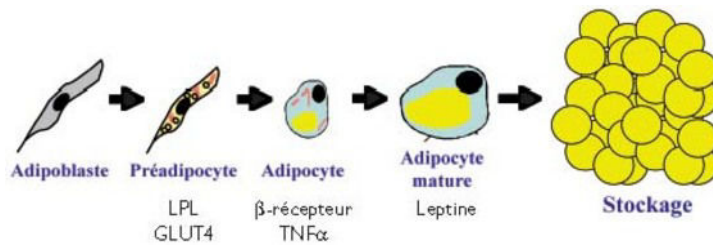


Figure 15 : Schéma de la différenciation cellulaire de l'adipoblaste. La cellule acquiert progressivement sa morphologie typique et surtout ses fonctions métaboliques spécifiques lui permettant de réaliser la lipogenèse qui sera, dans l'adipocyte mature, confirmée par l'expression de la leptine, témoin de la capacité de stockage de triglycérides.(cousin 2006)

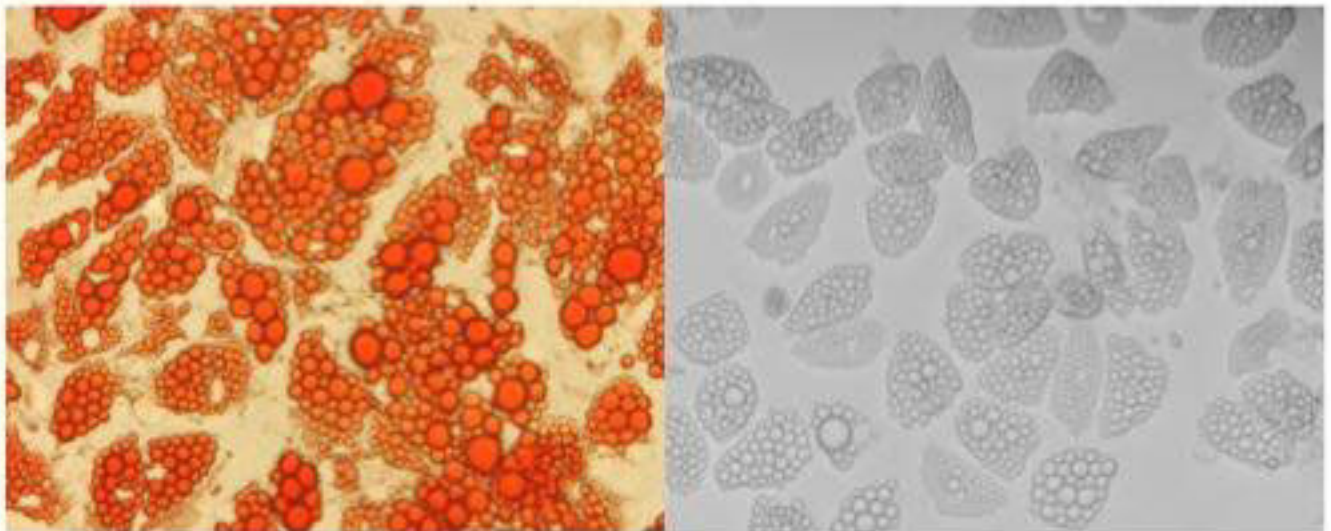


Figure 16 : Jeunes adipocytes dont les gouttelettes lipidiques sont colorées en rouge.

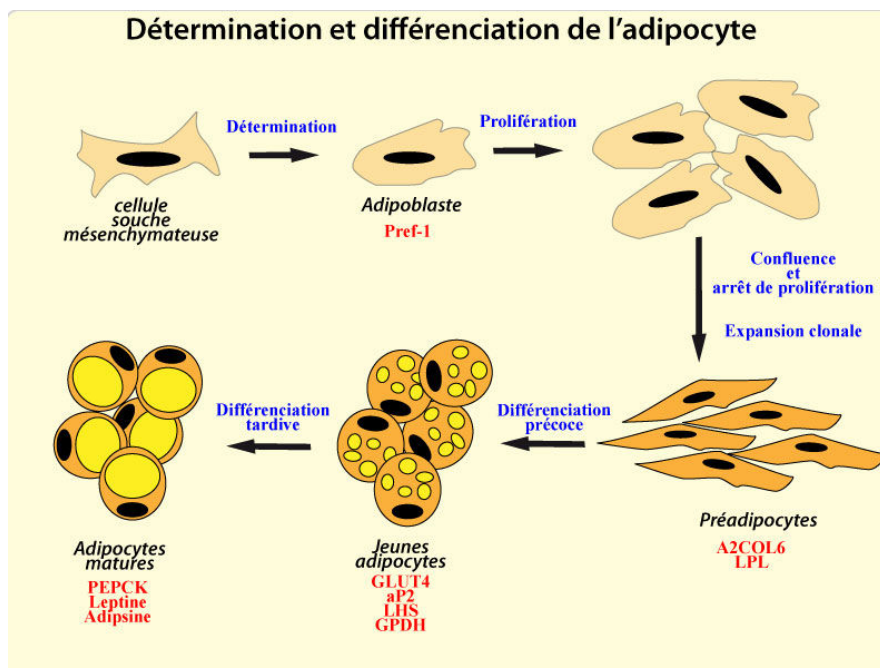


Figure 17 : Détermination et différenciation de l'adipocyte.(cousin 2006)

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

2.4.4 Expansion du tissu adipeux

Longtemps, les scientifiques pensaient que le nombre d'adipocytes était stable depuis l'enfance et que tout au long de l'âge adulte, ce nombre ne se modifiait pas. Nous pensions que seule la taille des adipocytes se modifiait lors de l'apparition de l'obésité. Désormais, nous savons que ce nombre peut se modifier tout au long de la vie adulte. L'expansion du TA est le résultat de deux événements associés (Figure 18) :

- **L'hypertrophie** qui correspond à l'augmentation de la **taille** des adipocytes par accumulation de triglycéride.
- **L'hyperplasie** qui correspond à l'augmentation du **nombre** des adipocytes par recrutement, prolifération et différenciation des précurseurs. Les adipocytes matures ne se divisant pas.

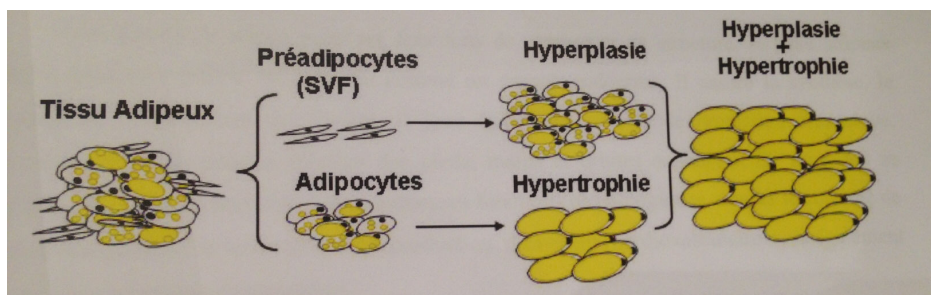


Figure 18 : Expansion du tissu adipeux au cours du développement normal ou pathologique pouvant conduire à l'obésité. (cousin 2006)

2.5. Topographie et rôle de l'adipocyte brun : source de chaleur

Surtout abondante chez les mammifères hibernants (comme la marmotte), la graisse brune est néanmoins présente dans l'espèce humaine, principalement au début de la vie. Chez le fœtus et le nouveau-né, elle se répartit dans la région inter-scapulaire, autour des gros vaisseaux (aisselle, cou), autour des reins et du cœur (Figure 19). Chez l'adulte, des dépôts se retrouvent dans les régions cervicale, supra-claviculaire et para-vertébrale. Le TA brun est métaboliquement actif et son activité est augmentée par le froid. Il est décrit également des variations saisonnières et plus particulièrement modulées par la photopériode plus que par la température.

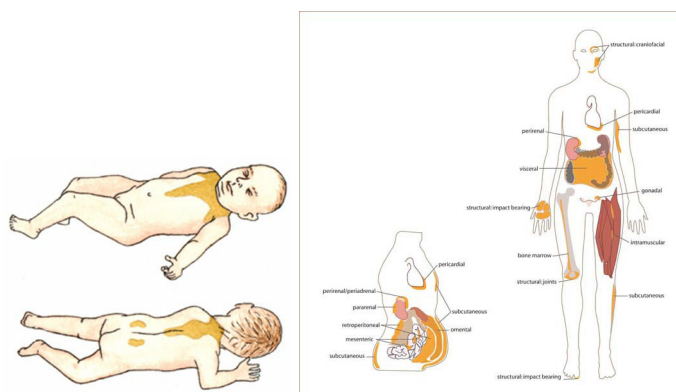


Figure 19 : répartition corporelle chez le nouveau-né et chez l'adulte du tissu adipeux brun.

La graisse brune est impliquée dans la thermogénèse sans frisson et celle induite par l'alimentation. Sa localisation habituelle au contact immédiat des principaux vaisseaux sanguins facilite la diffusion dans tout l'organisme de la chaleur qu'elle produit (calorifère naturel, source de chaleur). La vascularisation et l'innervation sympathique y sont richement développées. Chaque adipocyte, porteur de récepteurs bêta 3-adrénergiques, est au contact d'une terminaison sympathique

noradrénergique.

2.6 Le lipofilling en Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique

En chirurgie reconstructrice, le TA se révèle être un « produit de comblement » idéal, de par sa facilité de prélèvement, sa malléabilité, son utilisation autologue et sa capacité à sécréter de nombreux facteurs de croissance qui facilitent la vascularisation et augmentent la production de collagène. Il est notamment très utilisé pour le rajeunissement du visage, ou le remodelage de n'importe quelle partie du corps. Ces techniques sont communément appelées « lipofilling », « lipomodelage » ou « lipostructure ». Il s'agit d'une véritable « greffe de tissu adipeux », autologue. Dans cette application, l'apport de la greffe de tissu adipeux en chirurgie Plastique Réparatrice et Esthétique est considérable, que ce soit pour ses qualités volumétriques ou pour son action sur la trophicité cutanée.

Dans cette technique chirurgicale, trois étapes entrent en jeu : le prélèvement de TA, sa purification et la méthode de réinjection. La qualité de ces trois étapes est capitale pour la qualité du résultat lors de sa réalisation.

Cette technique n'est que partiellement protocolisée. On sait qu'une certaine partie de tissu adipeux réinjectée ne survit pas et disparaît mais les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir la quantité exacte de graisse réinjectée qui restera vivante et perdurera dans le temps.

Ceci soulève plusieurs questions pratiques :

- Quel type d'injection au niveau du site donneur doit être réalisé avant le prélèvement de graisse (xylocaïne, naropéïne, adrénaline, sérum) ?
- Quel est le type de canules (diamètre, nombre et taille des trous) et de seringues sont à utiliser lors du prélèvement et quelle dépression doit y être appliquée pour recueillir et conserver le maximum de cellules vivantes pendant le prélèvement de graisse ?
- Les appareils de lipoaspiration (appareils qui permettent des prélèvements de tissu adipeux de grands volumes) peuvent-ils recueillir des cellules vivantes ?
- Quelle est la meilleure topographie anatomique à privilégier lors d'un prélèvement de tissu adipeux ?
- Lors de la purification graisseuse, existe-t-il une méthode supérieure à une autre permettant un recueil de cellules en plus grande quantité et de meilleure qualité ? Il existe en effet au moins trois techniques pour purifier la graisse : la centrifugation (entre 1 et 3 minutes), la décantation et le lavage sans que des études comparatives aient permis de savoir si l'une est meilleure.
- Quel type de canule et de seringue faut-il utiliser lors de la réinjection ?

L'histoire de l'auto transplantation du tissu adipeux débute vers la fin du 19^{ème} siècle. En 1883, NEUBER réalise la première greffe de TA en prélevant 1cm³ de

graisse prise au niveau d'un avant-bras pour combler une cicatrice faciale secondaire à une ostéite tuberculeuse. La première utilisation d'un lipome en guise de transplant graisseux est réalisée par CZERNY en 1893 et publiée en 1895 après 18 mois de recul. Un lipome de la fosse lombaire est utilisé pour reconstruire un sein chez une femme de 41 ans après mastectomie sous cutanée suite à une mastite chronique polykystique. Il s'agit ici de la première reconstruction mammaire publiée connue. LEXER en 1910, est le premier à proposer cette technique à visée esthétique et popularise la méthode. Il écrit un recueil de 300 pages consacré à l'auto transplantation de tissu adipeux. Les zones injectées sont la face, la région génienne, la région malaire ou le sillon naso-génien. Nous pouvons donc considérer que l'auto-transplantation de tissu adipeux débute au 19^{eme} siècle mais ce n'est qu'au 20^{eme} siècle que ILLOUZ (14), en 1977, découvre et décrit la lipoaspiration par canulation. Il permet aux chirurgiens l'obtention de graisse de manière efficace, rapide et fiable. FOURNIER, en 1986, propose des injections de graisse non purifiée, en utilisant les hernies graisseuses réséquées lors d'une blépharoplastie esthétique pour combler les sillons naso-géniens et glabellaires. ELLENBOGEN, en 1986 (15) se propose de traiter des rides par injection de graisse, de très petit diamètre, en prétraitant les greffes par de l'insuline. En 1994, COLEMAN (16) décrit un protocole d'injection de graisse selon une méthode extrêmement précise et publie des résultats remarquables. Cette protocolisation de technique opératoire permet alors d'obtenir des résultats plus stables et plus reproductibles. Mais le chirurgien ne peut anticiper la quantité de graisse réinjectée qui persistera alors sur le site receveur.

3.LE PRP LE PRF

3.1.Rappel sur les plaquettes

Les plaquettes sanguines ou thrombocytes sont des éléments figurés du sang. Elles naissent dans la moelle osseuse par fragmentation des mégacaryocytes. Les plaquettes sont donc des « cellules » sans noyau. Elles passent alors dans la circulation sanguine où elles joueront leur rôle hémostatique. Leur durée de vie moyenne est de 8 jours. Leur lieu de dégradation est la rate. Une plaquette mesure de 2 à 4 micromètres. Elle comporte une membrane sur laquelle sont situés des récepteurs des facteurs de coagulation et des protéines qui jouent un rôle important dans l'adhésion plaquettaire au vaisseau sanguin.

La valeur normale du taux plaquettaire s'échelonne entre 160 000 et 500 000 par mm³. Ce taux varie en fonction de l'âge. Il est également plus faible en cas de grossesse ou de consommation d'alcool. Cette valeur peut être plus élevée en cas d'effort prolongé ou de séjour en altitude ou encore en situations pathologiques hématologiques.

La fonction biologique des plaquettes est une action hémostatique. Elles forment le clou plaquettaire qui obture les brèches se produisant sur les parois vasculaires (hémostase primaire). Les plaquettes n'agissent pas seules, elles interagissent avec des facteurs vasculaires (endothélium, vasoconstriction, hémodynamique), avec les autres cellules sanguines (notamment les globules rouges) et avec les facteurs enzymatiques de la coagulation (prothrombine, fibrinogène) et de la fibrinolyse. En cas de brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent à l'endothélium lésé (rôle important du facteur Von Willebrand endothélial et plaquettaire) et sécrètent des facteurs (ADP, Thromboxanes, PAF, etc.) favorisant leur recrutement et leurs liens entre elles, c'est à dire leur agrégation en un thrombus. Lors de la formation de ce thrombus, les plaquettes libèrent des enzymes activant la coagulation, notamment la transformation de la prothrombine en thrombine, elles sont ensuite impliquées dans la rétraction du caillot. Les plaquettes jouent aussi un rôle dans l'imperméabilité vasculaire. En cas de thrombopénie, les microvaisseaux deviennent perméables, les globules rouges traversent plus facilement la paroi vasculaire et cette extravasation sanguine est responsable du phénomène clinique du purpura. Les plaquettes, non consommées par le clou plaquettaire, sont détruites par les macrophages de la rate et du foie.

Une diminution du taux de plaquettes trop importante entraîne un risque hémorragique. Une augmentation du taux de plaquettes entraîne à l'inverse un risque de thrombose par formation d'agrégats plaquettaires.

Leur étude ultrastructurale révèle des granulations dont on distingue trois types : alpha, denses et lambda.

- **Les granulations alpha** contiennent les facteurs de coagulation (fibrinogène, facteur de Willebrand), la fibronectine et des facteurs de croissance (PDGF, VEGF, EGF, IGF, TGF...) ainsi que de l'albumine et des immunoglobulines. Leur rôle est important dans notre travail, ce sont ces granulations qui libèrent des facteurs de croissance à partir des concentrés plaquettaires utilisés dans les techniques de culture cellulaire réalisées pour ce travail.
- **Les granulations denses** contiennent du calcium, de l'ADP (nécessaire à l'agrégation plaquettaire) et de la sérotonine (activateur la vasoconstriction).
- **Les granules lambda** correspondent aux lysosomes impliqués dans la lyse des thrombi.

3.2. Concentrés plaquettaires, PRP (Platelet Rich Plasma)

3.2.1. Définition PRP : Plasma Riche en Plaquettes

Le PRP est un concentré plaquettaire autologue liquide obtenu par prélèvement

sanguin. Ce prélèvement sanguin est ensuite centrifugé afin de concentrer le taux de plaquette dans le plasma. Ce sont ces plaquettes qui libèreront les facteurs de croissance actifs et qui seront utilisés dans les milieux de culture.

Les études *in vitro* sur le PRP ont démontré la présence de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la régénération tissulaire tels que :

- le PDGF-AB, PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor),
- le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1),
- l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor),
- le FGF-b (Fibroblast Growth Factor-basic) et
- le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
- ECGF (Epidermal cell growth factor)
- PD-EGF (Platelet-derived epithelial growth factor)
- IL-12 (Interleukine 12)

(17).

3.2.2. Préparation et analyse du PRP

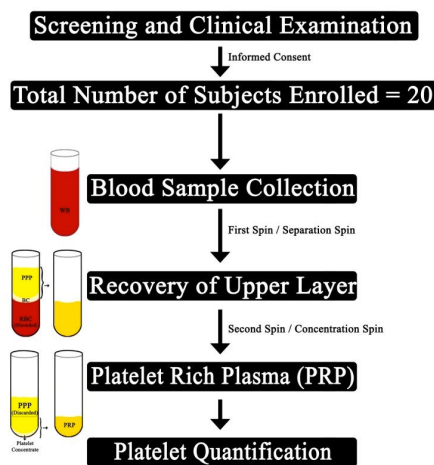


Figure 20 : préparation du PRP

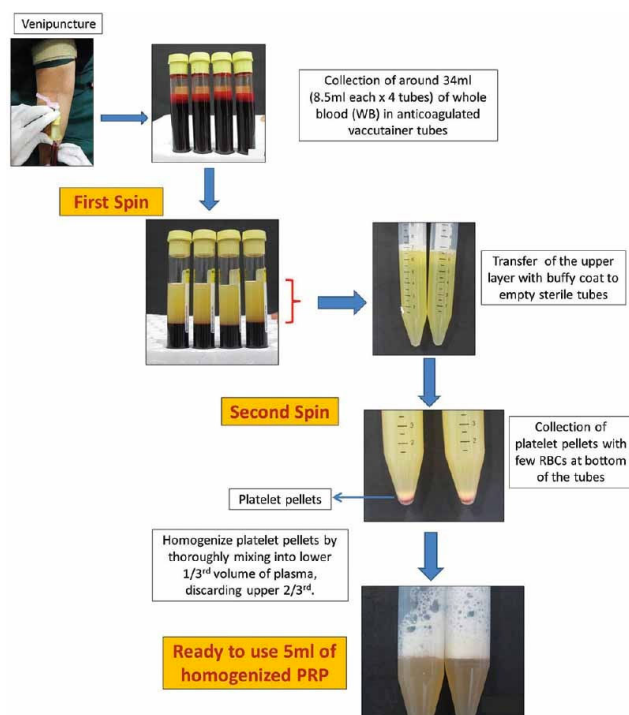


Figure 21 : préparation du PRP

Initialement, les concentrés plaquettaires, PRP, ont été utilisés en hématologie pour le traitement des hémorragies d'étiologie centrale type thrombopénie grave.

Les concentrés plaquettaires ont été nommés initialement PRP de manière arbitraire.

Selon les auteurs et les fabricants de matériel, ces concentrés plaquettaires ont plusieurs dénominations: **PRP** (Platelet Rich Plasma ou Plasma Riche en Plaquettes), **cPRP** (concentrated PRP), **PRGF** (Plasma Rich in Growth factors, plasma riche en facteurs de croissance), **sang autologue**. Nous verrons que ces concentrés sont variables dans leur composition, en terme de concentration en facteurs de croissance, en fibrinogène, en plaquettes, voir par la présence de leucocytes ou de granulocytes, ou encore de l'utilisation d'un activateur.

Sabarish, en 2015, analyse trois méthodes, celle de Marx, celle de Okuda (18,19, 20, 21) et celle de Landesberg. Il étudie 60 concentrés plaquettaires issus de 60 prélèvements sanguins et réalise un comptage plaquettaire de chaque méthode. Il retrouve une différence significative en fonction de la méthode utilisée et retrouve comme résultat un taux de plaquette plus important si la centrifugation est douce comme dans la méthode de Marx (1000 tours par minute permettant d'obtenir un meilleur taux de plaquettes que 2300 tours par minute). La méthode de Marx obtenant 160% de plaquette en comparaison à la méthode de Landesberg qui n'en obtient que 125% par rapport au sang total. Mais la concentration plaquettaire joue-t-elle un rôle dans l'action du PRP. Le taux de facteurs de croissance est-il en rapport avec le taux de plaquette dans le PRP ? Quel rôle jouent les facteurs de croissance ?

De nombreux auteurs s'accordent à dire que la préparation du PRP joue un rôle

prépondérant dans le PRP obtenu. Afin de pouvoir comparer les études de manière scientifique, il est désormais admis que les PRP étudiés doivent faire l'objet d'analyse précise quant à leur taux de plaquettes, leur taux de facteurs de croissance, la présence ou non de globule blanc et la manière dont les facteurs de croissance sont activés. (22)

Différentes études ont montré que le taux de plaquettes varie selon le prélèvement sanguin total. La question est alors de savoir si l'on peut définir un taux de plaquette idéal permettant une action optimum du PRP dans l'application qui en est faite ? Ce taux plaquettaire serait de l'ordre de de 3 à 4 fois supérieur à la valeur de sang total avant préparation. (23)

Différentes études indiquent que l'effet sur la prolifération cellulaire est plutôt négatif lorsque le taux de plaquettes est soit inférieur à 2 fois, soit supérieur à 8 fois le taux dans le sang total. (24)

La question a été posée de l'intérêt ou non de la présence de leucocytes dans les prélèvements de PRP. Mariani en 2015 ne montre pas d'activité microbicide supérieur avec un PRP contenant des leucocytes. (25)

Concernant l'influence de la méthode d'activation (dégranulation des plaquettes) sur la concentration en facteurs de croissance du PRP, Sonker et Dubey (26) montrent une différence significative entre les résultats de l'utilisation du froid ou de l'ajout de calcium : le taux de PDGF est plus élevé lorsque l'activation est réalisée par le calcium, les taux d'IGF et TGF- β 1 sont plus élevés en utilisant l'activation par le froid. (26)

Il est également admis que la sécrétion des facteurs de croissance par les plaquettes débute 10 minutes après l'activation de celle-ci. La dégranulation complète de 95 % des plaquettes est obtenue au bout d'une heure.

Les facteurs de croissance présentant une demi-vie courte, il est primordial de repousser leur activation juste avant leur application sur le site chirurgical. (27)

C'est en 2009 que Ehrenfest et al. décrivent les quatre familles de concentrés plaquettaires. (28)

Le P-PRP, Plasma riche en plaquette pur ou PRP pauvre en leucocyte.

Le L-PRP, préparation contenant des leucocytes. C'est cette famille de PRP qui est la plus répandue dans les formes commerciales actuelles.

Le P-PRF, gel de PRF sans leucocytes.

Le L-PRF, gel de PRF de seconde génération contenant des leucocytes.

Les deux premiers sont des PRP, les deux derniers sont des PRF.

Dhurat, en 2014, publie les différents principes et méthodes de préparation du PRP et du PRF. (29)

Les procédures de fabrication du PRP.

Selon les méthodologies employées, le PRP peut être obtenu à partir d'une seule ou de deux procédures de centrifugation successives. Le taux de plaquettes résultants de ces préparations est plus ou moins important.

La méthode générale de fabrication du PRP peut être décrite comme suit.

- Le premier temps est un prélèvement sanguin par ponction veineuse sur tube contenant du citrate de dextrose acide (ACD), son action anti-coagulante permet la

non dégranulation des plaquettes. Celles-ci ne sont alors pas activées et ne libèrent pas les facteurs de croissance contenus dans les granules.

- Le second temps consiste en une centrifugation forte immédiate sans refroidissement permettant de séparer les globules rouges et le plasma concentré en plaquette. Le surnageant, qui contient du plasma avec les plaquettes, est alors récupéré dans un tube stérile.

Après une première et unique centrifugation, certains laboratoires utilisent et nomment le liquide obtenu PRP. Ce liquide obtenu est moins concentré en plaquette mais contient des facteurs de croissance.

- Le troisième temps consiste en une seconde centrifugation douce permettant de séparer le PPP plasma pauvre en plaquettes et le PRP plasma riche en plaquettes. Le PRP peut alors être récupéré et est prêt à l'utilisation.

L'activation du PRP peut être obtenue par l'adjonction de calcium, de thrombine ou par congélation-décongélation.

Le PRP est commercialement disponible auprès de nombreux fournisseurs. Nous citerons : Biomet GPS II et III, Harvest SmartRep 2 APC, ArterioCyte-Medtronic Magellan, Artrex ACP, Cascade PRP Therapy, Biomed supplies, Manson OEM medical, Zibo Gufeng Medical Products, Shanghai cheer Instrument, Changsha Xiangzhi centrifuge Instrument, Hunan Xingke Scientific Instrument, Cence Medikal Ve Ticaret Limited Sirketi, Boitech Institute Victoria, Laboratoire RegenLab. Les caractéristiques du produit sont données en fonction de la vitesse de centrifugation (100 à 3000 G), du temps de centrifugation (de 3 à 20 minutes), de la présence ou non d'anticoagulant.

La technique de prélèvement du sang engendre également des modifications. La température de prélèvement modifie les propriétés : une température entre 21 et 24 °C est considérée comme correcte, sans activation des plaquettes.

Le type d'anticoagulant utilisé lors de la préparation engendrerait également des modifications. Il est recommandé d'utiliser le citrate de sodium plutôt que l'EDTA qui endommagerait la membrane des plaquettes.

Magalon et al. publient, en 2014, une étude visant à comparer 5 procédés de fabrication de PRP. Les résultats montrent des différences significatives très importantes en fonction de la procédure utilisée. Il conclut en disant que ces différences retrouvées permettent d'expliquer les différences de résultat quant aux bénéfices cliniques retrouvés dans la littérature. (30)

3.3. Les concentrés plaquettaires PRF (Platelet Rich Fibrine)

3.3.1. Définition du PRF (Fibrine Riche en Plaquettes)

Le PRF est un gel de fibrine contenant des facteurs de croissance provenant des plaquettes. Ce gel est obtenu, comme le PRP, par prélèvement sanguin veineux sur tube sec sans anticoagulant et une seule centrifugation qui doit être réalisée immédiatement après le prélèvement sanguin. (figure 22)

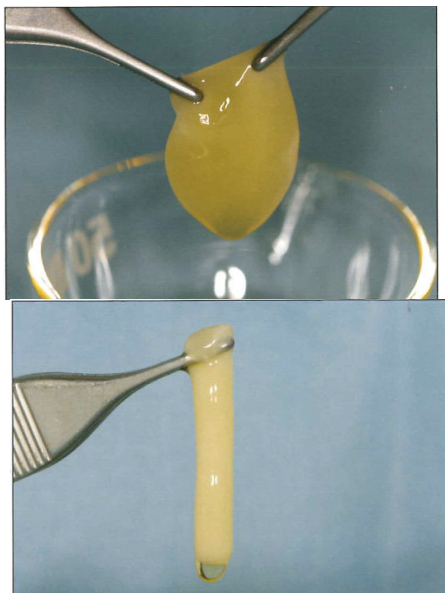


Figure 22 : PRF : gel de fibrine

3.3.2. Préparation et méthode de fabrication du PRF

Le protocole consiste à prélever du sang par ponction veineuse sur un tube sec, sans utiliser d'anticoagulant.

Le prélèvement sanguin obtenu est alors centrifugé immédiatement 10 minutes à 3000 tours par minute.

Trois fractions sont alors obtenues : une partie basse avec les globules rouges, une partie haute avec le plasma pauvre en plaquettes (PPP) et entre ces deux fractions un caillot de fibrine (le PRF) qui contient les facteurs de croissance.

Nous ne citerons que deux laboratoires Process et Anitua.

La spécificité de cette technique repose sur l'absence d'anticoagulant qui induirait l'activation d'une grande partie des plaquettes et par la suite la dégranulation des granules α et la libération des facteurs de croissance.

Une autre particularité concerne la polymérisation naturelle du fibrinogène par la thrombine présente dans le prélèvement au cours de la centrifugation. Ceci modifie l'organisation tridimensionnelle du réseau de fibrine, donne une préparation sous forme de gel et favoriserait la fixation des facteurs de croissance dans le réseau de fibrine. (31, 32, 33, 34)

3.4 Données cliniques de la littérature sur PRP et PRF

C'est dans le domaine d'application de la chirurgie maxillo-faciale que la bibliographie est la plus riche sur l'effet cicatrisant du PRP, avec une première publication de H. Matras en 1985 et depuis 2000 de nombreuses publications de Marx RE, J. Choukroun etc. (35, 36, 37)

Les études publiées dans le domaine de la traumatologie du sport sont aussi

nombreuses, cherchant à démontrer l'efficacité des injections de PRP dans les lésions musculaires, les tendinopathies chroniques et dans de nombreuses indications chirurgicales. (38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47)

La **tendinopathie épicondylienne** a fait l'objet de plusieurs études, nous retiendrons celles d'Al Mishra et Pavelko et d'Edwards SG et Calandruccio. Les patients traités par PRP sont des patients qui ont eu un traitement médical bien conduit, incluant la kinésithérapie, les infiltrations et la contention. Le diagnostic est confirmé par une IRM ou une échographie. Le traitement par PRP est toujours suivi du protocole habituel de renforcement musculaire excentrique et retour progressif aux activités en 6 à 8 semaines. L'étude de Mishra et Pavelko en 2006 inclut 20 patients, 15 traités par PRP et 5 pour le groupe contrôle traités par la seule injection d'un anesthésique local. Dans le groupe traité, il note 60% d'amélioration à 8 semaines, 81% à 6 mois, 93% en fin de suivi (12-38 mois). 3 patients du groupe contrôle sont sortis de l'étude ne permettant pas de faire une étude comparative. Edwards et Calandruccio en 2003 rapportent 79% de bons résultats sur une étude incluant 22 patients traités par du sang total non centrifugé, sans groupe contrôle.

La **tendinopathie achilléenne** est souvent retrouvée en pathologie sportive, avec un échec fréquent des traitements conservateurs, 25% et 45% selon les études, offrant au PRP une prometteuse alternative au traitement chirurgical. Elle regroupe plusieurs entités, la tendinopathie corporéale, l'entésopathie et la péricapitulation, parfois associées. La tendinopathie corporéale est générée par des micotraumatismes répétés sur une zone hypovascularisée, conduisant parfois à la rupture. L'hypothèse est que le PRP pourrait permettre la revascularisation et améliorer la cicatrisation tendineuse. Une étude de R.J. de Vos retient notre attention, randomisée, en double-aveugle, avec un groupe traité (27 patients) et un groupe contrôle (27 patients traités par solution saline), avec des résultats équivalents dans le groupe traité et le groupe témoin. Deux reproches peuvent être fait sur le protocole thérapeutique, l'utilisation d'un anesthésique local qui perturberait l'efficacité du PRP et un traitement unique par PRP alors que les recommandations, issues des analyses histologiques, recommandent 3 injections à une semaine d'intervalle. Miquel Sanchez a publié une petite série en 2007, utilisant le PRP comme adjuvant chirurgical dans la rupture du tendon d'Achille.

La **fasciite plantaire** a fait l'objet d'une publication par Barret et Erredge en 2004 sur une petite série de 9 patients résistants au traitement médical habituel, injectés sous contrôle échographique, obtenant 77,9% de guérison à 1 an, sans groupe contrôle. Le traitement médical n'incluait pas le traitement par ondes de choc extracorporelles qui donnent d'excellents résultats et doit être un préalable au PRP. R.J. Devos a retenu 3 études (kiter, kalaci, lee) pour leur méthodologie de qualité, avec des résultats mitigés. (48)

Graziani a étudié l'action *in vitro* des concentrés plaquettaires sur les ostéoblastes et les fibroblastes. Il a mis en évidence le rôle stimulateur du PRP sur la prolifération

cellulaire, particulièrement nette à 72 heures, maximum pour une concentration plaquettaire de 2,5x des concentrations plus élevées réduisent cette prolifération. Cette étude est un élément de réponse dans le choix de la concentration en plaquettes à utiliser dans les protocoles thérapeutiques. (49)

Concernant le traitement de l'**arthrose**, l'utilisation des concentrés plaquettaires dans l'arthrose et les chondropathies intéresse de nombreux auteurs, cherchant à préciser leur mode d'action et à comparer leur efficacité par rapport aux injections d'acide hyaluronique. Graziani (49) dans son étude *in vitro* a confirmé le rôle stimulateur du PRP sur la prolifération cellulaire d'une culture d'ostéoblastes et de fibroblastes sains.

Gerben M. van Buul et al (51) ont étudié l'effet des concentrés plaquettaires (6x) sur des cultures de chondrocytes humains issus de genoux arthrosiques pour analyser l'effet du PRP sur le cartilage dégénératif puisque de nombreuses études ont montré les effets anabolisants du PRP sur le chondrocyte sain. Tout l'intérêt de cette étude est d'analyser l'effet du PRP sur le cartilage dégénératif. La mise en évidence d'une inhibition des processus inflammatoires encourage son utilisation dans l'arthrose.

E. Anitua et al (52) a observé l'effet du PRGF (concentré plaquettaire 2 à 3x) sur des chondrocytes issus d'articulations arthrosiques. Il a mis en évidence un rôle stimulateur sur la sécrétion d'acide hyaluronique et l'angiogénèse.

Sanchez et al (53) ont étudié de manière prospective, l'efficacité de l'injection intra articulaire de PRGF dans la gonarthrose sur 30 patients, comparée à un groupe contrôle de 30 patients traités par l'injection intra articulaire d'acide hyaluronique, à raison de 3 injections à une semaine d'intervalle. Ils concluent à 33,4% de résultats positifs sur la douleur à 5 semaines dans le groupe PRGF et 10% dans le groupe acide hyaluronique. Les effets bénéfiques à 6 et 12 mois n'ont pas été analysés, relativisant l'intérêt de cette étude.

Elizaveta Kon et al (50) ont analysé l'efficacité d'un traitement par PRP versus acide hyaluronique dans le genou atteint d'arthrose ou de chondropathie dégénérative. L'analyse porte sur 3 groupes homogènes de 50 patients traités soit par un AH à bas poids moléculaire (AHBP), soit par un AH à haut poids moléculaire (AHHP), soit par le PRP. Le protocole retenu consistait en l'injection de 5 ml de concentré plaquettaire (6x, anticoagulé et activé), 3 fois à 14 jours d'intervalle. Les patients ont été évalués par le score IKDC (score fonctionnel) avant traitement, à 2 mois et à 6 mois. Les résultats montrent une efficacité plus grande et plus prolongée du traitement par PRP chez les patients plus actifs et avec des lésions moins évoluées. Les résultats à 6 mois du traitement par PRP ou AH (acide hyaluronique) sont comparables chez les sujets plus âgés. Les auteurs ont fait le choix d'une concentration en plaquettes nettement plus élevée que dans l'étude *in vitro* de Graziani. La concentration idéale en plaquettes n'est peut-être pas la même selon les indications thérapeutiques et les sites d'injection.

Ces nombreuses publications montrent un intérêt majeur quant à l'utilisation des concentrés plaquettaires autologues. Ils tentent également de montrer une certaine efficacité.

En ce qui concerne les études sur le PRF, la majeure partie proviennent de Dohan et Choukroun. L'intérêt de l'utilisation de ce type de concentré réside dans sa présentation en gel car il peut alors être utilisé comme une compresse sur des plaies, et du fait qu'il délivre, semble-t-il, ses facteurs de croissance de manière prolongée en 15 jours, les facteurs de croissance et les cytokines étant physiquement piégés à l'intérieur du gel.

(50 à 64)

3.5 Conclusions sur l'utilisation des concentrés PRP et PRF

L'utilisation du PRP et du PRF remonte à près de 30 ans et débute en chirurgie maxillo-faciale. Son utilisation s'est largement répandue en traumatologie du sport depuis une dizaine d'années, comme alternative à la chirurgie ou comme adjuvant chirurgical. De nombreuses études ont été réalisées, peu de qualité irréprochable (petites séries, pas de groupe contrôle). Des succès, très médiatisés, chez des sportifs de haut niveau puis la suppression de la liste des substances et méthodes interdites par l'AMA fin 2010 ont fait naître un engouement important pour cette technique.

Les risques de complications liées à l'utilisation du PRP sont faibles, du au fait qu'il s'agisse d'un produit autologue excluant tout problème de rejet ou d'allergie. Le risque majeur de cette technique est infectieux mais ce risque est probablement inférieur à celui des infiltrations de corticoïde du fait des propriétés bactériostatiques du PRP et de l'utilisation d'un matériel en circuit fermé lors du prélèvement à l'injection. Quant à l'effet tératogène de l'injection de facteurs de croissance autologues il est pour l'instant théorique et n'est jamais publié.

Les concentrés plaquettaires, nous l'avons vu, ne sont pas standardisés, tant sur la concentration en plaquettes et en facteurs de croissance, la présence ou non de leucocytes ou de granulocytes, que l'activation ou non par le chlorure de calcium. Les protocoles thérapeutiques sont variables, l'utilisation d'un anesthésique local, le nombre d'injections (1 à 3), le délai entre chaque injection et dans les lésions musculaires le délai par rapport aux lésions initiales sont mal définis. Le guidage par l'imagerie du geste est inconstant. Les méthodes d'évaluations sont inconstantes.

Selon l'étude de Graziani (49) l'effet sur la prolifération cellulaire serait maximum pour des concentrations plaquettaires à 2,5x, réduit pour des concentrations plus élevées, rejoignant en ce sens d'autres auteurs en particulier Weibrich. Mais il semble plus vraisemblable que l'analyse de la composition du PRP étudiée nous permettra de connaître les effets obtenus en fonction de la composition et des taux de facteurs de croissance et de cytokines.

Il est indispensable de mieux connaître la composition des différents concentrés plaquettaires, de comparer leur efficacité, de préciser les protocoles thérapeutiques et de mieux en définir les indications afin que le PRP et le PRF puisse être utilisé lors de protocole établi.

4. Quelles sont les données scientifiques récentes sur l'amélioration potentielle de la prise de TA lors d'un lipofilling. (PRP, SVF et ASCs)

La méta analyse de Sasaki H, la plus récente, publiée en 2015 porte sur 276 articles. Il nous précise que depuis 2011, 1863 articles ont été publiés sur la transplantation de tissu adipeux et 37 articles, 5 études cliniques humaines et 32 études expérimentales comparatives portant sur le TA humains sont des « evidenced-based publications ». Cette publication démontre à quel point la recherche actuelle, portant sur le TA et les ASC, est source d'intérêt et d'actualité.

Les études portant sur les différentes méthodes de prélèvement de TA sont retranscrites dans la méta analyse de Cleveland de 2015 (65). Elles sont nombreuses, la méthode de coleman nécessitant une centrifugation de 3 minutes à 3000 tours minutes, la méthode de décantation, la méthode de filtration ou lavage. La méta analyse de Cleveland ne permet pas de démontrer la supériorité d'une technique pour l'instant. Sa conclusion est donc que de nouvelles études cliniques sont donc encore nécessaires. (65)

4.1. Analyse de l'association avec le TA *in vitro* de PRP SVF ASCs

La greffe de tissu adipeux autologue est désormais une thérapie standard en chirurgie plastique de par ses effets trophiques et volumétriques.

Le taux de prise de graisse est non prédictif en préopératoire et ce point fait l'objet de nombreuses recherches. L'utilisation de la SVF et du PRP semble être cependant prometteuse afin d'améliorer le taux de prise de la greffe de TA.

Kölle et al, en 2015 (66), dans le Lancet, montrent que la prise de graisse est améliorée lorsque celle-ci est supplémentée en ASCs. Il s'agit d'une étude prospective randomisée en triple aveugle. Une lipo-aspiration est réalisée chez 13 patients avec prélèvement de TA à J0 et préparation *ex vivo* de ASCs. 14 jours plus tard, une nouvelle lipo-aspiration est réalisée chez les mêmes patients avec prélèvement de tissu adipeux seul. Deux groupes sont mis en place. Un groupe contrôle avec réinjection de 30 ml de graisse seul. Un autre groupe recevant le TA enrichi en ASCs (20×10^6 cellules par cc de TA). Les réinjections de TA ont lieu en face postérieure de bras. L'étude a pour objectif de mesurer le volume obtenu de TA à J0 et à quatre mois par IRM.

Les résultats montrent une augmentation drastique de la prise de graisse lors de l'enrichissement du tissu adipeux par ASCs, 80,9% de prise dans le groupe enrichi

versus 16,3% dans le groupe non enrichi. (66)

Garza et al dans le PRS, en 2015, étudient le devenir des ASCs transplantées chez la souris. Le TA est enrichi en ASCs marqués par une protéine fluorescente. Cette préparation est injectée sous le scalp. L'analyse est réalisée à J1, J5 et J10 sur ce transplant. Les résultats montrent que les ASCs meurent rapidement puisque les protéines marquées diminuent à partir de J5. (67,68)

Ils en concluent que si la prise de tissu adipeux est meilleure quand le TA est enrichi en ASCs c'est vraisemblablement en raison du rôle angiogénique des ASCs.

Modaressi et al en 2013 et 2015 étudient le meilleur milieu de culture des ASCs. Il semble montrer que le PRP peut remplacer le sang de veau fœtal (SVF) et montrent une meilleure prolifération cellulaire en présence de PRP.

Ils analysent ensuite dans leur second article la prolifération cellulaire, le phénotype cellulaire, la capacité à être multipotente et la stabilité chromosomique des trois groupes. Le groupe 1 contenant du TA avec 10 % de SVF (facteur vasculaire stromal), groupe 2 du TA associé à du PRP non activé, et groupe 3 contenant du TA associé à du PRP activé par de la thrombine. Le groupe 2 contenant du PRP non activé serait le plus efficace sur la prolifération cellulaire et permettrait une augmentation sur la prolifération. (69,70)

Liu en 2013 étudie chez le lapin le devenir des transplants de TA. Deux millilitres de TA sont injectés, associés dans le groupe témoin à 0.2 ml de sérum, dans le groupe 1 de 2 ml de TA associé à 0.2 ml de SVF, dans le groupe 2 de 2 ml de TA associé à 0.2 ml de PRP et dans le groupe 3 de 0.2 ml de TA associé à 0.1ml de SVF et 0.1 ml de PRP. La SVF contient $4.0 \cdot 10^7$ cellules /ml

Les résultats montrent à quatre semaines et à 24 semaines une augmentation de la neoangiogenèse et une augmentation du volume restant de TA dans le groupe 3 associant TA, SVF et PRP.

Gentile en 2014 étudie chez l'homme l'effet sur des cicatrices faciales post traumatiques ou post brûlures l'injection de l'association de TA seul, TA et SVF, et TA associé au PRP. Ces résultats montrent une amélioration lors de l'association de PRP. (71)

Cervelli et al analysent en 2012 l'action du PRP sur l'effet adipogénique c'est à dire sur la différenciation des cellules souches. L'étude montre une potentialisation de cet effet adipogénique en présence du PRP. (72)

Cervelli et al analysent en 2014 l'action potentielle du PRP chez les patients présentant une alopecie. Les données présentées montreraient une augmentation de la repousse des cheveux. Il confirme ces données en 2015 et 2017. (73, 74, 75)

Une étude également intéressante publiée en 2012 par Fukaya tenterait à montrer que le PRP empêcherait l'apoptose des cellules pre adipocytaires. (76)

Li et al, en 2015, ont publié une étude réalisée chez la souris analysant l'amélioration de prise de greffe de la graisse si on y associe des volumes différents de PRP. Cette étude, réalisée chez la souris évalue l'influence du PRP à 0%, 10%, 20%, 30%. Cette analyse porte sur 3 mois et tente à montrer que l'association de PRP de 20 ou 30% améliorerait le taux de prise de graisse. (77)

Deux études animales similaires (78, 79) testent la transplantation en sous cutanée dorsale de TA seul, de TA avec ASCs, de TA avec PRP et de TA avec ASCs et PRP.

Elle tend à montrer que l'association ASCs et PRP permet une meilleure survie du TA.

Seyhan N et al, en 2015, présentent une étude similaire mais portant sur environ 400 souris repartis en 4 groupes. Cette étude présente la particularité très intéressante d'analyser les composants du PRP (VEGF TGFb FGF). Il montre que la présence d'un taux élevé de facteurs de croissance présente une relation avec la survie des adipocytes et le nombre de micro vaisseaux. (80)

Willemsen publie en 2013 une étude portant sur ses résultats, à long terme, d'augmentation glutéale par transfert de TA couplé à du PRP (moyenne de 44 mois). La moyenne de transfert de TA par patient était de 481cc. Cette étude montre une meilleure prise lors de la présence de PRP mais ces résultats sont obtenus par réponse à un questionnaire adressé aux patients. (81)

La même équipe publie en 2014 (82) une étude clinique rétrospective portant sur 83 patients ayant bénéficié d'un lipofilling masklifting et analysent les résultats en fonction de l'association ou non de PRP. L'étude tend à montrer que l'ajout de PRP permet des suites opératoires plus rapides et un résultat esthétique meilleur mais cette étude est rétrospective et l'analyse des résultats non quantifiée car portant sur un questionnaire remis aux patients et sur des photos

Sasaki, en 2015, confirme les mêmes résultats en montrant que l'association de TA avec PRP et SVF permet une meilleure prise de graisse à 12 mois lors d'une analyse par photo 3D et que cette association (PRP, SVF,TA) permet de meilleurs résultats. (83)

Toutes ces données scientifiques semblent donc mettre en évidence une amélioration de la prise de greffe de TA lors de son enrichissement en ASCs. En ce qui concerne le PRP, les données scientifiques semblent également montrer une amélioration de la prolifération cellulaire.

De nouvelles voies de recherche sont également en cours d'exploration.

Sur modèle animal, Jung et al (85) analysent l'effet de l'oxygène sur les résultats de la transplantation de TA chez la souris en comparant 4 sous groupes recevant lors de la transplantation des microsphères d'oxygène et des ASCs. Les groupes où la survie de TA transplanté a la meilleure survie sont ceux chez qui ont associé soit des ASCs seules soit des ASCs et des microsphères d'oxygène. Le groupe ayant reçu des microsphères d'oxygène seules présente une réduction de la néoangiogénèse. Les auteurs concluent à une toxicité de l'oxygène. Ils conseillent de mesurer la concentration en oxygène lors de ce type de transplantation car un taux d'oxygène trop élevé peut fragiliser la prise de TA si la néo angiogénèse est réduite.

Une étude réalisée par Choi et al, en 2014, analyse la multiplication des ASCs soumis à des **taux d'oxygène différents**. Il est connu que dans l'atmosphère la concentration d'oxygène est à 21 % ce qui correspond aux conditions *in vitro*. La concentration en oxygène est, quant à elle, environ de 2 % dans les conditions *in vivo*. L'analyse de Choi porte sur le taux de prolifération et les dommages causés sur l'ADN lors de modification du taux d'oxygène. Les résultats montrent qu'en hypoxie (2% d'oxygène) c'est à dire lors des conditions *in vivo*, il existe un meilleur

taux de survie, un meilleur taux de prolifération et moins de dommages d'ADN des ASCs. (86)

Pike S et al s'intéressent à l'action potentielle du **tamoxifène** sur les ASCs. (traitement hormonal le plus couramment prescrit pendant 5 ans lors du cancer du sein hormono-dépendant). Il étudie *in vitro* l'effet sur la prolifération et la différenciation cellulaire des ASCs à des taux de concentrations différentes de tamoxifène. Il montre que le tamoxifène engendre une diminution de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'auteur conclut que le transfert graisseux chez des femmes traitées par du tamoxifène aurait vraisemblablement une prise de greffe de moins bonne qualité et engendrerait également de moins bonne cicatrisation. (87)

Jun-Jiang C analyse l'**action du VEGF 165** sur les ASCs afin de savoir si ce facteur de croissance pourrait permettre d'améliorer la prise de greffe de graisse. Il conclut en indiquant que le VEGF 165 permet une augmentation significative de la prolifération cellulaire des ASCs. (88) L'objectif étant d'améliorer la néovascularisation.

Jiang et al analysent un autre facteur de croissance, le **FGFb**, fibroblastic growth factor, lors d'un transfert graisseux chez la souris. Les résultats sont analysés à trois mois. L'association TA enrichi en ASCs et FGFb retrouve moins de fibrose et une augmentation de la néoangiogénèse. Il montre que le FGFb permet une augmentation du taux de survie du TA, une augmentation des facteurs angiogéniques et de la vascularisation. (89)

Park et al analysent la différenciation adipogénique des cellules ASCs en présence de DHEA, d'histamine et d'insuline. Ils notent une meilleure différenciation qu'avec le milieu de référence le DIM.(dexaméthasone, insuline et isobutylmethylxanthine). Ils étudient ensuite chez la souris la prise de greffe obtenue dans ces conditions et décrivent de bons résultats.

Pour Zografou et al (91), la prise de greffe cutanée chez le rat diabétique est meilleure lors de l'adjonction d'ASCs, ainsi que l'épithélialisation et la présence de moins de nécrose. Il en est conclu que ces conditions permettent une augmentation de facteurs de croissance, notamment le VEGF et le TGFb, via une augmentation de la néo angiogénèse et retrouve une augmentation de ce taux de prise chez la souris. (90)

Suga et al (92) analysent l'évolution du taux de survie cellulaire des ASCs associées à la transplantation du TA greffé. Les ASCs sont marquées par une protéine luminescente. Lorsqu'elles sont injectées seules, le suivi de la luminescence montre une diminution graduelle pendant 28 jours, ce qui tend à prouver que les cellules ASCs meurent après transplantation. Par contre, lorsque le TA enrichi en ASCs est transplanté la mort cellulaire est moindre même dans des conditions ischémiques, ce qui laisse à penser qu'il exerce un pouvoir angiogénique permettant une survie accrue de ces cellules.

Cette capacité angiogénique et l'action favorable de l'ischémie sont confirmées par Yuan et al (94) de même que le rôle important des ASCs sur la sécrétion locale de facteurs de croissance.

Tomita et al (95) montrent en plus un effet favorable des ASCs sur la réinervation de

la greffe.

He et al (96) objectivent, de plus, l'effet significativement bénéfique du SVF.

Une étude intéressante menée par Mojallal montre que la prolifération cellulaire des ASCs ne varie pas en fonction de l'âge des patients prélevés ni en fonction de l'indice de masse corporelle de ceux-ci. Les groupes étaient classés par âge, supérieur ou inférieur à 40 ans et IMC, plus de 25 ou moins de 25. (109)

Il étudie également après une injection d'ASCs en intradermique le temps de cicatrisation et retrouve une accélération de la cicatrisation dans le groupe avec ASCs. (110)

En 2017, Mojallal et al analysent la qualité de la SVF obtenue par différentes méthodes et ne retrouvent pas de différences significatives. (111)

Des analyses tentent à montrer également que les ASCs représentent différentes sous populations. Lors de l'analyse de ces sous populations, la taille des ASCs semble permettre de les différencier car elles présentent une fonctionnalité différente en fonction de leur diamètre. Ceci présente une importance toute particulière du fait que, lors de la phase de prélèvement de TA, les canules de prélèvement et notamment la taille des trous des canules permettent de prélever des sous cellules différentes. Ceci nous permet de penser que en fonction de la taille du diamètre des trous des canules, des types cellulaires différents seront prélevés.

L'équipe de Tonnard (112) présente le principe de nanofat. Le TA, une fois prélevé avec des canules de très petit diamètre, va ensuite être émulsifié par 30 passages entre deux seringues. Ceci permettra d'obtenir une émulsion homogène qui pourra être réinjecté dans le derme grâce à des aiguilles de 27 voir 30 gauges. Cette émulsion contient des cellules de 400 à 600 microm. Ils définissent dès lors la nanofat (400 – 600 microm), le millimicrofat (1,2 mm à 600microm), le microfat (1,2mm), le millifat (2,4mm) et le macrofat (plus de 2,4mm).

4.2. Etudes cliniques portant sur la greffe de TA

Une étude clinique pilote chez l'homme traitant les incontinences urinaires est publiée par Kuismanen K et al en 2014. Les ASCs sont directement injectés en transurétrale chez des patientes présentant une incontinence urinaire. Le prélèvement graisseux est réalisé en sous-cutanée. Une prolifération des ASCs est réalisée *in vitro* et réinjectée. L'analyse des résultats fonctionnels est faite à 3, 6 et 12 mois mais ne sont pas statistiquement concluants, ce que les auteurs expliquent par le faible nombre de patients (97).

L'étude de Peltoniemi et al analyse lors d'une transplantation de TA mammaire, la prise de TA, seule ou enrichie en ASCs, obtenus grâce au système de Cytori Celution[®]. L'analyse volumétrique est réalisée grâce à la réalisation d'IRM mammaire. Les résultats ne montrent pas de différences significatives mais il est noté que l'enrichissement en ASCs permet de diminuer notablement les risques peropératoires notamment ceux d'infection. (98)

Deux études intéressantes conduites par l'équipe de Pallua (99, 100) analysent

l'effet du stress sur la prolifération et la différenciation des ASCs. Elles semblent montrer l'action délétère sur la prolifération et la différenciation.

Dong et al (101) s'intéressent au type de cellules survivantes après transplantation en présence de SVF. L'analyse montre que les cellules survivantes sont les cellules marquées CD34+, donc les ASCs. Ces ASCs, après l'apoptose des autres cellules, migrent au 14^{ème} jour à la périphérie de la greffe de graisse. Ces ASCs présentent vraisemblablement une fonction immune, avec un taux d'IL1 et IL6 élevé. Les ASCs que privilégie la présence de SVF représentent donc les cellules importantes dans la prise de greffe du TA.

Keck et al (102) comparent quant à eux la viabilité cellulaire (prolifération et différenciation) suite au prélèvement de TA par lipoaspiration mécanique ou manuelle. Le système de lipoaspiration mécanique utilisé est le système PAL. Il n'est pas noté de différence entre les 2 techniques. En revanche, la force d'aspiration du TA semble jouer un rôle sur la viabilité des ASCs. Il faut privilégier une force d'aspiration douce pour obtenir une meilleure viabilité cellulaire.

Kim et al présentent une étude animale portant sur la SLA (Sclérose latérale amyotrophie) chez la souris. Il montre que la transplantation d'ASCs présente des effets neuroprotecteurs par leur production de facteurs de croissance et de cytokines. Elles diminueraient la progression de la maladie et prolongeraient l'espérance de vie. (103)

Une méta analyse récente (104) fait ressortir l'intérêt d'utiliser le système CAL pour le prélèvement graisseux lors de la procédure de lipofilling. Il ressort de cette étude une meilleure survie cellulaire quantifiée comme de 64% contre 44%.

Une très récente métanalyse sur les greffes de tissu adipeux est publiée par Picard et al (105). Il en ressort que l'adjonction de PRP à 20% permet une meilleure prise de graisse.

Enfin 3 publications très récentes de 2017 s'accordent pour indiquer qu'après centrifugation du prélèvement graisseux la concentration maximum d'ASCs est au niveau de la couche moyenne (106) et que lorsque la protéine chaperonne Hsp70 est surexprimée, la prise de greffe de tissu adipeux est meilleure. (107, 108)

Mojallal et al (113) analysent chez la souris la prise de TA en comparant, la prise de cellules libres (adipocytes matures ou ASCs), du TA purifié ainsi que des ASCs inclus dans du collagène. Il semble mettre en évidence une prise de 0% à 30% d'adipocytes matures, de 60% à 80% de TA purifié et le groupe présentant la meilleure prise étant le groupe de culture d'ASCs inclus dans une trame collagénique.

Eto et al (114) analysent la survie du TA. Pour cela ils analysent une greffe de TA circulaire et retrouvent 3 zones distinctes après greffe : La zone périphérique de survie cellulaire des adipocytes (600microm), la zone plus profonde de régénération cellulaire (1000microm) où les adipocytes meurent et les cellules souches survivent et enfin la zone centrale de nécrose cellulaire où les adipocytes et les cellules souches meurent.

Le site donneur d'ASCs présente-t-il une importance vis à vis de la viabilité des ASCs ? Et le PRP joue-t-il un rôle sur la prolifération et la différenciation cellulaire

des ASCs en fonction de leur site anatomique de prélèvement ?

En conclusion et après analyse de la littérature scientifique, il semble que pour permettre le maximum de préservation de cellules souches et une meilleure prise de TA plusieurs points sont importants.

En premier lieu, lors du prélèvement de TA, il est nécessaire de ne pas utiliser de drogues toxiques. Le second point porte sur le prélèvement de TA, la dépression dans la canule d'aspiration doit être faible et les canules petites. Les manipulations doivent être minimales. Lors de la réinjection de TA, la pression doit être faible, les lobules doivent être le plus petits possibles, la réinjection doit être réalisée en 3D « en chapiteau ».

La greffe de TA semble idéale si le TA est enrichi en ASCs et injecté dans un site bien vascularisé.

OBJECTIFS

Le but de ce projet est double :

1. Analyser le profil de gènes des adipocytes en fonction de leur site anatomique d'origine.
2. Analyser l'action du PRF et du PRP sur les précurseurs adipocytaires.

HISTOIRE DE MA THESE METHODE RESULTATS

Cette thèse a débuté par un intérêt commun de Monsieur Christian DANI et moi-même sur l'adipocyte et leurs cellules souches. J'avais débuté en 2011/2012 un sujet de recherche (PHRC) étudiant chez 80 patients l'intérêt d'utiliser le PRF sur des plaies en espérant pouvoir trouver une accélération de la cicatrisation. Cette étude prospective en double aveugle a retrouvé des résultats significatifs quant à la durée de cicatrisation d'une plaie qui en présence de PRF était moindre. Fort de ces résultats, je souhaitais débiter une recherche *in vitro* sur l'effet du PRP sur les ASCs.

Le laboratoire « cellules souches et différenciation » de Monsieur Dani présentait pour moi un intérêt majeur.

Nous avons rapidement décidé de débiter une recherche ensemble afin d'analyser les cellules souches d'origine adipeuse, de voir si le PRF avait une action sur la prolifération et la différenciation adipocytaire puis d'analyser si ces cellules souches adipocytaires, en fonction de leur site anatomique d'origine, pouvait avoir une fonctionnalité différente.

Ces deux objectifs nous semblaient donc intéressants.

1^{er} objectif :

Le projet de recherche a comme premier objectif de réaliser la caractérisation moléculaire des précurseurs d'adipocyte et des adipocytes en fonction du site de prélèvement sur le corps humain.

La problématique étant :

Existe-t-il un profil de gène différent en fonction de la localisation anatomique des adipocytes prélevés?

Cette analyse a été réalisée par PCR puis par étude affimatrix par microarray de 33000 gènes.

Méthodologie du premier axe de recherche.

Analyse par PCR puis par microarray (étude affimetrix) en établissant une signature moléculaire des deux sites adipeux de prélèvement. Prélèvement de graisse réalisé chez des patients ayant remis un consentement éclairé, de manière prospective. Les prélèvements ont été réalisés simultanément chez un même patient au niveau du genou et au niveau sous mental.

Le projet initial, nous permettant une analyse statistique significative, nécessite une inclusion de 10 patients et donc de 20 prélèvements de graisse. En totalité 40 prélèvements vont être nécessaires et ont été réalisées afin d'obtenir 22 prélèvements exploitables. En effet, 10 prélèvements ont permis à mettre en place tous les temps de prélèvement, d'acheminement au laboratoire, d'analyse, de prolifération et de différenciation.

Tous les résultats présentés ci-après ont fait l'objet d'une publication scientifique en 2017 dans Scientific Reports. Cet article est exposé dans cette thèse.

Analyse transcriptomique affimetrix du tissu adipeux du genou et du menton en analysant l'expression des gènes PAX 3 et HOX et en les comparant.

Les résultats montrent une différence significative d'expression des codes HOX en fonction du site de prélèvement de tissu adipeux.

Nous pouvons voir que HOXC6, HOXA10, HOXC10 sont plus exprimés au niveau du genou.

En revanche, HOXD-AS2, HOXD8, SHOX2 sont plus exprimés sur les prélèvements de tissu adipeux du menton.

Les résultats montrent une différence d'expression des gènes HOX du genou et du menton

Les résultats nous montrent aussi que **PAX3 et UCP1** sont surexprimés dans les prélèvements du **menton** et sous exprimés dans ceux du genou.

La question posée était : Y avait-il eu une contamination musculaire lors du prélèvement de tissu adipeux du menton en peropératoire ?

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées par le laboratoire Galderma.

En conclusion :

Ces données semblent nous montrer que les ASCs provenant de deux sites anatomiques différents auraient une origine embryologique différente. Ils n'expriment pas le même code HOX et PAX3 et n'ont pas le même phénotype. En effet, au contraire du site du genou, le site sous mental exprime UCP1 marqueur spécifique des adipocytes bruns.

Ceci nous permet de penser que l'origine anatomique du prélèvement de tissu adipeux doit avoir un impact quant à sa fonction.

Nous avons étendu l'analyse à d'autres sites adipeux, qui montre un gradient inverse d'expression des gènes HOX et de PAX3 (Foissac et al. PRS, voir en annexe) L'ensemble des ces données, avec celles rapportées par le groupe de Helms sur l'importance d'associer le code HOX et l'origine embryonnaire entre site donneur et site receveur pour assurer une réparation tissulaire correcte, nous conduisent à proposer que le choix du site adipeux doit être pris en compte pour un meilleur résultat clinique.

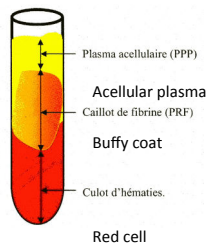
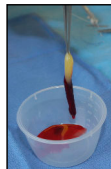
2^{eme} objectif :

Quelle est l'action du PRP et du PRF sur les précurseurs adipocytaires (ASCs)?

Suite aux premiers résultats positifs concernant la cicatrisation, je souhaitais connaître l'action de PRF sur les adipocytes et leurs précurseurs. En premier lieu, nous avons donc analysé au laboratoire l'action du PRF (gel) sur les précurseurs des adipocytes hMADS (cellules souches humaines isolées à partir du tissu adipeux) et établies par le laboratoire d'accueil.

PRF process

- Total blood sampling during surgery
- **10 ml in a dry tube (without anticoag.)**
- Immediate centrifugation
- **12 min at 3000 round/minute (400G)**

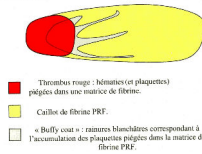


No requirement from French regulation

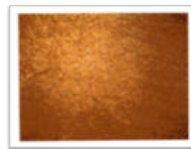
Technique de prélèvement du PRF : Ponction veineuse et centrifugation dans un tube sans anticoagulant permettant d'obtenir un gel de fibrine contenant les facteurs de croissance.

PRF composition

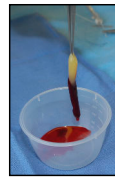
- During centrifugation **fibrinogen cross-links progressively and become a fibrin scaffold.**
 - PDGFs
 - TGFβ-I
 - IGF
- Leucocytes**
- Platelets**



Buffy coat



Acellular fibrin



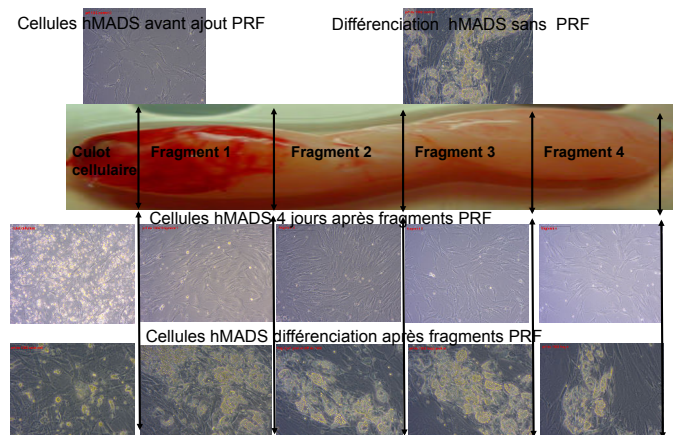
Au laboratoire, le gel a été sectionné arbitrairement en 4 parties, puis ont été analysées leurs effets sur la prolifération et la différenciation adipocytaire des cellules hMADS.

Il a été retrouvé que la zone la plus proche des globules rouges n'avait pas d'action voire même avait un effet toxique sur la prolifération cellulaire (zone riche en érythrocytes).

La zone supérieure, correspondant au PPP, plasma pauvre en plaquette, n'avait que peu d'effet sur la prolifération cellulaire.

En revanche, la zone centrale, contenant les culots plaquettaires, avait une action notable sur la prolifération.

Effet des portions de PRF (du 13/02) sur la prolifération et la différenciation des hMADS



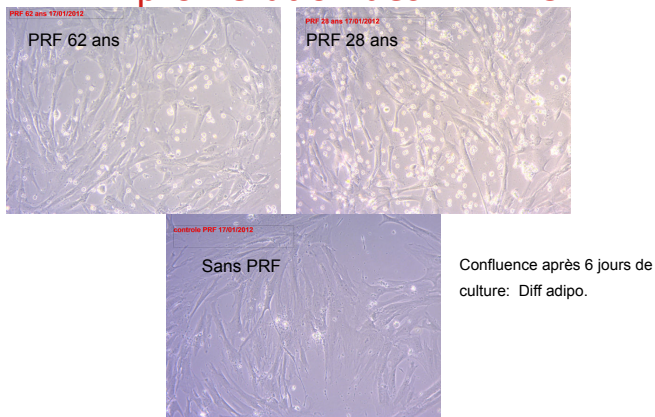
Ci dessus le gel de PRF fragmenté en 4 parties. Ces 4 parties ont été testées sur des cellules souches du laboratoire et nous avons analysé la prolifération cellulaire.

Nous pouvons observer que le fragment 1 et 2 permettent une prolifération cellulaire très importante. En revanche, les fragments 3 et 4 et le culot globulaire ne sont que très peu actifs.

Ceci est du au fait que les facteurs de croissance se trouvent dans les fragment 1 et 2.

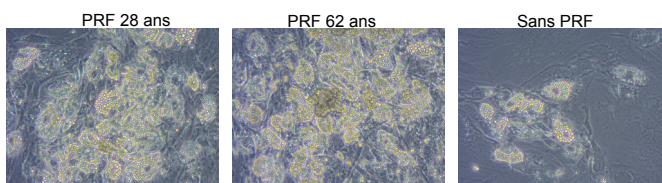
On observe donc que selon la portion de PRF les effets peuvent être différents.

Effets de 3 jours de PRF sur la prolifération des hMADS

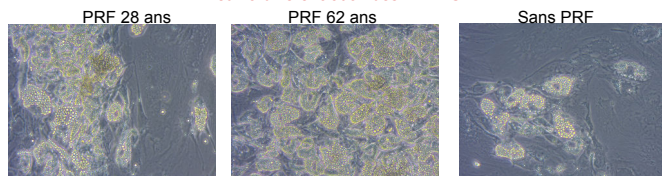


Le PRF a été testé sur la prolifération des cellules hMADS et nous pouvons voir que la confluence est obtenue à 3 jours avec PRF et 6 jours sans.

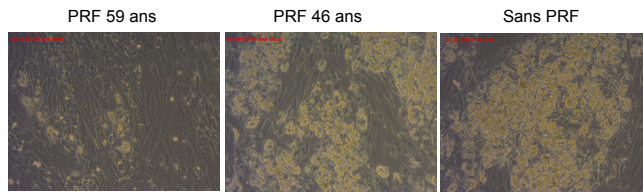
(PRF du 17/01/2012) Effets de PRF, maintenu pendant la prolifération, sur la différenciation des hMADS



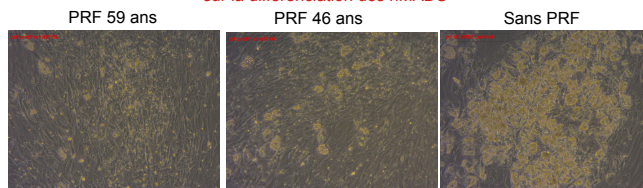
Effets de PRF, maintenu pendant la prolifération et la différenciation, sur la différenciation des hMADS



(PRF du 06/02/2012) Effets de PRF, maintenu pendant la prolifération,
sur la différenciation des hMADS



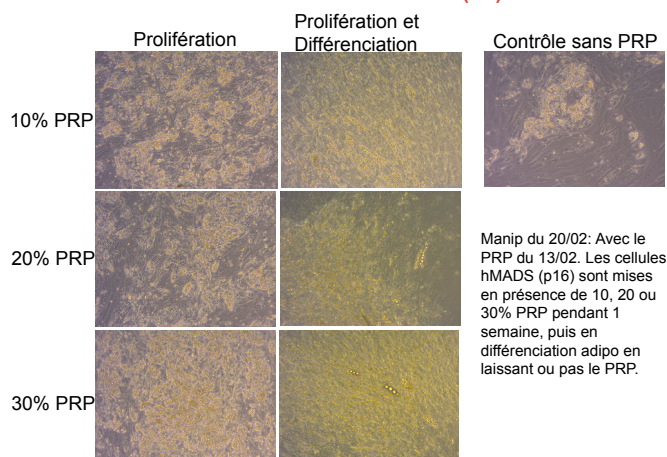
Effets de PRF, maintenu pendant la prolifération et la différenciation,
sur la différenciation des hMADS



Fort de ces résultats du PRF humain sur la prolifération cellulaire, nous souhaitons protocoliser la méthode et pour ce faire le gel de PRF était difficile à utiliser de manière reproductible au laboratoire. Nous avons donc opté pour le PRP d'origine humaine qui est également un concentré plaquettaire mais qui est liquide. La préparation peut être standardisée. Nous avons alors analysé l'action de ce PRP sur la prolifération et la différenciation des cellules souches adipocytaires.

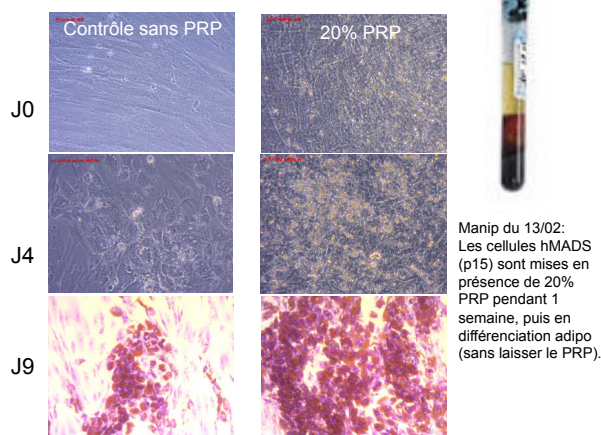
Les résultats présentés ci après ont fait l'objet d'une publication en 2016 dans Scientific Report.

Effet du PRP (du 13/02/2012)
sur la différenciation des hMADS (2/2)

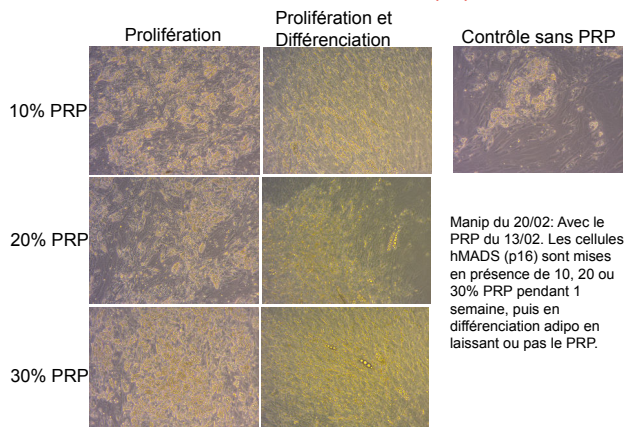


Les résultats semblent nous orienter vers une prolifération des cellules hMADS plus importantes avec du PRP à 10% 20% 30% et une différenciation cellulaire présente.

**Effet du PRP (du 13/02/2012)
sur la différenciation des hMADS (1/2)**



**Effet du PRP (du 13/02/2012)
sur la différenciation des hMADS (2/2)**



Suite à ces données qui nous confirmaient que le PRF et le PRP augmentaient drastiquement la prolifération cellulaire, nous nous sommes penchés sur la différenciation cellulaire.

Les données ont montré que la différenciation cellulaire était bloquée partiellement. Ceci nous démontre que certaines cellules partaient en différenciation alors que d'autres restaient non différenciées. Il est alors probable de pouvoir penser qu'il existe différents types cellulaires au sein des cellules souches d'origine adipocytaire. Nous avons trouvé que la voie qui bloquait partiellement la différenciation cellulaire était celle du TGFβ. Nous avons alors décidé de voir si en reintroduisant un inhibiteur du TGFβ (SD431542) la différenciation cellulaire redemarrant ou si elle était bloquée définitivement.

Les résultats ont montré que certaines cellules bloquées par le TGFβ pouvaient repartir en différenciation mais pas toutes.

Le PRP stimule la prolifération des ASCs contenus dans la SVF. Nous retrouvons une stimulation du PRP identique sur les ASCs provenant du genou et de la région sous-mentale.

Le PRP a été testé pendant la prolifération et la différenciation, pendant la prolifération seule et pendant la différenciation seule.

Les résultats de différenciation ont été retrouvés par comptage des goutellettes lipidiques mais également par extraction ARN et PCR en étudiant les gènes adipogéniques (CEBP, PPAR, Adiponectine, FABP4)

On observe, suite à ces résultats, qu'il existe une inhibition des gènes marqueurs de différenciation adipogéniques.

Le PRP a donc un rôle inhibiteur partiel dans la différenciation cellulaire.

Cette action est présente que le PRP soit introduit lors de la prolifération seule, lors de la différenciation seule, ou lors des deux.

Conclusions de ces données :

Nous pouvons observer une inhibition des marqueurs de différenciation adipogénique

L'effet est similaire lorsque le traitement par PRP n'a lieu que pendant la phase de prolifération.

PRP stimulerait la prolifération et inhiberait l'induction de la différenciation.

Ceci représentait le second objectif d'analyse de recherche.

Mais nous avons souhaité continuer cette analyse.

Tout d'abord en recherchant la voie qui inhibait la différenciation cellulaire.

Puis lorsque nous avons pu définir la voie qui inhibait l'effet antiadipogénique, la voie du TGFB, nous avons étudié un inhibiteur de cette voie le SB431542 pour voir l'effet de cet inhibiteur sur la différenciation cellulaire.

Le PRP inhibe la différenciation des ASCs

A) Analyse de la différenciation cellulaire des ASCs du laboratoire hMADS, du genou et de la région sous mentale en absence ou en présence de PRP à 20%. On observe moins de goutellettes lipidiques avec le PRP ce qui montre une moins bonne différenciation cellulaire.

B) Analyse des protéines adipogéniques par PCR : PPARg, AdipoQ, FABP4
Les résultats montrent une baisse drastique de production de ces protéines démontrant donc une inhibition de la différenciation cellulaire.

Le PRP par la voie du TGFB inhibe la différenciation cellulaire des ASCs. Le SB431542 (inhibiteur du TGFB) permet un retour en différenciation et ceci est confirmé lors du dosage PCR de l'expression du gène FABP4.

Le PRP induit un phénotype myofibroblastique-like qui est réversible par l'action du SB431542.

Analyse des cytokines présentes dans le PRP en utilisant le RayBio C-series Growth factor antibody kit.

Parallèlement à ces études sur l'adipocyte et sur ses précurseurs, une analyse de l'effet du PRP sur les cellules de la peau a été réalisée mais n'est pour l'instant pas publié.

Etude de la prolifération des kératinocytes sans et avec PRP.

Les résultats montrent une augmentation significative de plus de 2.2 du taux de prolifération par rapport au contrôle après 72h de traitement. (n=4).

Une étude sur la migration des kératinocytes lors d'une plaie cutanée a été réalisée. Lors de la comparaison groupe contrôle, groupe traité par PRP, nous pouvons voir une migration cellulaire plus rapide après 72 heures de traitement (n=4).

Une **analyse sur la prolifération des fibroblastes** avec et sans PRP nous montre également une augmentation drastique de la prolifération **de plus de 9 fois après 72 heures** de traitement (n=3)

Une analyse de la fonctionnalité de ces fibroblastes en dosant la sécrétion de la **synthèse du collagène** nous montre **un dosage 3 fois supérieur** en présence de PRP.

Analyse du **nombre de cellules endothéliales microvasculaires sanguines cutanées.**

Les résultats montrent une **augmentation** en présence de PRP de ces cellules **de 8 fois 72 h** après traitement (n=4)

En conclusion :

Le PRP présente une action sur la prolifération des cellules cutanées : les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales microvasculaires sanguines cutanées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de la réalisation de cette thèse, nous avons deux objectifs :

- 1) Analyser le profil de gènes des adipocytes en fonction de leur site anatomique d'origine, et classer les sites adipeux selon leur code HOX et origine embryonnaire.
- 2) Analyser l'action du PRF et du PRP sur les précurseurs adipocytaires humains.

Le premier objectif a permis de mettre en évidence que :

L'analyse du profil des gènes des adipocytes en fonction de leur site anatomique a permis de révéler une signature moléculaire différente entre les adipocytes du menton et du genou. L'étude a été étendue à d'autres sites adipeux. Les adipocytes présentes donc vraisemblablement une fonctionnalité différente. Lors d'un transfert de tissu adipeux en Chirurgie Plastique et Esthétique, le choix du site de prélèvement de tissu adipeux a possiblement un rôle important.

L'hypothèse que nous favorisons est que le site donneur et le site receveur doivent présenter des similitudes d'expression des gènes HOX et des gènes qui marquent l'origine embryonnaire, afin d'améliorer les résultats post-opératoires. Le cas du lipofilling pour la reconstruction mammaire après mastectomie due à un cancer du sein est particulièrement adapté à cette hypothèse. En effet, en dépit de l'hétérogénéité dans les sites adipeux, on considère toujours que tout site, comme l'abdomen, la hanche et le genou, peut être utilisé comme des sites donneurs pour la reconstruction mammaire. Le site donneur est choisi par le chirurgien en fonction de la quantité de graisse nécessaire ou de la préférence du patient. Cependant, nous avons montré au cours de cette thèse que les dépôts adipeux de la partie supérieure ou inférieure du corps présentent des caractéristiques spécifiques et peuvent présenter un potentiel de reconstruction différent mais présenter aussi des risques oncologiques différents. La question concernant le meilleur site donateur pour la greffe du sein reste hypothétique car aucune étude scientifique n'a répondu à ce jour à ce problème. L'impact des adipocytes de différents dépôts de graisse sur les cellules cancéreuses du sein mérite une évaluation détaillée. Une première approche serait de réaliser *in vitro* des co-cultures entre des adipocytes, isolés des différentes parties du corps qui sont utilisées par les chirurgiens pour les reconstructions mammaires, et des cellules du cancer du sein. Puis d'analyser les conséquences sur le pouvoir tumoral des cellules mammaires.

、
-

Le second objectif l'était analyse de l'action du PRP sur les ASCs :

Nous avons étudié, lors de cette thèse, l'action du PRP sur la prolifération et la différenciation des ASCs. Les résultats nous montrent une augmentation significative de la prolifération cellulaire et une inhibition partielle de la différenciation par la voie du TGFβ.

Les données scientifiques actuelles montrent une meilleure prise de tissu adipeux lors d'un lipofilling lorsque la graisse réinjectée est enrichie en ASCs.

Le PRP, en permettant une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de la différenciation cellulaire, engendre une augmentation du nombre de ASCs. L'accroissement du nombre d'ASCs accentue la sécrétion de facteurs de croissance et ainsi pourrait amplifier la néoangiogénèse ce qui rehausse vraisemblablement la prise de tissu adipeux lors d'un lipofilling.

Une autre hypothèse, qui peut être complémentaire, est que le TGFβ présent dans le PRP permet le maintien d'une population de précurseurs adipeux qui pourrait alors assurer le renouvellement des adipocytes une fois que les produits du PRP perdent leur activité. Le potentiel du PRP à engendrer la différenciation des précurseurs d'adipocytes en myofibroblastes nous semble aussi une observation d'intérêt pour la clinique. En effet, ce potentiel peut participer à la formation de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire et ainsi favoriser les phénomènes de cicatrisation.

Ceci doit encore être confirmé par des études cliniques prospectives.

Des études sur le petit animal permettraient aussi d'analyser le rôle de la voie TGFβ sur la prise de greffe de cellules adipeuses *in vivo*. En effet, il serait intéressant de réaliser des greffes de précurseurs en présence ou pas de l'inhibiteur de la voie TGFβ, puis d'évaluer le devenir des cellules greffées en adipocytes ou en myofibroblastes.

Le PRP présente également une action activatrice sur la prolifération de toutes les cellules de la peau : les kératinocytes, les fibroblastes et leur fonction de synthèse de collagène ainsi que sur les adipocytes. Ceci présente un intérêt majeur en médecine esthétique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.
Evans MJ, Kaufman MH
Nature. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
- 2) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.
Martin GR.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec;78(12):7634-8
- 3) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.
Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7
- 4) Honoring the work and life of Leroy C. Stevens. A symposium as part of the International Stem Cell Initiative Workshop.
Graham CF, Solter D, Gearhart JD, Nadeau JH, Knowles BB.
Int J Dev Biol. 2016;60(10-11-12):327-336.
- 5) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures.
Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S.
Nat Protoc. 2007;2(12):3081-9
- 6) Nuclear transfer and iPS may work best together.
Gurdon J, Murdoch A.
Cell Stem Cell. 2008 Feb 7;2(2):135-8.
- 7) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.
Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K.
Science. 2008 Nov 7;322(5903):945-9.
- 8) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors.
Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR.
Nature. 2008 Jul 31;454(7204):646-50.
- 8) Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM.

Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M.
Cytotherapy. 2006;8(5):437-44.

9) Brown adipose tissue: function and physiological significance.
Cannon B, Nedergaard J.
Physiol Rev. 2004 Jan;84(1):277-359.

10) Growth and development of human adipose tissue during early gestation.
Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL.
Early Hum Dev. 1983 Mar;8(1):1-11.

11) Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.
Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K.
Stem Cells. 2006 Dec;24(12):2714-22.

12) Brain adipocytokine action and metabolic regulation.
Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE.
Diabetes. 2006 Dec;55 Suppl 2:S145-54.

13) Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice.
Verreth W, De Keyzer D, Pelat M, Verhamme P, Ganame J, Bielicki JK, Mertens A, Quarck R, Benhabiles N, Marguerie G, Mackness B, Mackness M, Ninio E, Herregods MC, Balligand JL, Holvoet P.
Circulation. 2004 Nov 16;110(20):3259-69.

14) Surgical remodeling of the silhouette by aspiration lipolysis or selective lipectomy.
Illouz YG.
Aesthetic Plast Surg. 1985;9(1):7-21.

15) Curette fat sculpture in rhytidectomy: improving the nasolabial and labiomandibular folds.
Ellenbogen R, Wethe J, Jankauskas S, Collini F.
Plast Reconstr Surg. 1991 Sep;88(3):433-42.

16) Long-term survival of fat transplants : controlled demonstrations.
Coleman SR.
Aesthetic Plast Surg. 1995 Sep-Oct;19(5):421-5

17) Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties.
El-Sharkawy H¹, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE.
J Periodontol. 2007 Apr;78(4):661-9.

18) Platelet rich plasma

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998;85:638–46.

19) Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation.

Landesberg R, Roy M, Glickman RS.

J Oral Maxillofac Surg. 2000;58:297–300.

20) Platelet-rich plasma contains high levels of platelet derived growth factors and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. J Periodontol. 2003;74:849–57.

21) A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma (PRP) Obtained Following Preparation by Three Different Methods.

Sabarish R, Lavu V, Rao SR.

J Clin Diagn Res. 2015 Feb;9(2):ZC10-2.

22) Autologous platelet-rich plasma: evidence for clinical use.

Cohn CS, Lockhart E.

Curr Opin Hematol. 2015 Nov;22(6):527-532.

23) Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel Kevy, S. V., and Jacobson, M. S. J.

Extra Corpor. Technol. 36: 28, 2000

24) Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing.

Eppley, B. L., Woodell, J. E., and Higgins, J.

Plast. Reconstr. Surg. 114: 1502, 2004

25) Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro.

Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Di Matteo B, Filardo G.

BMC Microbiol. 2015 Jul 30;15:149.

26) Determining the Effect of Preparation and Storage: An Effort to Streamline Platelet Components as a Source of Growth Factors for Clinical Application.

Sonker A, Dubey A.

Transfus Med Hemother. 2015 May;42(3):174-80.

27) Platelet gel-released supernatant modulates the angiogenic capability of human endothelial cells.

Rughetti A, Giusti I, D'Ascenzo S, Leocata P, Carta G, Pavan A, et al.
Blood Transfus. 2008;6:12–7.

28) Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T.
Trends Biotechnol.2009;27:158–67.

29) Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective.

Dhurat R, Sukesh M.
J Cutan Aesthet Surg. 2014 Oct-Dec;7(4):189-97.

30) Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model.

Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraudo L, Aboudou H, Veran J, Magalon G, Dignat-Georges F, Sabatier F.
Arthroscopy. 2014 May;30(5):629-38.

31) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing.

Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):e56-60.

32) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):e51-5.

33) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):e45-50.

34) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):e37-44.

35) Fibrin sealant in maxillofacial surgery. Development and indications. A review of the past 12 years.

Matras H.

Facial Plast. Surg 1985;2:297-313.

36) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?

Marx RE.

Implant Dent. 2001;10(4):225-8. Marx R GA.

37) Une opportunité en paro-implantologie. Le PRF (platelet rich fibrin).

Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A.

Implantodont 2001;41:55-62.

38) Autologous blood injections for refractory lateral epicondylitis.

Edwards SG, Calandruccio JH.

J Hand Surg Am 2003; 28:272-278.

39) Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review.

Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B.

Curr Rev Musculoskelet Med 2008; 1:165-174.

40) Comparison of Surgically repaired Achilles tendon tears using Platelet-Rich Fibrin matrice.

Mikel Sanchez.

The American Journal of Sports Medecine, Vol 35, n°2

41) Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy : a systematic review.

R.J. de Vos, P.L.J. van Veldhoven, M.H. Moen, A. Weir, J.L.Tol and N. Maffuli.

British Medical Bulletin Advance Access March 2, 2010.

42) Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries.

Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I.

Sports Med. 2009;39(5):345-54.

43) Treatment of chronic elbow tendinosis with Buffered Platelet-Rich Plasma.

Allan Mishra, MD* and Terri Pavelko, PAC, PT.

American Orthopaedic Society for ports Medecine. 2006.

44) Comparison of injection modalities in the treatment of plantar heel pain: a randomised controlled trial.

Kiter E, Celikbas E, Akkaya S et al.

J Am Podiatr Med Assoc, 96, 293-6. 2006

45) Treatment of plantar fasciitis using four different local injection modalities: a randomised prospective clinical trial.

Kalaci A, Cakici H, Hapa O et al.

J Am Podiatr Med Assoc, 99, 108-13. 2009

46) Intralesional autologous blood injection compared to corticosteroid. injection for treatment of chronic plantar fasciitis. A prospective, randomised, controlled trial.

Lee TG, Ahmad TS

Foot Ankle Int, 28, 984-90.2007

47) Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I.

Clin Exp Rheumatol. 2008 Sep-Oct;26(5):910-3.

48) Growth factors for chronic plantar fascitis.

Barret S, Erredge S.

Podiatry Todday. 2004 ; 17 :37-42

49) The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M.

Clin. Oral. Impl. Res. 17, 2006, 212-219.

50) Platelet-Rich Plasma Intra-Articular Injection Versus Hyaluronic Acid Viscosupplementation as Treatments for Cartilage Pathology: From Early Degeneration to Osteoarthritis.

Elizaveta Kon, M.D., Bert Mandelbaum, M.D., Roberto Buda, M.D., Giuseppe Filardo, M.D., Marco Delcogliano, M.D., Antonio Timoncini, M.D., Pier Maria Fornasari, M.D., Sandro Giannini, M.D., and Maurilio Marcacci, M.D.

Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, Vol 27, No 11 (November), 2011: pp 1490-1501

51) Investigation performed at Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands. Platelet-Rich Plasma Releasate Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes.

Gerben M. van Buul,*y MD, Wendy L.M. Koevoet,z BSc, Nicole Kops,* BSc, P. Koen Bos,* MD, PhD, Jan A.N. Verhaar,* MD, PhD, Harrie Weinans,* PhD, Monique R. Bernsen,y PhD, and Gerjo J.V.M. van Osch,*z§ PhD The American Journal of Sports Medicine, Vol. 39, No. 11.

52) Platelet – released growt factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblats from arthritic patients.

E. Anitua, M. Sanchez, A.T. Nurden, M.M. Zalduendo, M. de la Fuente, J. Azofra and I. Andia.

Rheumatology 2007 ;46 :1769-1772.

53) Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I.

Clin Exp Rheumatol. 2008 Sep-Oct;26(5):910-3.

- 54) Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery : application of skin graft and second intention healing.
de Moraes AM, Annichino-Bizzachi JM, Rossi AB.
Rev Paul Med 1998;116: 1747-1752.
- 55) The use of autologous platelet-rich plasma (Platelet Gel) and autologous platelet-poor plasma (Fibrin Glue) in cosmetic surgery.
Man D, Plosker H, Winland-Brown JE.
Plast Reconstr Surg 2001;107:229-237.
- 56) Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.
Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A.
Transfus Apheresis Sci 2004;30:145-151.
- 57) Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.
Whitman DH, Berry RL, Green DM.
J Oral Maxillofac Surg 1997; 55:1294-1299.
- 58) Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties.
El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE.
J Periodontol 2007;78:661-669.
- 59) Une opportunité en parodontologie. Le PRF (Platelet-Rich Fibrin).
Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A.
Implantodontie 2001;41:55-62.
- 60) Platelet Rich Fibrin (PRF): un nouveau biomatériau de cicatrisation. 1re partie : biotechnologies et fibrine.
Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, Dohan D.
Implantodontie 2004;13:87-97.
- 61) Platelet Rich Fibrin (PRF): un nouveau biomatériau de cicatrisation. 2e partie: plaquettes et cytokines.
Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, Korb G, Dohan D.
Implantodontie 2004;13:99-108.
- 62) Platelet Rich Fibrin (PRF) : un nouveau biomatériau de cicatrisation. 3ème partie : aspects immunitaires.
Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, Dohan D.
Implantodontie 2004;13:109-115.
- 63) Platelet Rich Fibrin (PRF) : un nouveau biomatériau de cicatrisation. 4ème partie

: implications thérapeutiques.

Choukroun J, Simonpieri A, Girard MO, Fioretti F, Dohan S, Dohan D.

Implantodontie 2004;13:229-235.

64) Concentrés plaquettaires : technologies, biologie associée, applications cliniques, analyses histologiques. 4ème partie : analyses histologiques.

Choukroun J, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan S, Dohan D.

Implantodontie 2004;13:167-172.

65) Roll, Spin, Wash, or Filter? Processing of Lipoaspirate for Autologous Fat Grafting: An Updated, Evidence-Based Review of the Literature.

Cleveland EC, Albano NJ, Hazen A.

Plast Reconstr Surg. 2015 Oct;136(4):706-13

66) Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial.

Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman ML, Thomsen C, Dickmeiss E, Drzewiecki KT.

Lancet. 2013 Sep 28;382(9898):1113-20.

67) Studies in fat grafting: Part III. Fat grafting irradiated tissue--improved skin quality and decreased fat graft retention.

Garza RM, Paik KJ, Chung MT, Duscher D, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC.

Plast Reconstr Surg. 2014 Aug;134(2):249-57.

68) Studies in fat grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer.

Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, Atashroo D, Chung MT, Duscher D, Januszyk M, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC.

Plast Reconstr Surg. 2015 Apr;135(4):1045-55.

69) Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion.

Atashi F, Jaconi ME, Pittet-Cuénod B, Modarressi A.

Tissue Eng Part C Methods. 2015 Mar;21(3):253-62.

70) Platelet Rich Plasma (PRP) Improves Fat Grafting Outcomes.

Modarressi A.

World J Plast Surg. 2013

71) 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.

Gentile P, De Angelis B, Pasin M, Cervelli G, Curcio CB, Floris M, Di Pasquali C,

Bocchini I, Balzani A, Nicoli F, Insalaco C, Tati E, Lucarini L, Palla L, Pascali M, De Logu P, Di Segni C, Bottini DJ, Cervelli V.

J Craniofac Surg. 2014 Jan;25(1):267-72

72) Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance.

Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli LG, Orlandi A.

Stem Cells Transl Med. 2012 Mar;1(3):206-20.

73) The effect of autologous activated platelet rich plasma (AA-PRP) injection on pattern hair loss: clinical and histomorphometric evaluation.

Cervelli V, Garcovich S, Bielli A, Cervelli G, Curcio BC, Scioli MG, Orlandi A, Gentile P.

Biomed Res Int. 2014

74) The Effect of Platelet-Rich Plasma in Hair Regrowth: A Randomized Placebo-Controlled Trial.

Gentile P, Garcovich S, Bielli A, Scioli MG, Orlandi A, Cervelli V.

Stem Cells Transl Med. 2015 Nov;4(11):1317-23.

75) Evaluation of Not-Activated and Activated PRP in Hair Loss Treatment: Role of Growth Factor and Cytokine Concentrations Obtained by Different Collection Systems.

Gentile P, Cole JP, Cole MA, Garcovich S, Bielli A, Scioli MG, Orlandi A, Insalaco C, Cervelli V.

Int J Mol Sci. 2017 Feb 14;18(2). pii: E408.

76) Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system.

Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh K, Bujo H.

Exp Mol Med. 2012 May 31;44(5):330-9.

77) Improved fat graft survival by different volume fractions of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells.

Li F, Guo W, Li K, Yu M, Tang W, Wang H, Tian W.

Aesthet Surg J. 2015 Mar;35(3):319-33. doi: 10.1093/asj/sju046.

78) Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma.

Li K, Li F, Li J, Wang H, Zheng X, Long J, Guo W, Tian W.

J Tissue Eng Regen Med. 2014 Jun 30; . Epub 2014 Jun 30.

79) [Increased survival of free fat grafts with adipose-derived stem cells and platelet-

rich plasma in nude mice].

Li K, Li F, Guo LJ, Li J, Huang K, Guo WH, Tian WD.

Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2013 May;44(3):337-41.

80) The effect of combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on fat graft survival.

Seyhan N, Alhan D, Ural AU, Gunal A, Avunduk MC, Savaci N.

Ann Plast Surg. 2015 May;74(5):615-20.

81) Results and long-term patient satisfaction after gluteal augmentation with platelet-rich plasma-enriched autologous fat.

Willemsen JC, Lindenblatt N, Stevens HP.

Eur J Plast Surg. 2013;36:777-782. Epub 2013 Sep 1.

82) The effects of platelet-rich plasma on recovery time and aesthetic outcome in facial rejuvenation: preliminary retrospective observations.

Willemsen JC, van der Lei B, Vermeulen KM, Stevens HP.

Aesthetic Plast Surg. 2014 Oct;38(5):1057-63

83) The Safety and Efficacy of Cell-Assisted Fat Grafting to Traditional Fat Grafting in the Anterior Mid-Face: An Indirect Assessment by 3D Imaging.

Sasaki GH.

Aesthetic Plast Surg. 2015 Sep 3.

85) Improvement of Fat Transplantation: Fat Graft With Adipose-Derived Stem Cells and Oxygen-Generating Microspheres.

Jung DW, Kim YH, Kim TG, Lee JH, Chung KJ, Lim JO, Choi JY.

Ann Plast Surg. 2015 Oct;75(4):463-70.

86) Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells.

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Wan Safwani WK.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 May 30;448(2):218-24.

87) In vitro effects of tamoxifen on adipose-derived stem cells.

Pike S, Zhang P, Wei Z, Wu N, Klinger A, Chang S, Jones R, Carpenter J, Brown SA, DiMuzio P, Tulenko T, Liu Y.

Wound Repair Regen. 2015 Jun 4.

88) Vascular endothelial growth factor 165-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells promote vascularization-assisted fat transplantation.

Jun-Jiang C, Huan-Jiu X.

Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2015 Mar 26:1-9.

89) Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-

derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF.

Jiang A, Li M, Duan W, Dong Y, Wang Y.

ScientificWorldJournal. 2015;2015:968057.

90) The combination of DHEA, histamine, and insulin increases adipogenic differentiation and enhances tissue transplantation outcome in mice.

Park Y, Jung MK, Yoon SY, Lee HR, Hur DY, Kim D, Yang Y, Kim TS, Kim S, Yoon SR, Park HJ, Bang SI, Cho DH.

Biotechnol Appl Biochem. 2013 May-Jun;60(3):356-64.

91) Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats.

Zografou A, Papadopoulos O, Tsigris C, Kavantzias N, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Papassavas A, Stavropoulou-Gioka C, Dontas I, Perrea D.

Ann Plast Surg. 2013 Aug;71(2):225-32.

92) Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation.

Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC.

Ann Plast Surg. 2014 Feb;72(2):234-41.

93) Role of adipose-derived stem cells in enhancing angiogenesis early after aspirated fat transplantation: induction or differentiation?

Yuan Y, Gao J, Liu L, Lu F.

Cell Biol Int. 2013 Jun;37(6):547-50.

94) Effect of exogenous adipose-derived stem cells in the early stages following free fat transplantation.

Yuan YI, Gao J, Lu F.

Exp Ther Med. 2015 Sep;10(3):1052-1058.

95) Differentiated Adipose-derived Stem Cells Promote Reinnervation of Rat Skin Flaps.

Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K.

Plast Reconstr Surg Glob Open. 2013 Jul 8;1(3):e22

96) Effect of ASCs on the graft survival rates of fat particles in rabbits.

He X, Zhong X, Ni Y, Liu M, Liu S, Lan X.

J Plast Surg Hand Surg. 2013 Feb;47(1):3-7.

97) Autologous adipose stem cells in treatment of female stress urinary incontinence: results of a pilot study.

Kuismanen K, Sartoneva R, Haimi S, Mannerström B, Tomás E, Miettinen S, Nieminen K.

Stem Cells Transl Med. 2014 Aug;3(8):936-41.

98) Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study.

Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariniemi K, Mikkonen R, Kuokkanen H, Herold C.

J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013 Nov;66(11):1494-503

99) The effect of mechanical stress on the proliferation, adipogenic differentiation and gene expression of human adipose-derived stem cells.

Paul NE, Denecke B, Kim BS, Dreser A, Bernhagen J, Pallua N.

J Tissue Eng Regen Med. 2017 Jan 17.

100) [Current Perceptions of Lipofilling on the Basis of the New Guideline on "Autologous Fat Grafting"].

Prantl L, Rennekampff HO, Giunta RE, Harder Y, von Heimburg D, Heine N, Herold C, Kneser U, Lampert F, Machens HG, Mirastschijski U, Müller D, Pallua N, Schantz T, Schönborn A, Ueberreiter K, Witzel CH, Bull G, Rezek D, Sattler G, Vogt PM, Horch RE.

Handchir Mikrochir Plast Chir. 2016 Dec;48(6):330-336.

101) The survival condition and immunoregulatory function of adipose stromal vascular fraction (SVF) in the early stage of nonvascularized adipose transplantation.

Dong Z, Peng Z, Chang Q, Lu F.

PLoS One. 2013 Nov 18;8(11):e80364.

102) Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem cells: impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration.

Keck M, Kober J, Riedl O, Kitzinger HB, Wolf S, Stulnig TM, Zeyda M, Gugerell A.

J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2014 Jan;67(1):e1-8.

103) Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model.

Kim KS, Lee HJ, An J, Kim YB, Ra JC, Lim I, Kim SU.

Cell Transplant. 2014;23(12):1585-97.

104) Cell-assisted lipotransfer: friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis.

Laloze J, Varin A, Gilhodes J, Bertheuil N, Grolleau JL, Brie J, Usseglio J, Sensebe L, Filleron T, Chaput B.

J Tissue Eng Regen Med. 2017 Jul 18.

105) Platelet-rich plasma-enriched autologous fat graft in regenerative and aesthetic facial surgery: Technical note.

Picard F, Hersant B, La Padula S, Meningaud JP.

J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2017 May 30. pii: S2468-7855(17)30095-2.

106) The Selective Centrifugation Ensures a Better In Vitro Isolation of ASCs and Restores a Soft Tissue Regeneration In Vivo.

De Francesco F, Guastafierro A, Nicoletti G, Razzano S, Riccio M, Ferraro GA.
Int J Mol Sci. 2017 May 12;18(5). pii: E1038.

107) Adipose-derived stem cell (ASC)-enriched fat grafting: experiments using White rabbits and an automated cell processing apparatus.

Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Hihara M, Lai F, Kusumoto K.
Med Mol Morphol. 2017 Apr 24.

108) Heat-Shock Protein 70 Overexpression in Adipose-Derived Stem Cells Enhances Fat Graft Survival.

Feng H, Qiu L, Zhang T, Yu H, Ma X, Su Y, Zheng H, Wang Y, Yi C.
Ann Plast Surg. 2017 Apr;78(4):460-466.

109) Influence of age and body mass index on the yield and proliferation capacity of adipose-derived stem cells.

Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Duclos A, Braye F, Rohrich R, Brown S, Damour O.
Aesthetic Plast Surg. 2011 Dec;35(6):1097-105. doi: 10.1007/s00266-011-9743-7.
Epub 2011 May 26.

110) Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice.

Rodriguez J, Boucher F, Lequeux C, Josset-Lamaugarny A, Rouyer O, Ardisson O, Rutschi H, Sigaud-Roussel D, Damour O, Mojallal A.
Stem Cell Res Ther. 2015 Dec 8;6:241. doi: 10.1186/s13287-015-0238-3.

111) Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study.

Rodriguez J, Pratta AS, Abbassi N, Fabre H, Rodriguez F, Debard C, Adobati J, Boucher F, Mallein-Gerin F, Auxenfans C, Damour O, Mojallal A.
Stem Cells Int. 2017;2017:9289213.

112) Nanofat grafting: basic research and clinical applications.

Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H.
Plast Reconstr Surg. 2013 Oct;132(4):1017-26.

113) Stem cells, mature adipocytes, and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival?

Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Rifkin L, Rohrich R, Duclos A, Brown S, Damour O.
Aesthetic Plast Surg. 2011 Dec;35(6):1061-72

ANNEXE

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT

TECHNIQUE DE COLEMAN en 3 temps :

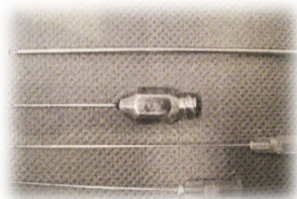
- 1) La graisse autologue est prélevée de manière atraumatique grâce à des canules de 10 cc au niveau des genoux et du menton.**
- 2) Centrifugation de cette graisse avec la machine de Jonhson et johnson utilisée par coleman
3000 tours minutes pendant 3 minutes**
- 3) Réinjection au niveau de la région du corps souhaitée par des microcanules.**
Technique rétrotraçante, canules les plus fines possible mousses, quadrillage.



Graisse décantée

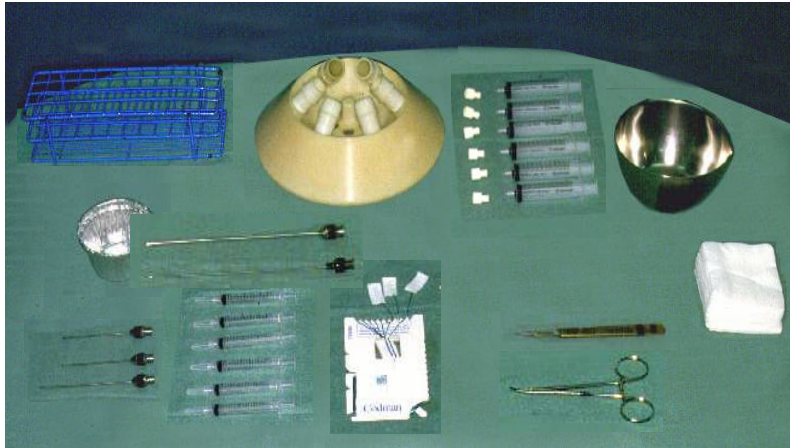


Canule de prélèvement de graisse

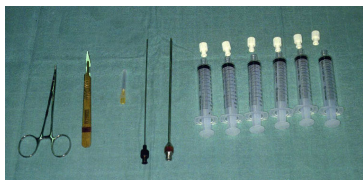
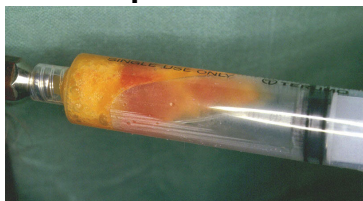


Les canules de réinjection

Matériel nécessaire au prélèvement graisseux



Graisse prélevée dans une seringue de 10 cc



LES DIFFERENTS SITES DE PRELEVEMENT

Injection première au sérum adrénaliné avec naropeine puis aspiration à la canule ou lipoaspiration



Infiltration de la zone de prélèvement avant l'aspiration



Prélèvement de graisse au niveau du genou



Prélèvement de graisse au niveau du ventre



Prélèvement de graisse au niveau de la culotte de cheval

LA PURIFICATION DE LA GRAISSE PAR CENTRIFUGATION

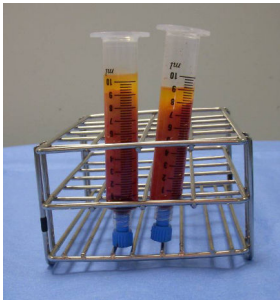
Portes seringues stériles

6 Seringues maximum correspondant à 60 cc de graisse prélevées
3000 tours/min - 3 minutes



SEPARATION EN 3 COUCHES :

- **AU SOMMET:** huile libérée par les cellules rompues
- **AU FOND :** sang
- **COUCHE MOYENNE :** tissu cellulaire sous-cutané



GRAISSE OBTENUE PAR CENTRIFUGATION : UNE TECHNIQUE DE PURIFICATION DE GRAISSE





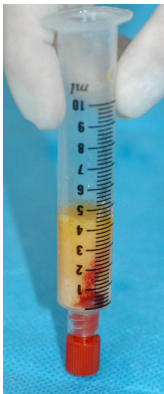
Graisse prête à être réinjectée

GRAISSE OBTENUE PAR DECANTATION : UNE TECHNIQUE DE PURIFICATION DE GRAISSE



Prélèvement sous « Anesthésie locale »
Couche supérieure : huile
Couche inférieure : sang + xylocaïne

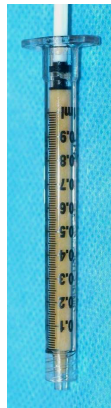
Graisse obtenue prête à être réinjectée



10 cc de graisse



3 cc de graisse



1 cc de graisse

INDICATIONS de lipofilling :

Les deux principaux bénéfices de la lipostructure sont l'effet volumateur et l'effet trophique notamment au niveau de la peau.

Le lipofilling peut actuellement être indiqué lors d'un acte esthétique au niveau du visage seul ou associé à un lifting cervico facial. Il peut également être indiqué dans la chirurgie mammaire, lors d'un acte de reconstruction du sein après mammectomie ou lors d'un acte esthétique d'augmentation mammaire. Les brûlures et la radiodermite représente également des indications prometteuses.

Les principales contre indication du lipofilling sont essentiellement la chirurgie réparatrice post cancer de la peau ou sarcome.

QUELQUES RESULTATS DE LIPOFILLING

RESULTAT 1 :



Avant chirurgie



1 an après



5 ans après



Avant

Après



Avant



**Après 2 ans
Injection 50 cc**

RESULTAT 2 :



Hémiatrophie faciale

Lipostructure à 5 ans
Injection de 40cc de TA

RESULTAT 3 :



Avant

Après



Avant



Avant

RESULTAT 4 et 5:



Deux cas de reconstruction mammaire différée du sein gauche par lambeau musculaire de grand dorsal puis deux temps de lipofilling

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Platelet-rich plasma respectively reduces and promotes adipogenic and myofibroblastic differentiation of human adipose-derived stromal cells via the TGF β signalling pathway

Bérengère Chignon-Sicard^{1,2}, Magali Kouidhi¹, Xi Yao¹, Audrey Delerue-Audegond³, Phi Villageois¹, Pascal Peraldi¹, Patricia Ferrari⁴, Yves Rival³, David Piwnica³, Jérôme Aubert³ & Christian Dani¹

Autologous fat grafting is a gold standard therapy for soft tissue defects, but is hampered by unpredictable postoperative outcomes. Fat graft enrichment with adipose-derived stromal cell (ASCs) was recently reported to enhance graft survival. Platelet-rich plasma (PRP) has also emerged as a biologic scaffold that promotes fat graft viability. Combined ASC/PRP fat grafting enrichment is thus a promising new regenerative medicine approach. The effects of PRP on ASC proliferation are well documented, but the impact of PRP on ASC differentiation has yet to be investigated in depth to further elucidate the PRP clinical effects. Here we analyzed the human ASC fate upon PRP treatment. PRP was found to sharply reduce the potential of ASCs to undergo differentiation into adipocytes. Interestingly, the PRP anti-adipogenic effect was accompanied by the generation of myofibroblast-like cells. Among the various factors released from PRP, TGF β pathway activators played a critical role in both the anti-adipogenic and pro-myofibroblastic PRP effects. Overall, these data suggest that PRP participates in maintaining a pool of ASCs and in the repair process by promoting ASC differentiation into myofibroblast-like cells. TGF β may provide an important target pathway to improve PRP clinical outcomes.

Autologous fat grafting is a gold standard therapy for soft tissue defects, correction or augmentation in reconstructive and plastic surgery. Autologous fat grafting is particularly useful after tumor removal, in breast reconstruction surgery after mastectomy, as well as in repairing extensive facial deformities caused by injury, illness or congenital abnormalities. This treatment capitalizes on the large quantities of autologous fat that are easy to obtain in various parts of the body with minimum morbidity for patients. However, fat grafting is still controversial due to the postoperative outcome predictability. The main drawbacks of this technique are the variable engraftment results, resorption and cyst formation due to fat necrosis. Platelet-rich plasma (PRP) has recently emerged as an autologous scaffold able to promote neovascularization and fat graft viability^{1,2}. Enrichment with adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) has also been shown to enhance fat graft survival, likely through both ASC differentiation and secretion of angiogenic factors³. PRP has also been reported to stimulate ASCs secretion of angiogenic factors^{4,5}. Co-transplantation of ASCs and PRP is thus a promising cell therapy approach in regenerative medicine.

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Faculté de Médecine, 06107, Nice Cedex 2, France. ²Plastic, Reconstructive and Hand Surgery Department, Hôpital Pasteur 2, Nice, France. ³Research Galderma, Sophia, Antipolis, France. ⁴Biochemistry Department, Hôpital Pasteur 1, Nice, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D. (email: dani@unice.fr)

PRP contains a variety of growth factors, such as platelet-derived growth factors (PDGFs) and vascular endothelial growth factors (VEGFs), with neovascularization properties. PRP also releases factors from members of the transforming growth factor- β (TGF β) family that were shown to be potent anti-adipogenic factors and key mediators in the conversion of human ASCs into myofibroblast-like cells^{6,7}. The functional role of TGF β in PRP effects has, however, not been demonstrated. Myofibroblasts, characterized by α -smooth actin (α SMA) expression and collagen secretion, are key partners in the tissue repair process. However, as excessive collagen deposition is associated with fibrotic lesions, we considered it essential to study the TGF β pathway with regard to PRP effects on ASC adipogenic and myofibroblastic differentiation.

In this study, we investigated the effects of individual PRPs prepared from six healthy donors on the differentiation of three different ASC sources (see Materials and Methods). We show that the ASC adipocyte differentiation potential was sharply reduced in the presence of PRP. The PRP anti-adipogenic effect was accompanied by an increase in α -smooth muscle actin expressing cells and type 1 collagen secretion, the hallmark of myofibroblast-like cells. TGF pathway activators released from PRP were found to have a critical role in this phenomenon as the small SB431542 molecule, i.e. a selective TGF β pathway inhibitor, abolished both the anti-adipogenic and pro-myofibroblastic effects of PRP.

Results

PRP reduced adipogenic differentiation of ASCs. PRPs obtained from six healthy subjects were first tested for their ability to promote ASC proliferation. ASCs derived from paired chin- and knee-fat depots⁸ were maintained in the presence of 20% PRP. In agreement with the findings of previous studies^{4,5,9–11}, the addition of PRP dramatically promoted ASC proliferation (Fig. S1). As the impact of PRP treatment on the ASC fate has yet to be investigated, we analyzed PRP effects on the ASC adipogenic potential. The ratio of PRP used in previous publications is variable. Liao *et al.*⁹ showed that PRP displays an effect on differentiation from 5% to 20%, whereas in a clinical study, Cervelli *et al.*¹¹ showed that 40% PRP was optimal for graft maintenance. We show that the six individually tested PRPs dramatically inhibited knee-ASC adipocyte formation when used at 20%, as revealed by the lower number of adipocytes and lipid contents quantified in the PRP-treated cultures (Fig. S2). Therefore, 20% PRP was used for subsequent experiments. PRPs could have an effect when used at lower concentrations, as suggested by the effects observed when two PRPs were tested at 5% and 10% (Fig. S2). The effects of low PRP concentrations on ASC fate remain to be investigated in more details. The anti-adipogenic effect of 20% PRP was reproduced on three different ASC sources (Fig. 1A). Finally, the effect was confirmed at the molecular level, as shown by the lower expression of adipogenic genes such as *PPAR γ* (an adipogenic master gene), *AdipoQ* (an adipocyte-specific adipokine coding for adiponectin) and *FABP4* (a gene coding for a fatty acid carrier specifically expressed during adipocyte differentiation) in PRP-treated cells (Fig. 1B).

TGF β signalling pathway inhibitor SB431542 reversed PRP anti-adipogenic effects. We profiled PRPs as the first step in identifying molecular mechanisms responsible for the PRP anti-adipogenic effect. An antibody array containing cytokines/growth factors, some of which are known to play a role in adipogenesis, was thus screened. Of the 40 factors in the array (see Methods), eight displayed a fluorescent signal significantly above the background, e.g. EGFR, GM-CSF, IGFBP3, IGFBP6, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB and TGF β 1 (Fig. 2). ELISA assays confirmed that IGFBP3, PDGF-AA, leptin (not spotted in the array) and TGF β 1 were released from PRPs (Table S1). We focused on the potential role of TGF β 1 in the PRP anti-adipogenic effect. The TGF β pathway was a strong candidate for involvement in the PRP effect because this pathway was previously reported to have a potent anti-adipogenic effect mediated by Smad2/3 phosphorylation^{7,12}. As expected, ASC adipocyte differentiation was inhibited in the presence of 2 ng/ml TGF β 1 and the TGF β 1 anti-adipogenic effect was reversed using 5 μ M SB431542, a selective TGF β pathway inhibitor¹³ (Fig. S4). This SB431542 concentration was sufficient to inhibit TGF β 1-induced Smad 2/3 activation (Fig. S4). However, the functional role of TGF β in the PRP mixture has yet to be demonstrated. As shown in Fig. 3A, Smad 2/3 phosphorylation was induced upon PRP treatment and PRP-induced Smad2/3 phosphorylation was reversed in the presence of SB431542. These data strongly suggest that the TGF β pathway was activated by PRP in ASCs and could play a role in the PRP anti-adipogenic effect. To test this hypothesis, ASCs were induced to undergo adipocyte differentiation in the presence of PRP with or without the SB431542 compound. As shown, the lipid content and *FABP4* adipogenic gene expression were restored when cells were treated with 20% PRP in the presence of 5 μ M SB431542 (Fig. 3B–D). Together, these findings supported the hypothesis that the TGF β pathway activators released from PRP are major mediators of the PRP anti-adipogenic effect.

PRP induced myofibroblast-like cell phenotype reversed by SB431542. The TGF β pathway is considered to be the master pathway driving myofibroblast generation in physiological and pathological processes¹⁴. In addition, we previously reported that, in an obesity context, TGF β 1 treatment converts human ASCs into myofibroblast-like cells at the expense of adipocyte differentiation⁶. As expected, ASC myofibroblastic differentiation induced by TGF β 1 was reversed by SB431542 (see Fig. S3). These findings prompted us to investigate the fate of PRP-treated ASCs. ASCs were thus maintained in adipogenic conditions in the absence or presence of PRP and myofibroblastic marker expression was investigated. Interestingly, PRP promoted the generation of α SMA-expressing cells and *alpha-smooth muscle actin* (α SMA) gene expression (Fig. 4A,B, also see Fig. S3). The PRP-induced ASC myofibroblastic-like phenotype was confirmed by overexpression of *α 1 chain 1 of type 1 collagen* (*COL1A1*) genes, as well as by the secretion of type 1 collagen (Fig. 4C,D). Overall, these data indicated that PRP could convert ASCs into a myofibroblast-like phenotype. As for adipogenesis, SB431542 reversed PRP-induced myofibroblastic differentiation, indicating that the TGF β pathway plays a critical role in regulation of the PRP-induced ASC fate.

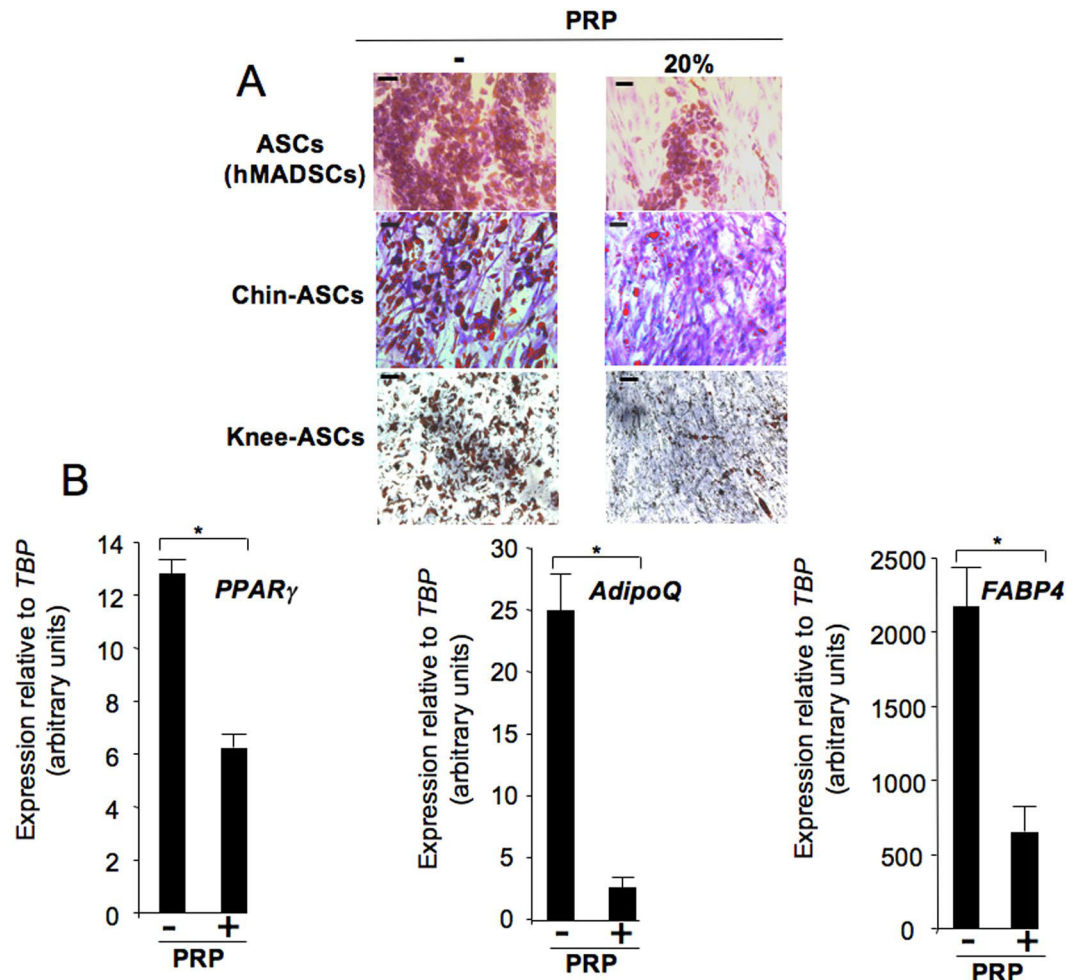


Figure 1. PRP inhibited ASC adipocyte differentiation. (A) ASCs (hMADSCs), chin- and knee-ASC primary cultures were induced to undergo adipocyte differentiation in the absence (–) or presence (+) of 20% PRP. After 10 days, cells were fixed and stained with Oil Red O to visualize lipid droplets, then with nonspecific violet crystals to stain the cell layer. Bar scale: 50 μ m. (B) ASCs were maintained as in (A) and RNAs were prepared to analyse expression of the indicated genes by real-time PCR. Values are means $\pm$ SEM ($n = 3$ individual PRPs). * $p < 0.05$.

Discussion

ASC and PRP-supplemented fat grafts are promising for reconstructive surgery. The beneficial effects of PRP include its potential to promote neovascularization and enhance fat graft viability. PRP profiling data indicated that various factors were released from our PRP preparations, as previously reported. PDGFs and TGF β 1 release have been previously reported and at concentrations similar to those shown in Table S1^{2, 15, 16}. Our experiments also revealed factors released from PRPs that were not previously reported, such as IGFBP3, IGFBP6 and leptin. Note that, in addition to being adipocyte differentiation regulators, these latter factors were also described as being critical modulators of angiogenesis^{17, 18}. The specific role of these factors has yet to be investigated, but they likely play a role in the clinical effects of PRP. One potential beneficial effect of ASC enrichment is the maintenance of a longer-term graft volume. Our data indicated that PRP promotes ASC proliferation, as previously reported, while also inhibiting ASC adipogenic differentiation. We speculate that this phenomenon observed *ex vivo* could participate in maintaining a pool of undifferentiated ASCs to enable adipocyte renewal when PRP growth factors are resorbed. Here, we showed that PRPs had an effect on the ASCs derived from the pubis fat pad from a 4 month-old child, and on ASCs derived from chin and knee adipose tissues from a 72 year-old female subject. We also observed PRP effects on ASCs derived from chin- and knee- fat depots from two 61 year-old female subjects of and one 46 year-old female subject (not shown). The effects of PRP on other sources of cells used for autologous fat grafting, such as thigh, hip, and abdominal fat pads, have yet to be analyzed, but it is tempting to propose that PRP effects are age- and fat depot-independent.

It was previously reported that mice treated with PRP displayed increased osteogenesis in bone marrow¹⁹. Interestingly, osteoblast formation was observed at the expense of bone-marrow adipogenesis, in full agreement with the PRP anti-adipogenic effect we observed with human ASCs. PRP anti-adipogenic effects on ASCs were also previously reported⁹. However, the authors of that study did not functionally identify PRP factors mediating

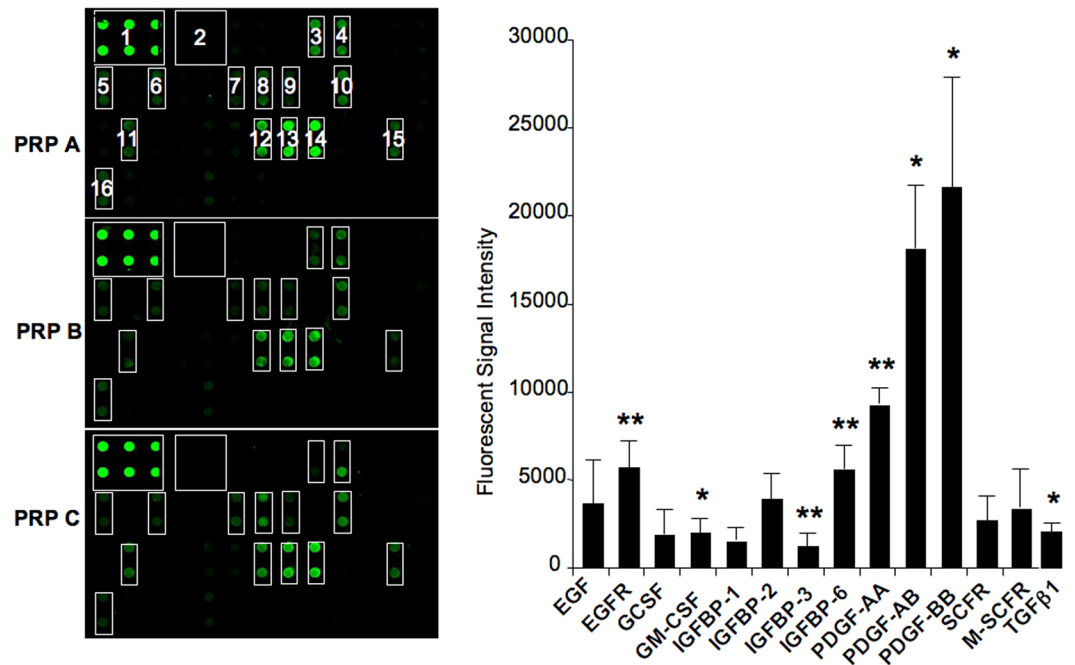


Figure 2. PRP profiling. Cytokines released from PRPs were detected using the RayBio C-Series Human Growth factor Antibody kit. Left panel: Images of arrays probed with indicated PRPs. Cytokines are spotted in duplicate and those released from PRP appear as green dots. The positions and names of cytokines that generated a detectable signal are as follows. 1: Positive control; 2: Negative control; 3: EGF; 4: EGFR; 5: GCSF; 6: GM-CSF; 7: IGFBP-1; 8: IGFBP-2; 9: IGFBP-3; 10: IGFBP-6; 11: M-CSFR; 12: PDGF-AA; 13: PDGF-AB; 14: PDGF-BB; 15: SCFR; 16: TGFβ1. Cytokines that were present on the array and non detectable are as follows: amphiregulin (AR, AREG), bFGF, b-NGF, FGF-4, FGF-6, FGF-7, GDNF, HB-EGF, HGF, IGFBP-4, IGF-I, IGF-I R, IGF-II, M-CSF, NT-3, NT-4, PDGF R a, PDGF R b, PLGF, SCF, TGF alpha, TGF beta2, TGF beta3, VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3, VEGF-D. Right panel: factors/cytokines presenting a detectable fluorescent signal are indicated. Values are the fluorescence means $\pm$ SEM (n = 3 individual PRPs.) *p < 0.05; **p < 0.01.

this effect, nor did they investigate the fate of PRP-treated ASCs. It is now essential to identify the signalling pathways responsible for PRP effects to enhance clinical applications. We demonstrated, for the first time, that PRP induced ASC myofibroblast differentiation at the expense of adipogenesis and that the TGFβ pathway played a critical role in these effects. Pro-adipogenic effects of PRP have also been reported, but only when PRP was associated with high insulin concentrations¹¹. At these concentrations it is known that insulin mimics IGF1 effects. Interestingly, IGF-I signals cross-talk at multiple levels with various components of the TGFβ signalling pathway²⁰. Further studies on the cross-talk between IGF1 and TGFβ pathways would therefore be of interest, while also analysing their impact on PRP effects.

Finally, the ability of PRP to convert ASCs into myofibroblast-like cells could have clinical consequences. Myofibroblasts are known to participate in tissue repair processes while also being the cellular source of fibrosis when there is excessive collagen deposition. Recently, adipocyte-myofibroblast transition has been proposed as one of the cellular mechanisms leading to cutaneous fibrosis pathogenesis²¹. The PRP-induced ASC myofibroblast-like phenotype would thus require further investigation to assess both the benefits and potential negative outcomes. Our study highlighted a molecular mechanism that might be involved in the clinical effects of PRP when combined with ASC-enriched fat grafting. Note that PRPs can have different properties according to the system used for their purification^{15,16}. The myofibroblastic potential of PRPs from different preparation has yet to be analyzed. The next step would be to investigate our *in vitro* approach in an animal model. *In vivo* analysis of the impact of PRP depleted of TGFβ activity by co-injection of PRP with pharmacological molecule inhibitors of the TGFβ pathway could provide an opportunity to enhance fat grafting.

Methods

Isolation, characterization and culture of adipose-derived stem/stromal cells. Experiments were carried out using adipose stem cells (ASCs) derived from the pubic region fat pad of a 4-month old male donor. These cells were previously named hMADS3 cells²² and are called ASCs (hMADSCs) here, compliance with the international nomenclature. They were characterized according to the ISCT criteria²³ via the expression of cell surface markers and their potential to differentiate at the single cell level into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes as previously described^{22,24}. Their potential to differentiate into myofibroblast-like cells has been more recently reported⁶. PRP effects have also been investigated on adipose-derived stromal cell (ASCs) primary cultures. They were derived from paired chin- and knee-fat depots from a healthy 72 year old female subject as described previously⁸. Briefly, chin- and knee-fat sampling was performed using 10-ml syringes and

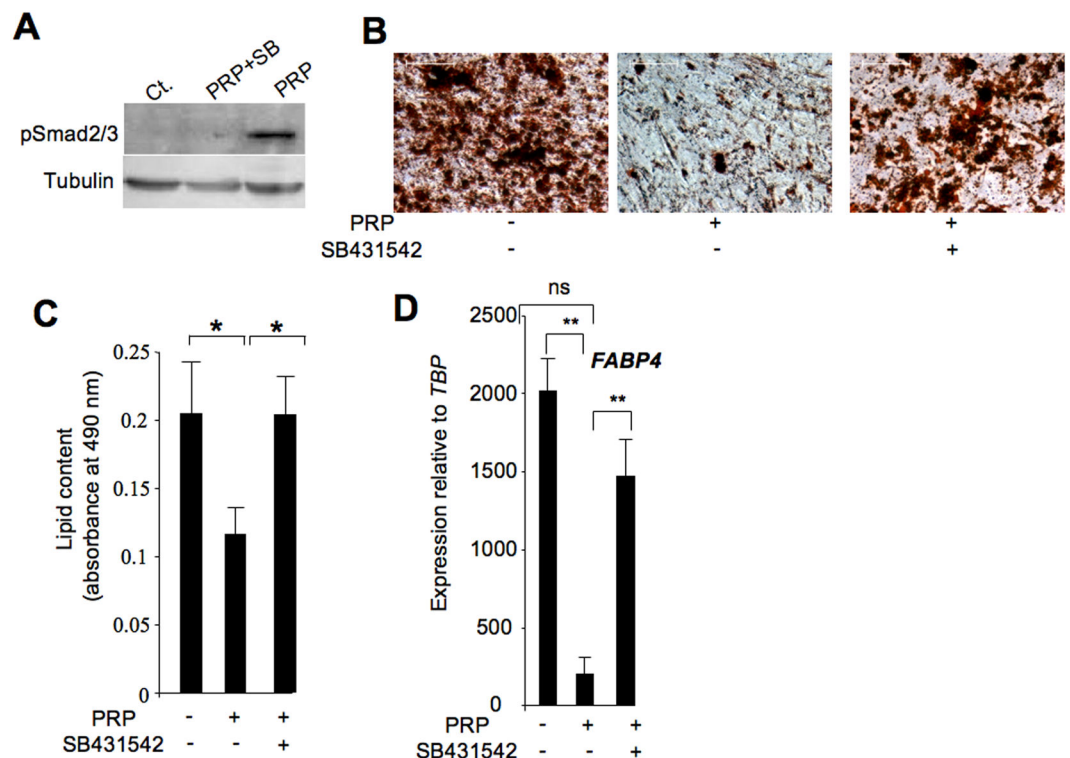


Figure 3. TGF β pathway inhibitor SB 431542 reversed anti-adipogenic PRP effects. **(A)** ASC (hMADSCs) proteins were extracted 1 hour after treatment with 20% PRPs in the absence or presence of 5 μ M SB431542 and analyzed for expression of total Smad2/3 and activated phospho Smad2/3. The blots were cropped. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S5. **(B)** A representative photomicrographic record of ASCs (hMADSCs) treated or not with 20% PRP and 5 μ M SB431542. Bar scale: 50 μ m. **(C)** The lipid content was measured by quantification of Oil Red O staining. Values are the mean $\pm$ SEM (n = 4) for individual PRPs. **(D)** ASCs (hMADSCs) and chin-ASCs were induced to undergo adipocyte differentiation in the presence of four individual PRPs. After 10 days, RNAs were prepared and *FABP4* adipogenic gene expression was analyzed by real-time PCR. Values are the mean $\pm$ SEM (n = 4 for individual PRPs). **p < 0.01.

was centrifuged at $12,000 \times g$ for 3 min. The lower liquid phase and the oily upper phase were withdrawn. Fat pads were then dissociated with 200 mg/ml collagenase and the stromal vascular fraction (SVF) was separated from the adipocyte fraction by low speed centrifugation. The SVF was then seeded on tissue culture plates and adherent cells were maintained in proliferation medium composed of DMEM (low glucose) containing 10% foetal calf serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and streptomycin and supplemented with 2.5 ng/ml FGF2, as previously reported²⁴. ASCs were characterized by their capacity to generate adipocytes as previously described⁸. Adipose tissue samples were collected, as scraps from surgical specimens, with the informed consent of the subject, and of the baby's parents for hMADS cells. All methods were approved and performed in accordance with the guidelines and regulations of the Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice.

PRP preparation and profiling. Whole blood was collected from six healthy donors and the six individual PRPs were prepared using the RegenACR-C Extra kit according to the manufacturer's instructions (Regen Lab, Switzerland). The donors' age and gender for the individual PRPs were: PRP A: 19 year old female; PRP B 35 year old: female; PRP C: 31 year old female; PRP D: 48 year old female; PRP F: 72 year old male and PRP G: 67 year old female. PRP was frozen for activation before the first use²⁵. PRP was then diluted at the indicated doses, where 20% represent for a fivefold dilution in the culture medium in the presence of 20 μ g/ml heparin. PRPs were not pooled but used individually. Blood samples were collected with the informed consent of the six blood donors. All methods were approved and performed in accordance with the guidelines and regulations of Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice.

Simultaneous detection of multiple cytokines released from PRP was determined using the RayBio C_Series Human Growth Factor Antibody kit (RayBiotech, Inc, US). The specific antibodies on the array were for the detection of: amphiregulin (AR, AREG), bFGF, b-NGF, EGF, EGF R, FGF-4, FGF-6, FGF-7, GCSF, GDNF, GM-CSF, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-I, IGF-I R, IGF-II, M-CSF, M-CSF R, NT-3, NT-4, PDGF R a, PDGF R b, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PLGF, SCF, SCF R, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3, VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3, VEGF-D. PRP profiling was performed by the Tebu-Bio service (France) according to manufacturer's instructions.

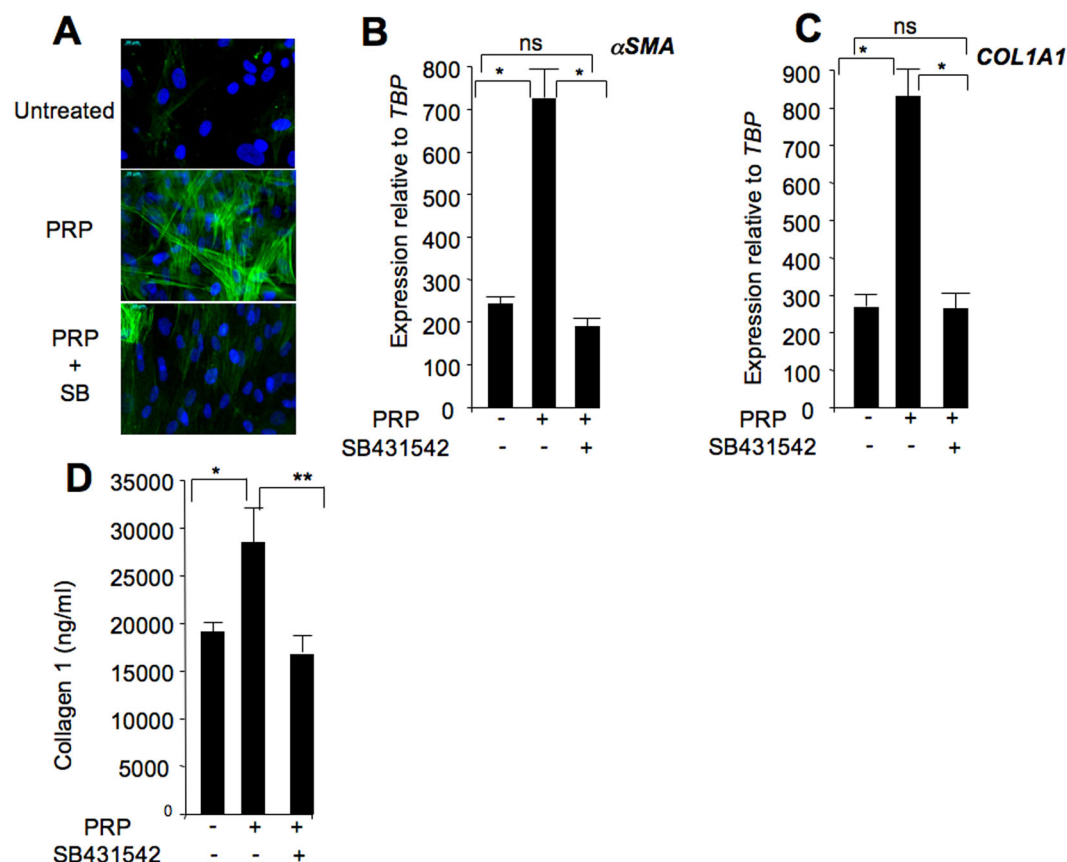


Figure 4. PRP-induced myofibroblast-like phenotype reversed by SB431542. ASCs were induced to undergo adipocyte differentiation for 11 days in the indicated conditions. (A) Generation of α SMA-expressing cells was revealed by immunofluorescence. (B,C) RNAs were prepared and expression of the indicated genes was analyzed by real-time PCR. Values are the mean $\pm$ SEM (n = 4 individual PRPs). (D) Media were collected and collagen type 1 secretion was quantified. Values are the mean $\pm$ SEM (n = 4 individual PRPs). *p < 0.05, **p < 0.01.

ELISA and collagen secretion. IGFBP3 and PDGF-AA were quantified using Sigma-Aldrich (Saint-Louis) ELISA kits and TGF β 1 using the Biosciences (London) ELISA kit. Leptin using the TECO medical ELISA kit (Sissach, Switzerland). Secretion of type I collagen in response to PRP treatment was quantified with an enzyme-linked immunosorbent assay according to the supplier's instructions (PCI C-peptide EIA KIT, Takara Bio Inc, Japan).

Assessment of ASC differentiation. ASCs were maintained in proliferation medium until they reached confluence. Then, cells were induced to undergo differentiation in adipogenic medium composed of DMEM supplemented with 10% FCS, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, 0.2 nM triiodothyronine, 1 μ g/ml insulin and 1 μ M rosiglitazone (BRL49653, a PPAR γ agonist), 20 μ g/ml heparin in the absence or presence of PRP.

Lipid accumulation was assessed by Oil Red O staining. Cells were stained as previously described²⁶ and images were recorded under light microscopy. Then, Oil Red O stained cells were quantified by washing in water and lipid-bound Oil Red-O was dissolved in isopropanol for 15 min. Dissolved Oil Red O absorbance was determined at 490 nm on a microplate reader (BioRad iMark).

Adipogenic and myofibroblast-gene expression was performed by quantitative PCR. RNAs were purified on RNeasy columns (Qiagen, France). RNA sample concentrations were determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus system (Applied Biosystems, Life Technologies France). Transcript expression levels were evaluated using the comparative CT method (2-deltaCT). Delta delta Ct values were used when the 'expression relative to TBP' was indicated. The TATA-binding protein gene expression (TBP) was used for sample normalization.

Primer sequences used for real-time PCR were:

PPAR γ : Fw: AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA; Rv: TCCGGAAGAAACCCTTGCA

Adiponectin Fw: GCAGTCTGTGGTTCTGATTCCATAC; Rv: GCCCTTGAGTCGTGGTTTCC

FABP4 Fw: GGGACGTTGACCTGGACTGA; Rv: GGGAGAAAATTACTTGCTTGCTAA

ColA1 Fw: ACCTGCGTGACCCCACTCA; Rv: CCGCCATACTCGAACTGGAA

Alpha smooth muscle actin Fw: TGGATCAGCAAACAGGAATACG; Rv: GCATTTGCGGTGGACAATG

TBP Fw: ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC; Rv: CAAACCGCTTGGGATTATATTCGA

For protein preparation and Western blot analysis cells were rinsed with PBS and solubilized in stop buffer containing 50 mM Hepes, at pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, and 1% Triton X-100 supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Antibodies against Phospho-Smad2 (Ser465/467) and total Smad2/3 were from Cell Signaling. Anti-Tubulin was from Sigma and used according to the manufacturer's instructions. Western-blots were performed as previously described²⁷.

For immunofluorescence, cells were fixed for 10 min in Roti-Histofix (Roth, Lauterbourg, France). Nonspecific signals were blocked with 3% bovine serum albumin containing 0.1% tween-20 and 0.1% Triton X-100 for 30 min permeabilization. α smooth muscle actin (α SMA) antibody was from BD-Biosciences (Le Pont de Claix, France) and the secondary Alexa Fluor® 488 conjugated antibody was purchased from Life Technologies SAS (Saint Aubin, France). Cells were mounted in Mowiol containing Hoechst, and visualized with an Axiovert microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) under oil immersion. Images were taken on a Zeiss Axio Observer microscope with a EC Plan Neofluar 40X (NA 1.3) oil objective using AxioVision 4.8.2 software and captured using AxioVision software (Zeiss).

Statistical analysis. The data are the means $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using InStat3 software. A nonparametric unpaired test (Mann-Whitney or Student's *t*-test) was used. P values < 0.05 were considered significant.

References

- Blanton, M. W. *et al.* Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg* **123**, 56S–64S, doi:10.1097/PRS.0b013e318191be2d (2009).
- Liao, H. T., Marra, K. G. & Rubin, J. P. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev* **20**, 267–76, doi:10.1089/ten.teb.2013.0317 (2013).
- Kolle, S. F. *et al.* Enrichment of autologous fat grafts with *ex-vivo* expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **382**, 1113–20, doi:10.1016/S0140-6736(13)61410-5 (2013).
- D'Esposito, V. *et al.* Platelet-Rich Plasma Increases Growth and Motility of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Controls Adipocyte Secretory Function. *J Cell Biochem* **116**, 2408–18, doi:10.1002/jcb.v116.10 (2015).
- Willemsen, J. C., Spiekman, M., Stevens, H. P., van der Lei, B. & Harmsen, M. C. Platelet-Rich Plasma Influences Expansion and Paracrine Function of Adipose-Derived Stromal Cells in a Dose-Dependent Fashion. *Plast Reconstr Surg* **137**, 554e–565e, doi:10.1097/01.prs.0000479995.04255.bb (2016).
- Bourlier, V. *et al.* TGFbeta Family Members Are Key Mediators in the Induction of Myofibroblast Phenotype of Human Adipose Tissue Progenitor Cells by Macrophages. *PLoS One* **7**, e31274, doi:10.1371/journal.pone.0031274 (2012).
- Dani, C. Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* **37**, 163–6, doi:10.1038/ijo.2012.28 (2013).
- Kouidhi, M. *et al.* Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Int* **2015**, 592090–11, doi:10.1155/2015/592090 (2015).
- Liao, H. T., James, I. B., Marra, K. G. & Rubin, J. P. The Effects of Platelet-Rich Plasma on Cell Proliferation and Adipogenic Potential of Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A* **21**, 2714–22, doi:10.1089/ten.tea.2015.0159 (2015).
- Kakudo, N. *et al.* Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* **122**, 1352–60, doi:10.1097/PRS.0b013e3181882046 (2008).
- Cervelli, V. *et al.* Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl Med* **1**, 206–20, doi:10.5966/sctm.2011-0052 (2012).
- Zamani, N. & Brown, C. W. Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev* **32**, 387–403, doi:10.1210/er.2010-0018 (2011).
- Inman, G. J. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**, 65–74, doi:10.1124/mol.62.1.65 (2002).
- Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* **12**, 325–38, doi:10.1038/nrneph.2016.48 (2016).
- Magalon, J. *et al.* Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model. *Arthroscopy* **30**, 629–38, doi:10.1016/j.arthro.2014.02.020 (2014).
- Mazzucco, L., Balbo, V., Cattana, E., Guaschino, R. & Borzini, P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateletex and one manual procedure. *Vox Sang* **97**, 110–8, doi:10.1111/vox.2009.97.issue-2 (2009).
- Bouloumie, A., Drexler, H. C., Lafontan, M. & Busse, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* **83**, 1059–66, doi:10.1161/01.RES.83.10.1059 (1998).
- Chan, S. S., Schedlich, L. J., Twigg, S. M. & Baxter, R. C. Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E654–63, doi:10.1152/ajpendo.90846.2008 (2009).
- Liu, H. Y. *et al.* The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. *Biomaterials* **32**, 6773–80, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.080 (2011).
- Danielpour, D. & Song, K. Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 59–74, doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.007 (2006).
- Marangoni, R. G. *et al.* Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1062–73, doi:10.1002/art.v67.4 (2015).
- Rodriguez, A.-M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* **201**, 1397–1405, doi:10.1084/jem.20042224 (2005).
- Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7, doi:10.1080/14653240600855905 (2006).
- Zaragosi, L. E., Ailhaud, G. & Dani, C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* **24**, 2412–9, doi:10.1634/stemcells.2006-0006 (2006).
- Roffi, A. *et al.* Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int* **2014**, 692913–10, doi:10.1155/2014/692913 (2014).
- Wdzienkowski, B., Villageois, P. & Dani, C. Development of adipocytes from differentiated ES cells. *Methods Enzymol* **365**, 268–77, doi:10.1016/S0076-6879(03)65019-6 (2003).
- Hafner, A. L. *et al.* Brown-like adipose progenitors derived from human induced pluripotent stem cells: Identification of critical pathways governing their adipogenic capacity. *Sci Rep* **6**, 32490, doi:10.1038/srep32490 (2016).

Acknowledgements

This study was supported by the French government (ANR) through the “Investments for the future” LABEX Signalife, program reference ANR-11-LABEX-0028-01, by the Agence de Biomédecine Greffe 2016, and the Fondation des Gueules Cassées n°05-2015.

Author Contributions

B.C.-S. and M.K. designed and conducted the experiments; X.Y., P.V., A.D.-A., P.F. and P.P. conducted experiments; Y.R., D.P., J.A., B.C.-S. and C.D. analyzed the results; C.D. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-03113-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03113-0)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Research Article

Characterization of Human Knee and Chin Adipose-Derived Stromal Cells

Magali Kouidhi,¹ Phi Villageois,¹ Carine M. Mounier,² Corinne Ménigot,² Yves Rival,² David Piwnica,² Jérôme Aubert,² Bérengère Chignon-Sicard,^{1,3} and Christian Dani¹

¹*iBV, UMR CNRS/INSERM, Faculté de Médecine, Université Nice Sophia Antipolis, 06107 Nice Cedex 2, France*

²*Research, Galderma, Sophia Antipolis, 06410 Biot, France*

³*Plastic, Reconstructive and Hand Surgery Department, Saint Roch Hospital, 06000 Nice, France*

Correspondence should be addressed to Christian Dani; dani@unice.fr

Received 1 December 2014; Accepted 9 January 2015

Academic Editor: Eva Mezey

Copyright © 2015 Magali Kouidhi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Animal study findings have revealed that individual fat depots are not functionally equivalent and have different embryonic origins depending on the anatomic location. Mouse bone regeneration studies have also shown that it is essential to match the *Hox* code of transplanted cells and host tissues to achieve correct repair. However, subcutaneous fat depots from any donor site are often used in autologous fat grafting. Our study was thus carried out to determine the embryonic origins of human facial (chin) and limb (knee) fat depots and whether they had similar features and molecular matching patterns. Paired chin and knee fat depots were harvested from 11 subjects and gene expression profiles were determined by DNA microarray analyses. Adipose-derived stromal cells (ASCs) from both sites were isolated and analyzed for their capacity to proliferate, form clones, and differentiate. Chin and knee fat depots expressed a different *HOX* code and could have different embryonic origins. ASCs displayed a different phenotype, with chin-ASCs having the potential to differentiate into brown-like adipocytes, whereas knee-ASCs differentiated into white adipocytes. These results highlighted different features for these two fat sites and indicated that donor site selection might be an important factor to be considered when applying adipose tissue in cell-based therapies.

1. Introduction

Autologous fat grafting remains the gold standard therapy for soft tissue defects, correction or, augmentation in reconstructive and plastic surgery. Autologous fat grafting is particularly useful after tumor removal, for breast reconstruction surgery after mastectomy, to repair extensive facial deformities caused by injury, illness, or congenital abnormalities. With some variations, the technique consists of three stages: fat harvesting from any donor site, processing of the aspirate, and reimplantation at a site that differs from the donor site [1]. Enriching fat grafts with adipose-derived-stromal cells (ASCs) dramatically enhances fat graft survival [2]. A commercial device for ASC isolation and reinjection preparation has recently received FDA approval, illustrating the increased use of adipose tissues and ASCs for a broad range of cell-based therapies [3]. The treatment's main advantages are that autologous fat is easy to obtain in large

quantities in various parts of the body with minimum morbidity for patients. However, there are still controversies and unresolved questions regarding autologous fat grafting due to the unpredictability of postoperative outcomes. The main disadvantages of this technique are variable engraftment and resorption rates, microcalcification, and cyst formation due to fat necrosis [4]. The differentiation of ASCs toward an undesirable cell type after grafting cannot be ruled out. Indeed, clinical results are unpredictable, without any clue about the reasons underlying the reconstruction success or failure. Greater cellular and molecular knowledge regarding adipose tissues is essential to improve postoperative outcomes.

Two functionally different types of adipose tissue—brown and white—coexist in mammals. Both are involved in the energy balance but have opposite functions. White adipose tissue is mainly involved in energy storage and mobilization in the form of triglycerides. In contrast, brown adipose tissue

burns fat and is specialized in energy expenditure. In this key thermogenic organ, brown adipocytes convert nutrients into heat by uncoupling respiration from ATP synthesis. This process is mediated by the brown adipocyte-specific uncoupling protein (UCP)1 and is stimulated through a PKA-dependent pathway [5]. Human brown adipose tissue represents a minor fraction of adipose tissue, is scattered throughout the body, and disappears from most areas with age, persisting only around deeper organs [6]. White adipose tissue is more abundant, dispersed throughout the body, and functional differences between fat depots have been reported. Individual white adipose tissues are not equivalent, in terms of ASC abundance, proliferation, and differentiation [7, 8]. Recent published data, including ours, demonstrated different embryonic origins for adipocytes in rodents [9, 10]. Contrary to the previous belief that adipocytes derive from mesoderm only, we have shown a neuroectoderm origin for cephalic adipocytes [11]. It has been proposed that embryonic origins could play a critical role in differences observed between fat depots.

Despite the heterogeneity in fat depots, it is still considered that any adipose tissue site, such as abdomen, knee, and hip, could be used as a fat depot donor site for facial transplants. The donor site is usually selected by the surgeon based on the quantity of fat needed or on the patient's preference. The question regarding the best donor site for grafting to a heterotopic site remains unclear because no scientific studies have adequately addressed this issue.

Homeobox (*Hox*) genes encode transcription factors determining the positional identity along the anterior-posterior body axis of animal embryos [12], and recent studies revealed that they also have prominent roles in adult cells [13]. The *Hox* code, that is, the *Hox* gene expression profile, has been shown to play a critical role in stem cell positional identity. More importantly, this positional identity is retained after transplantation [13]. Leucht et al. illustrated the critical role of *Hox* code, showing that transplanting tibia-derived *Hox*-positive osteogenic stem cells into a *Hox*-negative site in mandible leads to aberrant bone regeneration [14]. The influence of the *Hox* code has also been highlighted in wound healing [15, 16]. Overall, these animal model studies have highlighted that a *Hox* code mismatch can prevent grafted stem cells from participating in tissue regeneration. The *HOX* code matching between donor and host fats remains to be determined.

Therefore, the cell sources of adipose tissues from different body sites that are used for transplantation at heterotopic sites may not be equivalent. Molecular characterization of tissues from donor and host fat sites that are used for autologous fat transplantation in reconstructive medicine is crucial. In the present study, we compared two human fat sites—limb and face—as a first step to investigate the therapeutic properties of fat according to its anatomical localization.

2. Materials and Methods

2.1. RNA Preparation. Chin and knee paired fat depots were collected from 11 Caucasians women (age 64 ± 13 years,

BMI $21.9 \pm 1.5 \text{ Kg/m}^2$) who underwent elective liposuction procedures, after obtaining their informed consent. Fat tissues were lysed by the addition of TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and RNAs were purified on RNeasy Plus Universal columns (Qiagen, France), according to the manufacturer's instructions. Concentrations of total RNA samples were first evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and RNA samples were run in an RNA nanochip in a 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) to verify the RNA sample integrity. All samples displayed good integrity with a measured RNA integrity number (RIN) > 6 .

2.2. Whole-Genome Transcriptome Analysis. The Affymetrix analysis was performed with 11 paired samples of chin and knee fat tissues.

Affymetrix Probe Synthesis, Hybridization, Scanning, and Quality Controls. cRNA labelling was achieved starting from 300–500 ng of total RNA from samples. RNA was converted to double-stranded cDNA with a T7-(dT) primer. cDNA was *in vitro* transcribed to biotinylated complementary RNA (cRNA) by incorporating biotin-CTP and biotin UTP using the Affymetrix IVT labelling kit. 15 μg of biotin-labelled RNA were fragmented to 200 bp size by incubation in fragmentation buffer containing 200 mM Tris-acetate pH 8.2, 500 mM potassium acetate, and 500 mM magnesium acetate for 35 min at 94°C prior to hybridization. For the Affymetrix probe hybridization step, fragmented biotinylated RNA was assessed for relative length on an Agilent 2100 bioanalyzer and hybridized on Affymetrix U133 Plus 2.0 chips for 16 h at 45°C , washed and stained on an Affymetrix fluidic station, and scanned using an Affymetrix genechip scanner. Affymetrix RMA software was used to generate the cell files and to control the data quality prior to the data analysis. These controls included: back_spikes, Housekeeping genes, pm_mean, Mad_residual_mean, Rle_mean, and Box Plot. Validation of all chips was achieved using the principal component analysis (PCA) which is a mathematical procedure based on an orthogonal transformation to convert a set of observations of possibly correlated variables into a set of values of uncorrelated variables called principal components.

Normalization of the Affymetrix Data. All 22 chips were normalized with the Array Studio software package (OmicSoft Corporation, USA) using the three-step robust multichip average (RMA) method: background adjustment, quantile normalization, and finally summarization [17].

Only Affymetrix identifiers (IDs) with expression level $\geq 2^6$ in at least 6 samples in at least one condition were selected for statistical analysis, resulting in data for 29131 out of 54675 IDs present on the HG_U133_Plus_2 chip.

2.3. Isolation of Adipose-Stromal Cells and Gene Expression Analysis by Real-Time PCR. Adipose-stromal cells (ASCs) were isolated from 9 paired chin-knee adipose tissues and expanded as previously described [18, 19]. Briefly, fat pads

were dissociated with 200 mg/ml collagenase and the stromal vascular fraction (SVF) was separated from the adipocyte fraction by low speed centrifugation. Then, the SVF was seeded onto tissue culture plates and cells were maintained in low DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. After reaching 80% confluence, cells were dissociated, split, and expanded in the presence of 2.5 ng/ml FGF2. This passage was designated passage 1. RNAs were purified on RNeasy columns (Qiagen, France). Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus system (Applied Biosystems, Life Technologies, France). Transcript expression levels were evaluated using the comparative CT method (2-deltaCT). Delta Ct values were used when “expression relative to *TBP*” is indicated. *TBP* was used for sample normalization.

2.4. ASC Proliferation, Clonogenic and Differentiation Assays. Chin- and knee-ASCs were split every 4 days. The estimated population doubling time was 30 hours, and analyses were carried out between passage 2 and passage 4.

For proliferation tests, cells were plated on 24-well plates at 5000 cells/well in proliferation medium (DMEM medium supplemented with 10% FCS). Cell numbers were counted at different times after plating using a particle counter (Coulter Beckman).

For the fibroblastoid colony-forming unit assays, cells were plated at 1000-cell density in a 10 mm diameter culture dish in proliferation culture medium. Ten days later, cells were fixed with phosphate-buffer containing 4% formaldehyde and then stained with crystal violet 0.1% before counting.

For adipocyte differentiation, cells were plated on 24-well plates at 100 000 cells/well in proliferation medium. When cells reached confluence, culture medium was replaced by adipogenic differentiation medium composed of proliferation medium supplemented with dexamethasone (0.25 μ M), isobutylmethylxanthine (500 μ M), human recombinant insulin (0.34 μ M), triiodothyronine (0.2 nM), and rosiglitazone (1 μ M). The adipogenic differentiation medium was changed twice a week. After 10 days, cells were fixed with Oil red O [19] or lysed for RNA preparation.

2.5. UCPI Protein Expression in Differentiated ASCs. ASC-differentiated cells were harvested at day 16 after adipogenic induction. Proteins were extracted and 100 μ g protein per condition was separated by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was first incubated with an antibody against UCPI (Calbiochem) and was then incubated with a secondary antibody rabbit IgG-conjugated horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were treated with the chemiluminescent HRP substrate (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Tubulin was detected as a control with tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

2.6. Triglyceride Accumulation and Lipolysis Assays. ASCs were induced to undergo differentiation as described above.

At day 16 after induction, cells were harvested and the intracellular triglyceride concentration was measured using the Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical) according to the manufacturer's instructions. For lipolysis assays, cells were treated with 10 μ M forskolin for 4 h and the secreted glycerol concentration was measured in culture supernatant using the Free Glycerol Reagent Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Statistics Analysis. Statistical analysis of the normalized Affymetrix data: for the knee versus chin comparison, a two-sided paired *t*-test was applied using Array Studio software. The Benjamini-Hochberg procedure was used for multiple testing corrections [20]. False discovery rate (FDR) control is a statistical method used in multiple hypotheses testing to correct for multiple comparisons. InStat3 software and a nonparametric unpaired test (Mann-Whitney) were used for statistical analysis of real-time PCR data. *P* values are indicated on each figure.

3. Results and Discussion

3.1. Large-Scale Affymetrix Transcriptomics Revealed Differential Expression of *Pax3* and *HOX* Genes in Human Chin and Knee Fat Depots. A large-scale transcriptomic analysis was performed using Affymetrix technology to compare the transcriptome from knee versus chin adipose tissues. A total of 346 genes (determined from the 486 modulated Ids) were found to be differentially expressed with a fold < 2 and a FDR value < 0.05 (all differentially modulated ids available on demand). These 346 differentially expressed genes were equally distributed between upregulated and downregulated genes (181 up- and 165 downregulated genes). Among the TOP50 upregulated genes were mainly found homeobox genes and inflammatory-related genes. By contrast, most of the genes found in the TOP50 downregulated genes belonged to the “muscle function” (Table 1). Interestingly, microarray analysis revealed that *Pax3* expression was enhanced in chin fat compared to knee fat (Figure 1(a)). Lineage tracing experiments in mice allow establishing a neuroectodermic/neural crest and mesodermic embryonic origins for adipose tissues located in the face and trunk, respectively. As lineage tracing is impossible in humans, only specific marker expression could be used to propose an embryonic origin of human samples. *Pax3* expression was shown to be associated with neural crest development in humans and to be maintained in adult progenies [21]. *Pax3* thus represents a unique neural crest marker in adult humans. Therefore, microarray analysis data strongly suggest that chin fat, but not knee fat, originates from the neural crest. This hypothesis is in agreement with what we observed in mice [11]. *HOX* gene expression profiles were then compared in paired adipose tissue samples. Thirty-eight *HOX* genes were detected on Affymetrix chips and 25 of them displayed significant differential expression between both sites (Figure 1(b)). Among those, 4 *HOX* genes (*HOXD-AS2*, *HOXD8*, *SHOX2*, and *HOXB-AS3*) were 1.4- to 1.8-fold more expressed in chin fat than in knee fat. In contrast, 21 *HOX* genes were preferentially expressed in

TABLE 1: TOP50 of the down- and upregulated genes between knee and chin adipose tissue depots from the large scale transcriptomic experiment.

Gene symbol	Gene title	Knee versus chin FDR	Fold change
ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	0,0006	-69,62
MYH2	Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	0,0004	-65,45
KBTBD10	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	0,0016	-62,65
MYL1	Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	0,0026	-31,4
CKM	Creatine kinase, muscle	0,0026	-29,47
MYBPC1	Myosin binding protein C, slow type	0,0027	-28,89
MB	Myoglobin	0,0025	-25,84
MYL2	Myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	0,0029	-24,41
SLN	Sarcolipin	0,0052	-22,39
CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	0,0034	-18,46
NEB	Nebulin	0,0037	-17,84
MYOT	Myotilin	0,0046	-16,77
TTN	Titin	0,0069	-16,52
SMPX	Small muscle protein, X-linked	0,0094	-14,54
COL6A6	Collagen, type VI, alpha 6	0,0004	-14,47
KBTBD10	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	0,0093	-14,24
TNNC2	Troponin C type 2 (fast)	0,0043	-13,86
TNNI2	Troponin I type 2 (skeletal, fast)	0,0076	-13,15
TNNC1	Troponin C type 1 (slow)	0,0053	-12,35
TNNT1	Troponin T type 1 (skeletal, slow)	0,0051	-12,08
XIRP2	Xin actin-binding repeat containing 2	0,0086	-11,91
TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)	0,0092	-11,73
ENO3	Enolase 3 (beta, muscle)	0,0059	-11,71
PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	0,0085	-10,49
ASB5	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 5	0,0142	-10,38
MYLPF	Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	0,0092	-9,51
CADM2	Cell adhesion molecule 2	5,51E - 05	-9,22
MYH6	Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha///myosin	0,0105	-8,65
CA3	Carbonic anhydrase III, muscle specific	0,0006	-8,27
MYBPC2	Myosin binding protein C, fast type	0,0097	-8,06
MYOZ1	Myozenin 1	0,012	-7,9
ACTN2	Actinin, alpha 2	0,0155	-7,86
TRDN	Triadin	0,0075	-7,71
CADM2	Cell adhesion molecule 2	0,0003	-6,45
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0,0002	-6,29
PAX3	Paired box 3	0,0001	-6,26
TTN	Titin	0,0317	-6,11
CADM2	Cell adhesion molecule 2	0,0003	-5,98
AMPD1	Adenosine monophosphate deaminase 1	0,0243	-5,97
LDB3	LIM domain binding 3	0,0143	-5,96
LMOD2	Leiomodin 2 (cardiac)	0,0218	-5,94
TPM3	Tropomyosin 3	0,0139	-5,9
APOBEC2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme	0,0126	-5,8
C8orf22	Chromosome 8 open reading frame 22	0,008	-5,79
RBM24	RNA binding motif protein 24	0,0006	-5,74

TABLE 1: Continued.

Gene symbol	Gene title	Knee versus chin FDR	Fold change
TTN	Titin	0,0171	-5,62
PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	0,0325	-5,57
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0,0002	-5,45
CMYA5	Cardiomyopathy associated 5	0,0152	-5,31
PKIA	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	0,0038	-5,31
PCDH7	Protocadherin 7	0,0008	-5,23
HSPB3	Heat shock 27kDa protein 3	0,0235	-5,19
PPBP	Proplatelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	0,0153	-5,14
MYH1	Myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult	0,0276	-5,11
NRAP	Nebulin-related anchoring protein	0,0129	-5,08
POPDC3	Popeye domain containing 3	0,0033	-5,03
MYOZ2	Myozenin 2	0,0209	-4,99
HOXA10	Homeobox A10	1,40E - 09	37,88
HOXA9	Homeobox A9	9,16E - 08	23,43
HOXA9	Homeobox A9	8,09E - 07	13,38
HOXC6	Homeobox C6	1,93E - 07	9,92
TNC	Tenascin C	0,0005	8,26
HOXC10	Homeobox C10	3,47E - 06	7,8
IGH@///IGHG1///	Immunoglobulin heavy locus	0,0021	7,59
IGJ	Immunoglobulin J polypeptide	0,0083	7,41
HOXA10	Homeobox A10	3,47E - 06	7,37
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	0,0008	7,09
SAA1///SAA2	Serum amyloid A1///serum amyloid A2	0,0004	7,04
HOXA3	Homeobox A3	5,60E - 05	6,88
HOXC9	Homeobox C9	1,32E - 06	5,87
CYAT1///IGLV1-44	Cyclosporin A transporter 1/	0,0076	5,83
ASPN	Asporin	1,32E - 06	5,76
HOXA5	Homeobox A5	9,27E - 05	5,28
ASPN	Asporin	4,94E - 06	5,2
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	0,0021	4,82
SAA1///SAA2	Serum amyloid A1///serum amyloid A2	0,0011	4,75
ATP8B4	ATPase, class I, type 8B, member 4	2,99E - 06	4,61
IGL@	Immunoglobulin lambda locus	0,0058	4,6
CSN1S1	Casein alpha s1	0,0143	4,04
CYAT1///IGLV1-44	Cyclosporin A transporter 1	0,008	3,96
PRG4	Proteoglycan 4	0,001	3,95
IGH@///IGHA1	Immunoglobulin heavy locus	0,0172	3,75
HOXA7	Homeobox A7	5,44E - 05	3,69
HOXB7	Homeobox B7	2,43E - 05	3,63
IGLV1-44	Immunoglobulin lambda variable 1-44	0,013	3,6
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0,0002	3,54
FGFBP2	Fibroblast growth factor binding protein 2	0,0013	3,54
ZIC1	Zic family member 1 (odd-paired homolog, <i>Drosophila</i>)	0,0054	3,5
CP	Ceruloplasmin (ferroxidase)	0,0003	3,43
IGK@///IGKC	Immunoglobulin kappa locus t	0,0132	3,39

TABLE 1: Continued.

Gene symbol	Gene title	Knee versus chin FDR	Fold change
IGK@///IGKC	Immunoglobulin kappa locus///immunoglobulin kappa constant	0,012	3,37
ISM1	Isthmin 1 homolog (zebrafish)	0,0006	3,36
PHLDA2	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	0,0011	3,34
NPY1R	Neuropeptide Y receptor Y1	0,0017	3,31
EVI2A	Ecotropic viral integration site 2A	0,0014	3,29
HOXB7	Homeobox B7	2,86E – 05	3,29
FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for alpha polypeptide	0,0012	3,28
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1	0,0002	3,23
CNTN4	Contactin 4	0,0021	3,23
IGKC	Immunoglobulin kappa constant	0,01	3,21
PLA2G7	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	0,0076	3,21
MS4A7	Membrane-spanning 4 domains, subfamily A, member 7	0,0004	3,19
RNASE6	Ribonuclease, RNase A family, k6	0,0003	3,18
IGK@///IGKC	Immunoglobulin kappa locus///immunoglobulin kappa constant	0,0184	3,18
CRISPLD1	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1	0,0009	3,17
CP	Ceruloplasmin (ferroxidase)	0,0004	3,17
CHI3L2	Chitinase 3-like 2	0,0033	3,12
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	0,0205	3,1
LYZ	Lysozyme	0,0123	3,07
BGN	Biglycan	0,0005	3,06
LYZ	Lysozyme	0,0083	2,94
MARCH1	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	0,0002	2,92
IGK@///IGKC///LOC100291464	Immunoglobulin kappa locus///immunoglobulin kappa constant///similar to hCG26659	0,0172	2,91
SAMSN1	SAM domain, SH3 domain, and nuclear localization signals 1	0,0013	2,91
ANKDD1A	Ankyrin repeat and death domain containing 1A	0,0006	2,88

knee fat depots, with the 8 *HOX* genes, *HOXA10*, *HOXA9*, *HOXC6*, *HOXC10*, *HOXA3*, *HOXC9*, *HOXA5*, and *HOXA7* being the most differentially expressed (Figure 1(c)). The whole genome transcriptomic analysis therefore revealed that chin and knee fat depots expressed a different *HOX* code. This *HOX* status in human chin and knee fats resembles the *Hox* code identified in mouse mandibular and tibial osteogenic progenitors [14]. It should be noted that the *Hox* code mismatch was responsible for aberrant tibial progenitor differentiation when transplanted into the face.

3.2. Differential Pax3 and HOX Gene Expression Was Conserved in Adipose-Stromal Cells Derived from Chin and Knee Fat Depots. As adipose tissues contain several cell types, such as adipose-stromal cells (ASCs), adipocytes, endothelial cells, and immune cells, we wondered whether chin and knee molecular signatures revealed by microarray data were

conserved in ASCs and derived adipocytes. For that purpose ASCs were isolated from the stromal vascular fraction of paired chin and knee fat samples. The skeletal muscle signature of chin fat depot was not detectable neither in undifferentiated ASCs nor in their differentiated progenies (not shown), indicating that other cell types in chin fat biopsies could be responsible for muscle gene expression. In contrast, *Pax3* and *HOX* differential expression was conserved in ASCs. *Pax3* expression was analysed by real-time PCR and its gene expression was normalized according to *TATA box binding protein (TBP)* gene expression, that is, a housekeeping gene used as reference gene. As shown in Figure 2(a), *Pax3* was expressed significantly higher in chin ASCs than in knee ASCs (6.2-fold), supporting the neuroectoderm origin of chin-ASCs.

It has been previously reported that fat from different depots displays distinct developmental gene expression profiles, including *Hox* genes [10, 22, 23], but limb and facial

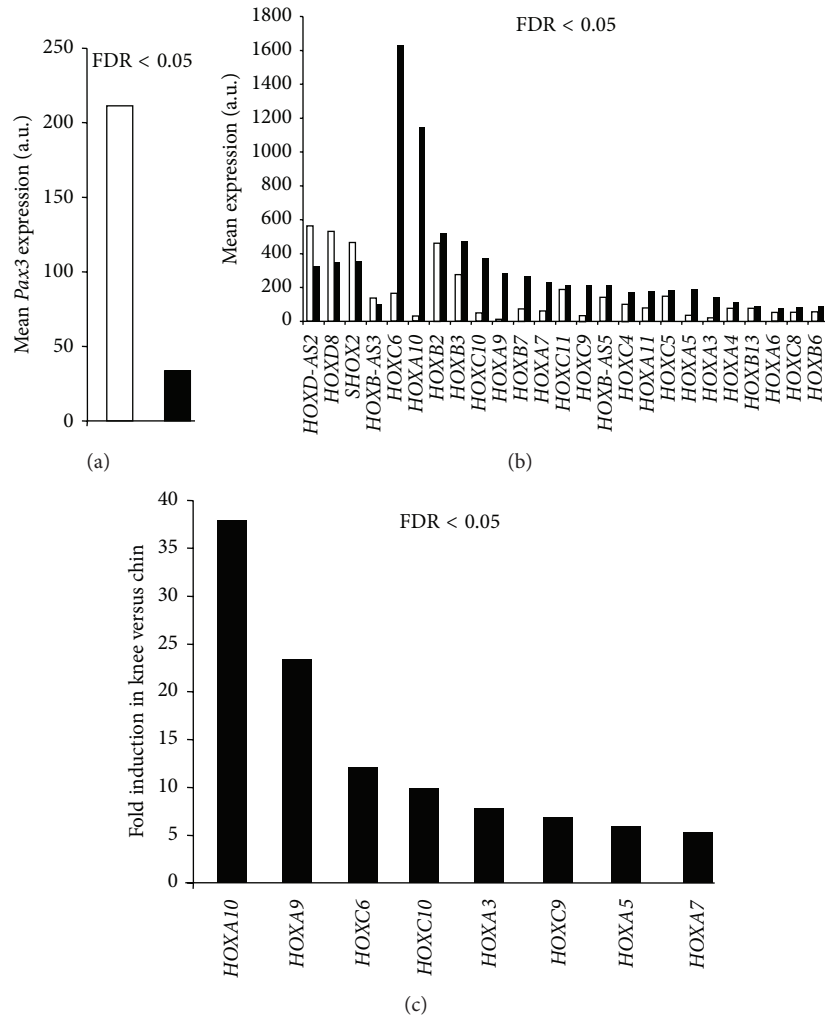


FIGURE 1: *Pax3* and *HOX* gene expression in paired chin and knee fat depots from large-scale Affymetrix transcriptomics. (a) Mean expression of *Pax3* in chin (open bar) and in knee (black bar) fat depots ($n = 11$ paired). (b) Mean expression of *HOX* genes in chin (open bars) and knee (black bars) ($n = 11$ paired). (c) *HOX* genes with the highest differential expression are presented.

fat were not included in these analyses. We performed real-time PCR to monitor the expression of 6 *HOX* genes that displayed the highest differential expression between knee and chin according to the microarray data. As shown in Figure 2(b), *HOX* genes were expressed at different levels. More importantly, *HOX* gene expression was significantly enhanced in knee ASCs compared to chin ASCs (more than 20-fold for *HOXA9* and *HOXA10* and between 5- and 10-fold for *HOXC6*, *HOXC8*, *HOXC*, and *HOXC10*). These data are in line with the *HOX* expression revealed by the Affimetrix analysis from whole fat depots (compare Figures 1(c) and 2(b)), indicating that the *HOX* code of the whole fat depot reflected the *HOX* code of ASCs. The *HOX* code thus distinguished ASCs from facial and limb depots. Overall, these results strongly suggest that chin and knee fats could have different functional features.

3.3. Properties of Chin- and Knee-ASCs and Adipocyte Progenies. ASCs and their progenies were characterized in order

to determine if there are functional differences between chin and knee fats. We hence compared ASC proliferation, fibroblastoid colony-forming units (CFU-F), and differentiation. Cells were plated at low cell density and allowed to proliferate for 7 days. As shown in Figure 3, the proliferation curve of both ASCs was similar. In contrast, a significant difference in CFU-F potential was observed after cell expansion. Indeed, at passage 2, the CFU-F frequency was identical for both ASCs (16%, which is in the same range as previously reported for other human fat depots [3]). However, after 2 more passages, the CFU-F potential decreased for knee ASCs, whereas it remained unchanged for chin ASCs (Figure 3(b)). These results indicated that both fat depots contained ASCs that could be expanded but that chin ASCs had a higher self-renewal potential, at least *ex vivo*.

Adipocytes generated from ASCs of both depots were then characterized. Adipocytes of both sites accumulated intracellular lipid droplets to a similar extent after 10 days of differentiation, as qualitatively determined by Oil red O

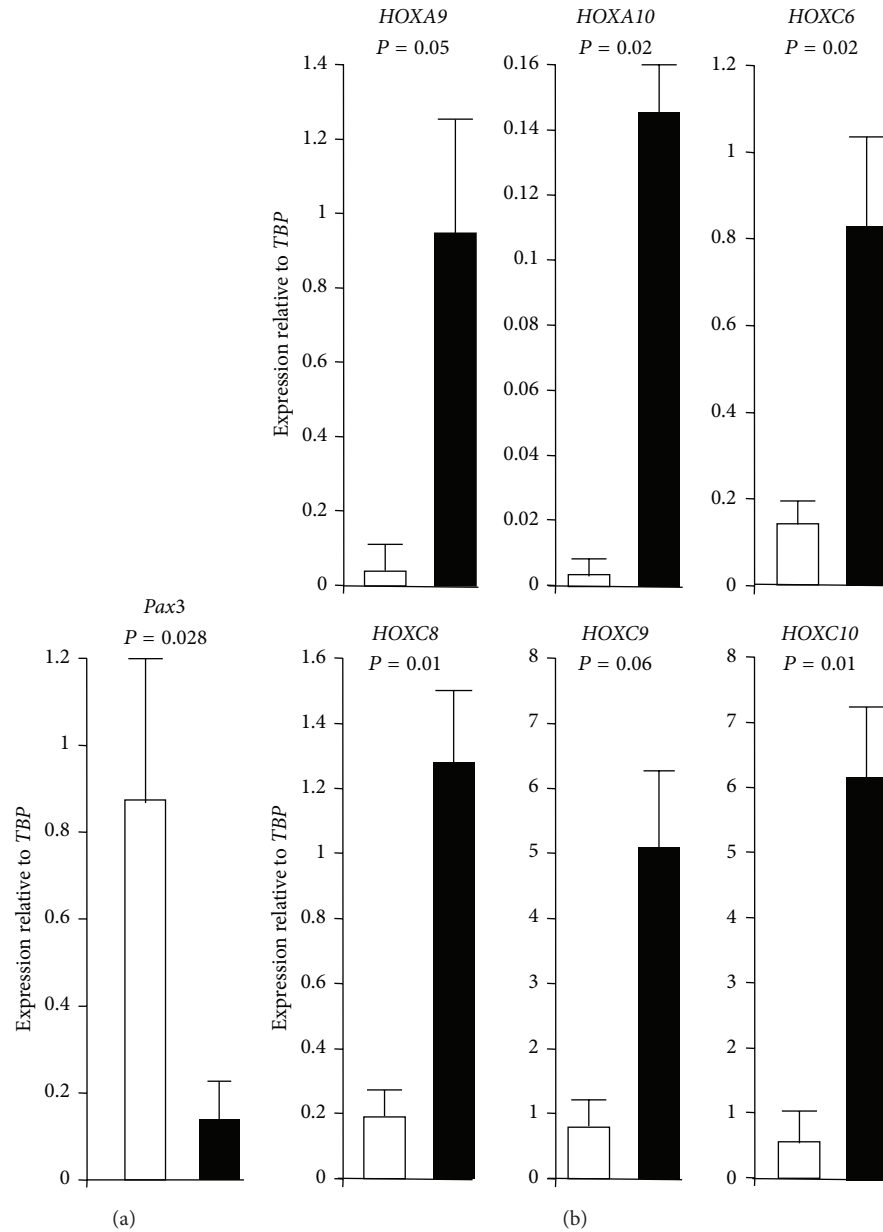


FIGURE 2: Expression of *Pax3* and *HOX* genes in adipose-stromal cells derived from chin and knee fat: ASCs were isolated from chin (open bars) and knee (black bars) paired fats and were expanded *ex vivo*. (a) *Pax3* expression was quantified by real-time PCR and normalized with *TBP* housekeeping gene. Values are means $\pm$ SEM. *P* is indicated ($n = 4$ paired depots). (b) Expression of indicated *HOX* genes was quantified by real-time PCR and normalized with *TBP* housekeeping gene. Values are means $\pm$ SEM. *P* are indicated ($n = 3$ paired depots).

staining (Figure 4(a)). Quantitative tests then revealed that adipocytes derived from chin and knee ASCs displayed a similar intracellular triglyceride concentration and lipolysis activity (Figures 4(b) and 4(c)). Expression of adipocyte-specific genes, such as *Adiponectin* (*AdipoQ*) and *FABP4*, was similar for adipocytes generated from both ASCs, supporting at the molecular level that chin- and knee-ASCs have a similar adipogenic capacity (Figure 4(d)). However, a major difference appeared regarding the adipocyte phenotype. As shown in Figure 5(a), the brown adipocyte marker

UCPI was highly enriched in chin adipocytes compared to paired knee adipocytes. *UCPI* differential expression was confirmed at the protein level (Figure 5(b)). Interestingly, *UCPI* expression increased in chin adipocytes upon PKA pathway activation via forskolin treatment (Figure 5(b)), as expected for functional brown adipocytes. Overall, our data indicated that chin host site contained brown or brown-like adipocytes, whereas the knee donor site contained white adipocytes. The presence of functional brown and brown-like adipocytes in human neck has been previously reported [24],

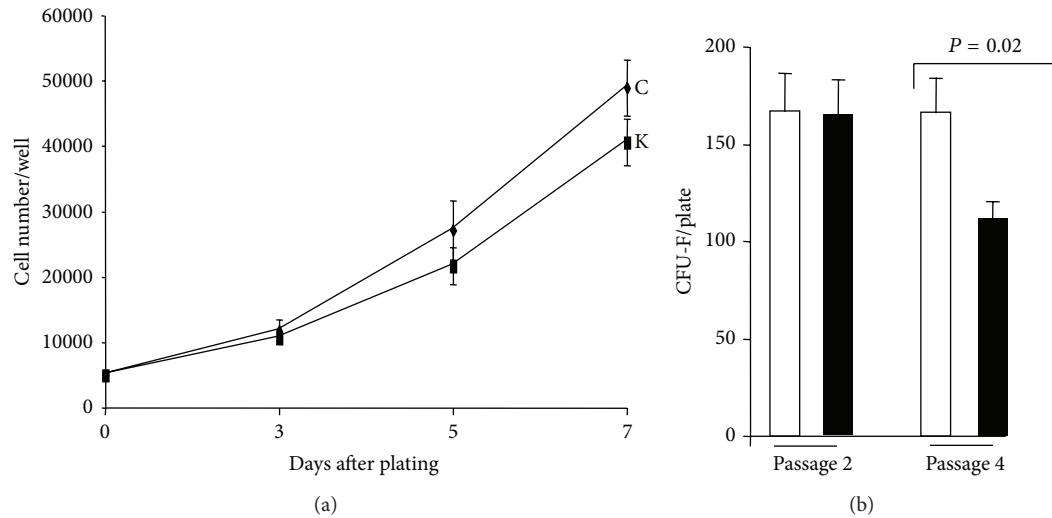


FIGURE 3: Proliferation and clonogenic potentials of chin and knee ASCs. (a) ASCs isolated from chin (C) and knee (K) were plated at 5000 cells/well in 24-well plates and cell number was quantified at the indicated times. Values are means $\pm$ SEM. ($n = 8$ paired depots). (b) Chin-ASCs (open bars) and knee-ASCs (black bars) were plated at a clonal cell density and maintained in proliferative medium. The numbers of colonies were assessed after 10 days of culture. Values are means $\pm$ SEM. P is indicated. Experiments were performed at cell passage 2 ($n = 7$ paired depots) and at passage 4 ($n = 6$ paired depots).

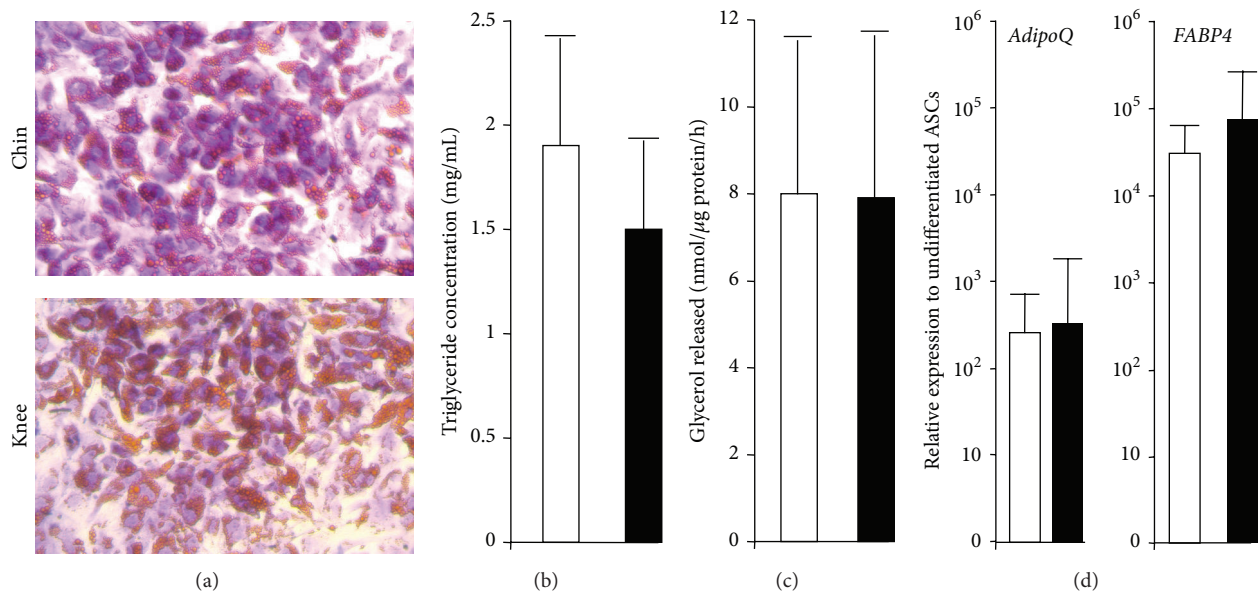


FIGURE 4: Adipocyte differentiation of chin- and knee-ASCs. ASCs were induced to undergo differentiation for 10 days. (a) Cells were stained with Oil Red O for lipid droplets. (b) Cells were harvested and analyzed for their triglyceride content. (c) Cells were stimulated with forskolin for 4 h and then glycerol release was determined. (d) RNAs were prepared and differentiation levels were assessed by the expression of the indicated genes. Expression of each gene was normalized to *TBP* and then relative to the expression in undifferentiated cells. Values are means $\pm$ SEM. P is indicated ($n = 7$ paired depots). Open bars: chin; black bars: knee.

and we have observed *UCPI* gene expression in human cheek (not shown). The human face thus contains cells having the potential to enable the dissipation of excessive caloric intake. The tissue regeneration and facial rejuvenation consequences of transplanting white adipocytes in a fat environment with different metabolic properties remain to be investigated.

4. Conclusions

Our results strongly suggest that ASCs present in knee and chin fats derived from different embryonic origins. They did not express the same *HOX* code and displayed different adipocyte phenotypes. The consequences of these differences

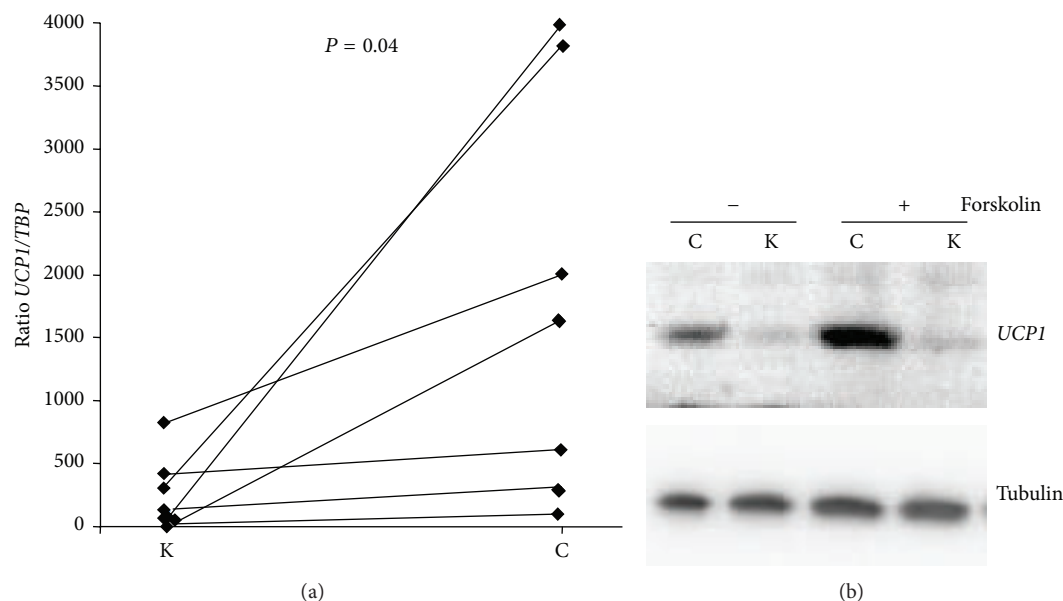


FIGURE 5: UCPI expression in adipocytes generated from chin ASCs. ASCs derived from chin (C) and knee (K) were induced to undergo differentiation for 10 days. (a) RNAs were prepared and UCPI expression was determined by real-time PCR. $n = 7$ paired depots. Corresponding data points of knee and chin paired depots are connected with lines. (b) Cells were stimulated (+) or not (–) with forskolin for 4 h and then proteins were prepared. Expression of UCPI was assessed by Western-blotting. Tubulin was used as loading control.

on autologous fat grafting outcomes remain to be investigated in detail. It should be noted that mesenchymal stem cells from different embryonic origins have been found to display different tissue regeneration capacities [25] and that *Hox* code matching was confirmed to be critical for successful tissue regeneration in mouse [14]. Our data highlighted that donor site selection might be an important factor to be considered for fat grafting. Matching *Pax3* and/or *HOX* code and/or *UCPI* expression between host and donor sites could improve postoperative outcomes.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Bérengère Chignon-Sicard and Christian Dani contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors would like to thank Sophie Déret for her expertise in BioInformatics for Affymetrix data analysis and the “stem cells and differentiation” team for helpful discussions. This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE: Program reference no. ANR-11-LABX-0028-01 and the National Research Agency against HIV (ANRS, Grant AO 2013-1 CSS3).

References

- [1] S. R. Coleman, “Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations,” *Aesthetic Plastic Surgery*, vol. 19, no. 5, pp. 421–425, 1995.
- [2] S.-F. T. Kølbe, A. Fischer-Nielsen, A. B. Mathiasen et al., “Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial,” *The Lancet*, vol. 382, no. 9898, pp. 1113–1120, 2013.
- [3] P. Bourin, B. A. Bunnell, L. Casteilla et al., “Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT),” *Cytotherapy*, vol. 15, no. 6, pp. 641–648, 2013.
- [4] K. Yoshimura, K. Sato, N. Aoi et al., “Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells,” *Dermatologic Surgery*, vol. 34, no. 9, pp. 1178–1185, 2008.
- [5] J. M. Fredriksson, H. Thonberg, K. B. E. Ohlson, K.-I. Ohba, B. Cannon, and J. Nedergaard, “Analysis of inhibition by H89 of UCPI gene expression and thermogenesis indicates protein kinase A mediation of β 3-adrenergic signalling rather than β 3-adrenoceptor antagonism by H89,” *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1538, no. 2-3, pp. 206–217, 2001.
- [6] S. Enerbäck, “Human brown adipose tissue,” *Cell Metabolism*, vol. 11, no. 4, pp. 248–252, 2010.
- [7] T. Tchkonina, N. Giorgadze, T. Pirtskhalava et al., “Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned

- human preadipocytes," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 282, no. 5, pp. R1286–R1296, 2002.
- [8] T. Tchkonina, Y. D. Tchoukalova, N. Giorgadze et al., "Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 288, no. 1, pp. E267–E277, 2005.
 - [9] N. Billon and C. Dani, "Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 55–66, 2012.
 - [10] S. Gesta, M. Blüher, Y. Yamamoto et al., "Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 17, pp. 6676–6681, 2006.
 - [11] N. Billon, P. Iannarelli, M. C. Monteiro et al., "The generation of adipocytes by the neural crest," *Development*, vol. 134, no. 12, pp. 2283–2292, 2007.
 - [12] R. Krumlauf, "Hox genes in vertebrate development," *Cell*, vol. 78, no. 2, pp. 191–201, 1994.
 - [13] K. C. Wang, J. A. Helms, and H. Y. Chang, "Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression," *Trends in Cell Biology*, vol. 19, no. 6, pp. 268–275, 2009.
 - [14] P. Leucht, J.-B. Kim, R. Amasha, A. W. James, S. Girod, and J. A. Helms, "Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration," *Development*, vol. 135, no. 17, pp. 2845–2854, 2008.
 - [15] S. Creuzet, G. Couly, C. Vincent, and N. M. le Douarin, "Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton," *Development*, vol. 129, no. 18, pp. 4301–4313, 2002.
 - [16] P. White, D. W. Thomas, S. Fong et al., "Deletion of the homeobox gene PRX-2 affects fetal but not adult fibroblast wound healing responses," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 120, no. 1, pp. 135–144, 2003.
 - [17] B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Åstrand, and T. P. Speed, "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 2, pp. 185–193, 2003.
 - [18] A.-M. Rodriguez, D. Pisani, C. A. Dechesne et al., "Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 9, pp. 1397–1405, 2005.
 - [19] B. Wdziekonski, T. Mohsen-Kanson, P. Villageois, and C. Dani, "The generation and the manipulation of human multipotent adipose-derived stem cells," *Methods in Molecular Biology*, vol. 702, pp. 419–427, 2011.
 - [20] Y. Benjamini and Y. Hochberg, "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing," *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Methodological*, vol. 57, no. 1, pp. 289–300, 1995.
 - [21] E. Betters, Y. Liu, A. Kjaeldgaard, E. Sundström, and M. I. García-Castro, "Analysis of early human neural crest development," *Developmental Biology*, vol. 344, no. 2, pp. 578–592, 2010.
 - [22] T. Tchkonina, M. Lenburg, T. Thomou et al., "Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 292, no. 1, pp. E298–E307, 2007.
 - [23] M. Cantile, A. Procino, M. D'Armiento, L. Cindolo, and C. Cillo, "HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 194, no. 2, pp. 225–236, 2003.
 - [24] A. M. Cypess, A. P. White, C. Vernochet et al., "Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 5, pp. 635–639, 2013.
 - [25] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 9, pp. 726–736, 2008.

Autologous Fat Grafts: Can We Match the Donor Fat Site and the Host Environment for Better Postoperative Outcomes and Safety?

Christian Dani¹ · Rémi Foissac^{1,2} · Annie Ladoux¹ · Bérengère Chignon-Sicard^{1,3}

© Springer Science + Business Media New York 2017

Abstract

Purpose of Review Autologous fat grafting is the gold standard for soft tissue repair. The donor fat depot is chosen where a surplus of subcutaneous fat is found. However, the adipose tissues from different parts of the body are not equivalent. Despite the heterogeneity in fat depots, it is still considered that any adipose tissue site is a suitable fat depot donor for transplantation.

Recent Findings Matching embryonic origins and *Hox* code between transplanted stem cells and the host microenvironment emerges as a critical parameter to achieve correct repair in different preclinical models. It has also recently been reported that the individual fat depots routinely used in reconstructive surgery exhibit distinct embryonic origins and express different *HOX* code. An opposite gradient from the upper to the lower body exists between expressions of *HOXC10* and the neural crest marker *PAX3*. This observation raises the question of the choice for the best fat donor site.

Summary Matching between the host tissue and the donor fat sites is a factor that urgently deserves consideration to improve postoperative outcomes and safety of autologous fat grafting.

Keywords Fat grafting · Tissue regeneration · Fat depots · Adipose stem cells · Breast reconstruction

Introduction

The use of autologous fat grafting in reconstructive and plastic surgery has been a validated technique for several years. Reconstruction with autologous fat is mainly applied after tumor removal, for breast reconstruction surgery after mastectomy, to repair extensive facial deformities caused by injury, illness, or congenital abnormalities. The treatment's main advantages are that autologous fat is easy to obtain with minimum morbidity for patients. The donor site is chosen where a surplus of subcutaneous fat is found, such as in hips, abdomen, thigh, and the inner sides of the knees. However, the recent scientific literature shows that the individual fat depots are not equivalent. This brings up the question of choosing the most appropriate donor fat site for heterotopic transplantation depending on the grafting recipient site. With some variations, the technique consists in three stages: fat harvesting from donor sites, processing of the aspirate, and reimplantation at the host site [1]. A number of studies have focused on improving the integration of grafted adipose tissue through the investigations of different mechanisms of fat harvesting and processing or the attempts to supplement grafts with other cells or growth factors. Enriching fat grafts with the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue or with platelet-rich plasma dramatically enhances fat graft survival ([2] and see for recent reviews [3•, 4]). However, there are still controversies and unresolved questions regarding autologous fat grafting due to the unpredictability of postoperative outcomes. The main disadvantages of this technique are variable engraftment and resorption rates, microcalcification, and cyst formations due to fat necrosis.

This article is part of the Topical collection on *Plastic Surgery*.

✉ Christian Dani
dani@unice.fr

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Faculté de Médecine, Nice Cedex 2 06107, France

² Plastic and Aesthetic Surgery Centre, Saint-Georges Clinic, Nice, France

³ Plastic, Reconstructive and Hand Surgery Department, Hôpital Pasteur 2, Nice, France

The differentiation of SVF toward an unwanted cell type after grafting cannot be ruled out. Indeed, clinical results are inconstant, without any clue about the reasons underlying the reconstruction success or failure. Integration of fat graft, its survival, and long-term maintenance are multifactorial. The choice of the donor site is an element to be considered. Autologous fat graft causes the displacement of both mature adipocytes and adipose stem cells form a donor site to a distinct host microenvironment. Indeed, the adipose tissues from different parts of the body are not equivalent. Thus, a better knowledge of the adipose tissue depots used as donor sites and of their interactions with the host environment could be translated towards the clinic.

The question of the most appropriate fat depot as donor site for autologous transplantation emerged recently in the literature. The present review discusses the recent findings that uncovered the importance of a match between the host tissue and the donor fat sites to improve postoperative outcomes and safety of autologous fat grafting.

Adipose Tissues Have Different Properties According to Their Anatomic Locations

Adipose tissues are heterogeneous tissues composed of adipocytes and of a SVF containing different cell types, including the adipose stem cells (Fig. 1). The adipose tissue is now recognized as an endocrine tissue as both adipocytes and SVF secrete numerous cytokines (named adipokines) displaying a variety of biological effects [5]. Importantly, individual fat depots exhibit unique profiles of adipokine and interleukin secretion, including pro-inflammatory cytokines. For instance, a large-scale transcriptomic analysis revealed that *HOX* genes (see below) and inflammatory-related genes are among the genes the most differentially expressed between fat localized in the face and the inner side of knees

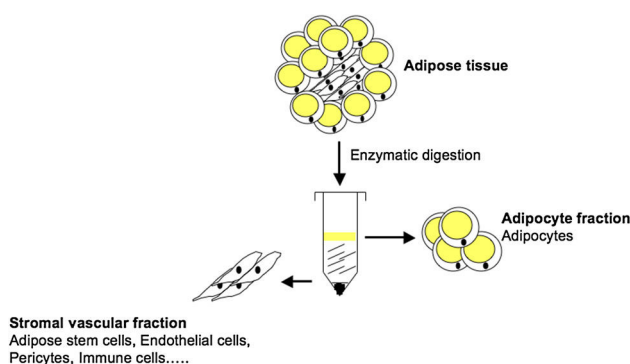


Fig. 1 The adipose tissue is composed of different cell types. Digestion of adipose tissue with collagenase then centrifugation at a low speed separate the tissue in two fractions: the adipocyte fraction containing only adipocytes, and a stromal vascular fraction containing adipose stem cells and different other cell types

[6]. In addition to these differences in the composition of the SVF, two types of adipocytes, i.e., brown and white, having opposite functions coexist in mammals (Fig. 2). White adipose tissue (WAT) is dispersed throughout the body and is mainly involved in energy storage. The two largest depots of white adipose tissues in human are the subcutaneous and the visceral WAT. Visceral and subcutaneous stem cells display distinct intrinsic abilities to proliferate and to undergo differentiation into mature adipocytes [7]. In addition, individual subcutaneous white adipose tissues are not equivalent, in terms of adipose stem cell abundance, proliferation, and differentiation [8]. In contrast to WAT, brown adipose tissue (BAT) is specialized in energy expenditure. Activated BAT consumes metabolic substrate and burns fat to produce heat via the uncoupling protein (UCP)-1 [9]. Brown fat is present in newborns and then disappears from most of the sites but persists in adults in deep organs, i.e., around the kidneys [10] and in the upper part of the body, the neck [11], and face [6]. A third type of adipocytes mainly recruited in subcutaneous WAT has been identified as brite/beige and correspond to brown-like adipocytes [12–14]. Therefore, the reported heterogeneity in fat depots indicates that the donor adipose tissue sites are not equivalent and suggests that it needs to be chosen according to the site of transplantation.

Importance to Match the *Hox* Code and the Embryonic Origin Between Transplanted Cells and the Host Environment for Tissue Regeneration in Animal Models

Some publications report that adipocyte viability within different sites is similar suggesting that there is no evidence for a favorable donor site [15, 16]. It has also been reported that some sites may be more suitable than others, based on

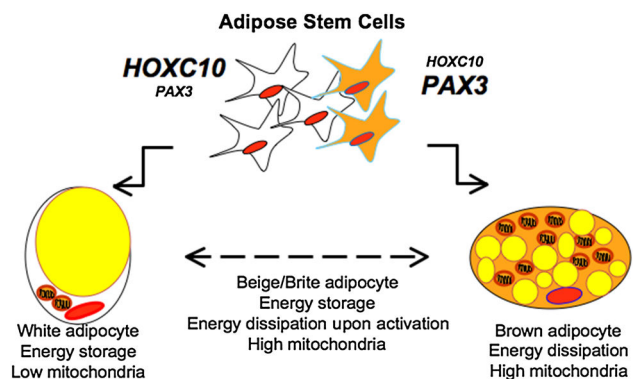


Fig. 2 Different types of adipocytes in Humans. Adipose stem cells generating *white* or *brown* adipocytes have different molecular signature, including different level of *PAX3* and *HOXC10* gene expression. *White* and *brown* adipocytes have different characteristics and functions as indicated. Beige/brite adipocytes are *brown*-like adipocytes dispersed in *white* adipose tissues

the observation that viability of adipocytes is age dependent [17], or based on the amount of adipose stem cells present in distinct sites [18]. However, the fate of adipose stem cells after transplantation has not been taken into account in these studies. Recent observations indicate that the match between the donor site and the host environment is crucial for the behavior of transplanted stem cells. Factors governing the fate of adipose stem cells after transplantation in a heterotopic site remain to be fully identified. The Hox code and the embryonic origin appear to be among them.

Homeobox (*Hox*) genes encode transcription factors determining the positional identity along the anterior–posterior body axis of animal embryos. Recent studies revealed that they also display prominent roles in adult cells. Thirty-eight *HOX* genes were detected in human fat localized in the inner side of knees. Importantly, the *Hox* code, i.e., the *Hox* gene expression profile, was shown to play a critical role in stem cell positional identity. This positional identity is retained after transplantation, and a *Hox* code mismatch between the host environment and grafted stem cells can prevent cells from participating in tissue regeneration. In another study, the authors demonstrated that matching the embryonic origin also plays an unsuspected role in the regeneration processes. They observed that transplantation of tibia-derived *Hox*-positive stem cells originated from mesoderm into the *Hox*-negative environment of the mandible with neural crest origin led to aberrant bone regeneration. In contrast, transplantation of *Hox*-negative neural crest stem cells into a *Hox*-positive mesodermic environment led to a correct repair of the defect [19]. The influence of the *Hox* code has also been highlighted in wound healing [20, 21]. Altogether, these studies demonstrate the plasticity of *Hox*-negative stem cells and their potential to adapt when transplanted in a *Hox*-positive environment. More importantly, the study illustrates that matching the positional identity and the embryonic origins of transplanted cells with that of the host microenvironment appears as a critical parameter to achieve regeneration [22].

Individual Fat Depots Commonly Used in Reconstructive Surgery Exhibit Distinct Embryonic Origins and They Express Specific *HOX* Code

Recent studies revealed that human adipose stem cells display distinct molecular signatures, including the *HOX* code, according to their anatomic location. In addition, lineage tracing approaches in rodents revealed that fat depots have different embryonic origins [23•]. Indeed, in contrast with the previous belief that all adipocytes derive

only from mesoderm, adipocytes localized in the face display a neuroectodermal origin whereas adipocytes localized in the other parts of the body originate from mesoderm [24]. As lineage tracing approaches are not feasible in Humans for an obvious reason, molecular studies have been investigated to determine the embryonic origin of human facial and limb fat depots. These studies showed that facial adipose stem cells are *HOX*-negative and of neural crest origin, whereas limb adipose stem cells are *HOX*-positive and likely of mesodermal origin [6•]. Differential properties and *HOX* code between facial and abdominal adipocytes have also been reported [25], in agreement with the conclusions of the lineage tracing studies performed in mice. According to the animal studies showing aberrant repair when tibia stem cells are transplanted in mandible as discussed above, the fate of adipose stem cells localized in inner side of the knee when transplanted in the face may have potential issue that needs to be analyzed. The molecular profile of several fat depots has been reported more recently [26•]. The results, schematized in Fig. 3, showed a gradient of expression of *HOXC10* from the upper to the lower body. An opposite gradient was revealed for expression of *PAX3*, a marker of adipose stem cells of neural crest origin. In addition to the mismatch of the embryonic origin and to the differences of the *HOX* code between these two fat depots, adipose stem cells generate adipocytes presenting a different functional phenotype. In fact, knee and the face fat depots display a white and a brown-like phenotype, respectively [6•]. The consequences of transplanting donor cells raising adipocytes with an opposite metabolic phenotype on the outcome of fat grafting remain to be investigated.

Altogether, these studies highlight that the different fat depots used in clinical practice for plastic and reconstructive surgery have different *HOX* code and embryonic origins. The work further gives a reflection on the request to choose the most appropriate donor site for fat grafting, according to the host environment.

Matching Donor Sites and Mammary Environment for a Better Safety of Post-Mastectomy Breast Reconstruction Surgery

Obesity represents a risk factor for cancer incidence, as it plays a pivotal role providing a permissive tumor microenvironment to initiate and propagate tumor growth. Over-expansion of white adipose tissue increases the risk of developing malignancies through secretion of cytokines by adipose stem cells and adipocytes [27]. Although many recent articles based on clinical series have argued for the safety of autologous fat grafting [28, 29], others based on systematic reviews present more moderate assessments,

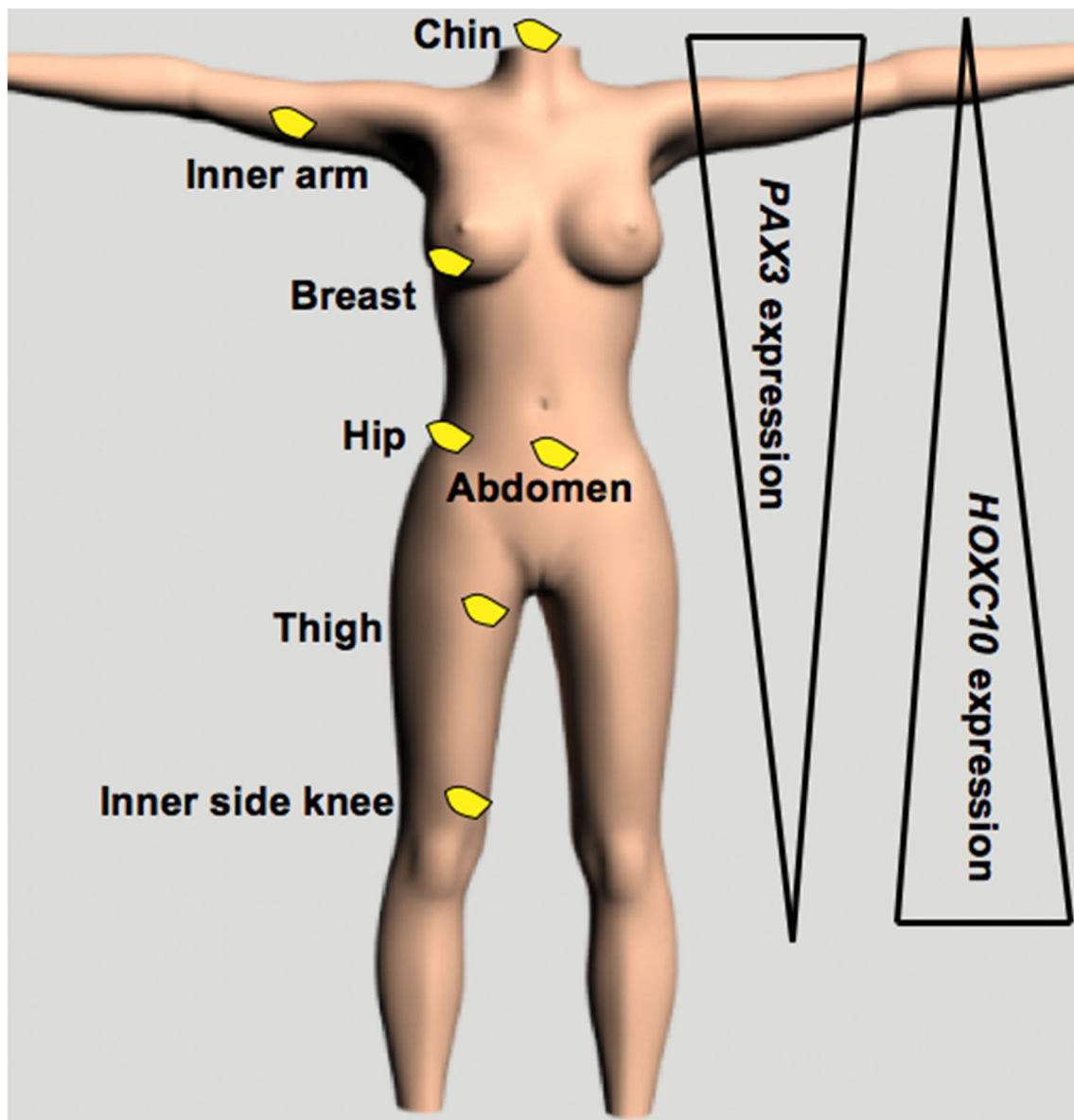


Fig. 3 The fat depots used in reconstructive surgery exhibit different feature. Fat tissue indicated on the scheme has been analyzed for the expression of *PAX3*, a marker on neural crest embryonic origin, and

of *HOXC10*. The data revealed an inverse gradient of expression for the two genes

concluding that oncological safety remains unclear and that long-term results and further studies are necessary [30]. An excess of adipose tissue represents a poor prognosis factor for women with a high-grade breast cancer, and adipocytes have been shown to promote both breast cancer cell proliferation and metastatic potential in several murine models [31, 32]. Safety of autologous fat grafting in breast reconstruction surgery after mastectomy remains to be adequately addressed. Traditional breast cancer treatment begins with surgery leading to the excision of the tumor. Then, a radiotherapy and/or chemotherapy are undertaken to remove cancer cells, and finally, autologous fat grafting allows breast reconstruction. There is no clinical evidence

of an oncologic risk associated with fat graft for either patients who were previously treated for malignant breast tissue or for subjects embarked on plastic surgery with healthy breast tissue. However, the scientific and the clinical literature present a debate regarding the oncologic risk of the procedure [33, 34•]. It has been shown that a bidirectional cross-talk takes place between mammary adipocytes and cancer breast cells where cancer cells convert white adipocytes into brown adipocytes and induced the release of stored fatty acids, which in turn “feed” cancer cells [35•]. Numerous preclinical studies in animal models indicate that the grafted adipose tissue can stimulate breast cancer cells and promote their metastatic potential [32, 36].

Retrospective clinical data do not eliminate this possibility [34••].

Adipose tissues from different body sites that are used for breast repair may not be equivalent in term of oncogenic risks and selection of the donor site represents a critical factor that deserves to be considered. The work of Foissac and colleagues [26••] proposed a classification of the best molecular match between different donor sites and breast environment. It is now known that cells adjacent to a tumor are not only passive structural elements but are also active actors in tumor progression [35••]. The differential expression of *HOXC10* shown between mammary fat and other fat depots is of particular interest [26••]. *HOXC10* expression is low in breast but higher in other fat depots often used for breast reconstruction, such as in knee and abdomen. Others have shown that *HOXC10* is not only overexpressed in mammary cancer but is involved in the progression of breast cancer [37]. Therefore, two major questions require to be further addressed: what is the impact of transplanting fat depot expressing *HOXC10* in the *HOXC10*-negative mammary environment? Can the molecular mismatch in *HOXC10* aggravate the oncologic risk? The impact of transplantation of fat depots from different localizations on cancer cells deserves further evaluation.

Conclusions

The question regarding the best donor site for grafting into heterotopic sites is a relevant question that merits to be scientifically and clinically investigated. The mechanisms underlying the integration rate of a fat graft are multifactorial. The overview of the most relevant and recent literature indicates that matching the embryonic origin and the *HOX* code between the host and donor sites is a factor to be considered to improve the postoperative outcomes and safety of autologous fat grafting. The impact of mismatch between the fat donor sites and the host environment deserves further evaluation. Development of cellular co-culture models and of preclinical models is required to analyze the interaction between different fat donor sites and the host environment to optimize the clinic practices.

Funding The authors of this review are supported by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer 2016.

Compliance with Ethics Guidelines

Conflict of Interest The authors declare no conflicts of interest relevant to this manuscript.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, publishes recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg*. 1995;19(5):421–5.
2. Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9898):1113–20.
3. • Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM et al. Concise review: Fat and furious: Harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1096–108. *The authors performed a review of the scientific and medical literatures on the regulatory issues, the current applications and the mechanisms of action of the SVF. They show the importance of paracrine effects of SVF and of the crosstalk between the SVF components and the host environment.*
4. Liao HT, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;20(4):267–76.
5. Ailhaud G. Adipose tissue as an endocrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(Suppl 2):S1–3.
6. • Koudhi M, Villageois P, Mounier CM, Menigot C, Rival Y, Piwnica D et al. Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015:592090. *The authors analysed the global gene expression profile of paired adipose tissues of the inner side of knees and the face. These fat depots are usually fat donor site and host fat site, respectively. Data revealed that PAX3, a marker of embryonic origin, and the HOX genes were among the most differentially expressed between the two sites. The consequences of the mismatch between the sites remain to be functionally investigated.*
7. Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(1):E267–77.
8. Tchkonina T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E298–307.
9. Enerback S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*. 2010;11(4):248–52.
10. Svensson PA, Lindberg K, Hoffmann JM, Taube M, Pereira MJ, Mohsen-Kanson T, et al. Characterization of brown adipose tissue in the human perirenal depot. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(8):1830–7.
11. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med*. 2013;19(5):635–9.
12. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–76.
13. Pfeifer A, Hoffmann LS. Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:207–27.

14. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7153–64.
15. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(1):391–5 **discussion 6-7**.
16. Ullmann Y, Shoshani O, Fodor A, Ramon Y, Carmi N, Eldor L, et al. Searching for the favorable donor site for fat injection: in vivo study using the nude mice model. *Dermatol Surg*. 2005;31(10):1304–7.
17. Geissler PJ, Davis K, Roostaiean J, Unger J, Huang J, Rohrich RJ. Improving fat transfer viability: the role of aging, body mass index, and harvest site. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(2):227–32.
18. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grechi B, et al. Sources of processed lipoaspirate cells: Influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(2):614–8.
19. Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*. 2008;135(17):2845–54.
20. Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development*. 2002;129(18):4301–13.
21. White P, Thomas DW, Fong S, Stelnicki E, Meijlink F, Largman C, et al. Deletion of the homeobox gene PRX-2 affects fetal but not adult fibroblast wound healing responses. *J Invest Dermatol*. 2003;120(1):135–44.
22. Wang KC, Helms JA, Chang HY. Regeneration, repair and remembering identity: The three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol*. 2009;19(6):268–75.
23. •• Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol*. 2016;26(5):313–26. *The authors performed a comprehensive review of the literature on the emerging picture showing the multiple embryonic origins of the fat depots in mice.*
24. Billon N, Dani C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev*. 2012;8(1):55–66.
25. Chon SH, Pappas A. Differentiation and characterization of human facial subcutaneous adipocytes. *Adipocyte*. 2015;4(1):13–21.
26. •• Foissac R, Villageois P, Chignon-Sicard B, Georgiou C, Camuzard O, Dani C. Homeotic and embryonic gene expression in breast adipose tissue and in adipose tissues used as donor sites in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2017;139(3):685e–92e. *The authors analyzed the feature of seven fat depots. They show a gradient of expression from the upper to the lower part of the body. The study highlights that the different fat depots used in reconstructive surgery have different HOX code and embryonic origin, giving the first reflection on the most appropriate donor site according to the host environment.*
27. Font-Burgada J, Sun B, Karin M. Obesity and cancer: The oil that feeds the flame. *Cell Metab*. 2016;23(1):48–62.
28. Gale KL, Rakha EA, Ball G, Tan VK, McCulley SJ, Macmillan RD. A case-controlled study of the oncologic safety of fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(5):1263–75.
29. Petit JY, Maisonneuve P, Rotmensz N, Bertolini F, Clough KB, Sarfati I, et al. Safety of lipofilling in patients with breast cancer. *Clin Plast Surg*. 2015;42(3):339viii–44viii.
30. Largo RD, Tchang LA, Mele V, Scherberich A, Harder Y, Wettstein R, et al. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014;67(4):437–48.
31. Zhao M, Sachs PC, Wang X, Dumur CI, Idowu MO, Robila V, et al. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(9):782–92.
32. Rowan BG, Gimble JM, Sheng M, Anbalagan M, Jones RK, Frazier TP, et al. Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89595.
33. Agha RA, Fowler AJ, Herlin C, Goodacre TE, Orgill DP. Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68(2):143–61.
34. •• Bertolini F, Petit JY, Kolonin MG. Stem cells from adipose tissue and breast cancer: hype, risks and hope. *Br J Cancer*. 2015;112(3):419–23. *The authors provided a short review on the potential risk using adipose tissue for breast reconstruction and breast cancer. They discussed about the current dilemma between proposing to patients breast reconstruction to improve their quality of life and the potential risk. They insist on the requirement of actions to address this issue.*
35. •• Hoy AJ, Balaban S, Saunders DN. Adipocyte-Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):381–92. *In this review, the authors report the recent observations illustrating the bidirectional cross-talk between adipocytes and breast cancer cells that support the progression of disease by enhancing the cancer cell proliferation, invasion and treatment resistance.*
36. Strong AL, Burow ME, Gimble JM, Bunnell BA. Concise review: the obesity cancer paradigm: Exploration of the interactions and crosstalk with adipose stem cells. *Stem Cells*. 2015;33(2):318–26.
37. Pathiraja TN, Nayak SR, Xi Y, Jiang S, Garee JP, Edwards DP, et al. Epigenetic reprogramming of HOXC10 in endocrine-resistant breast cancer. *Sci Transl Med*. 2014;6(229):229ra41.

Plastic and Reconstructive Surgery

Homeotic and embryonic gene expression in breast adipose tissue and in adipose tissues used as donor sites in plastic surgery

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PRS-D-15-02701
Article Type:	Original Article
Full Title:	Homeotic and embryonic gene expression in breast adipose tissue and in adipose tissues used as donor sites in plastic surgery
Corresponding Author:	Foissac Rémi, M.D. Hospital Saint Roch nice, FRANCE
Order of Authors:	Foissac Rémi, M.D. Phi Villageois Berengere Chignon-Sicard Charalambos Georgiou Olivier Camuzard Christian Dani
Abstract:	Background: Autologous fat grafting has become an essential procedure in breast reconstructive surgery. However, molecular knowledge of different adipose donor sites remains inadequate. Tissue regeneration studies have shown that it is essential to match the Hox code of transplanted cells and host tissues to achieve correct repair. Moreover, some genes, such as HOXC10, have been identified in breast as promoting cancer. Our study aims to provide a better molecular understanding of adipose tissue. Material and methods: Over the course of one year, we prospectively included 15 patients and studied seven adipose areas: chin, breast, arm, abdomen, thigh, hip and knee. The first step consisted in the surgical harvesting of adipose tissue. RNA was then extracted and converted into cDNA to study gene expression levels of ten targeted genes by real time PCR. Results: Forty-eight samples from Caucasian women with a mean age of 48 years were studied. The expression of PAX3, a marker of neuroectodermal origin, was significantly higher in the breast with a decreasing gradient from the upper to lower areas of the body. An inverse gradient was found for the expression of HOXC10 ($p<0.01$). Conclusions: Breast fat may have a specific embryologic origin. The reinjection of adipocytes from the infra-umbilical area leads to the transfer of cells highly expressing HOXC10, which is known to promote breast cancer. This study raises questions about the safety of this procedure and future studies will be required to examine molecular modifications of adipose cells transferred to a heterotopic location.
Keywords:	adipose tissue; autologous fat graft; homeotic/embryonic genes; molecular signature; donor site
Manuscript Classifications:	Autologous fat grafting and breast reconstruction; Donor site considerations with autologous reconstruction; Fat grafting; Gene therapy; Stem cell biology
Additional Information:	
Question	Response

Homeotic and embryonic gene expression in breast adipose tissue and in adipose tissues used as donor sites in plastic surgery

Original article

-^{1,2} Rémi FOISSAC, M.D
-²Phi VILLAGEOIS,
-^{1,2} Bérengère CHIGNON-SICARD, M.D
-¹Charalambos GEORGIU, M.D
-¹Olivier CAMUZARD, M.D
-²Christian DANI, Ph. D

¹Plastic and reconstructive surgery unit, University Hospital of Nice, France
² iBV, Faculty of Medicine, University of Nice-Sophia Antipolis

Each authors separately declare have no conflict of interest in relation with this article.

Funding
None declared

Ethical approved
Not required

Each authors separately declare have no subvention with any organisms

Corresponding author and for reproduction:

Rémi FOISSAC
Mail: remi.foissac@gmail.com,
Phone: +33 4.92.03.38.57,
Hospital Pasteur 2, 30-voie romaine, Nice, France.

Keywords: adipose tissue; autologous fat graft; homeotic/embryonic genes; molecular signature; donor site.

Homeotic and embryonic gene expression in breast adipose tissue and in adipose tissues used as donor sites in plastic surgery

Original article of 2983 words

ABSTRACT

Background: Autologous fat grafting has become an essential procedure in breast reconstructive surgery. However, molecular knowledge of different adipose donor sites remains inadequate. Tissue regeneration studies have shown that it is essential to match the *Hox* code of transplanted cells and host tissues to achieve correct repair. Moreover, some genes, such as *HOXC10*, have been identified in breast as promoting cancer. Our study aims to provide a better molecular understanding of adipose tissue.

Material and methods: Over the course of one year, we prospectively included 15 patients and studied seven adipose areas: chin, breast, arm, abdomen, thigh, hip and knee. The first step consisted in the surgical harvesting of adipose tissue. RNA was then extracted and converted into cDNA to study gene expression levels of ten targeted genes by real time PCR.

Results: Forty-eight samples from Caucasian women with a mean age of 48 years were studied. The expression of *PAX3*, a marker of neuroectodermal origin, was significantly higher in the breast with a decreasing gradient from the upper to lower areas of the body. An inverse gradient was found for the expression of *HOXC10* ($p<0.01$).

Conclusions: Breast fat may have a specific embryologic origin. The reinjection of adipocytes from the infra-umbilical area leads to the transfer of cells highly expressing *HOXC10*, which is known to promote breast cancer. This study raises questions about the safety of this procedure and future studies will be required to examine molecular modifications of adipose cells transferred to a heterotopic location.

Key words: adipose tissue; autologous fat graft; homeotic/embryonic genes; molecular signature; donor site.

INTRODUCTION

The use of autologous adipose tissue in plastic surgery and, especially in sequelae of breast cancer treatment, has been a validated technique now for several years. (1) Autologous fat grafting (AFG) is considered to be the ideal soft-tissue filler. It possesses a natural consistency, is easy and safe to harvest, has no hypersensitivity or foreign body reactions and is readily available. (2) A growing number of articles have focused on improving the integration of adipose tissue grafted by studying different mechanisms of harvesting and processing of the fat or trying to add other cells or growth factors to improve fat graft integration. (3-5) The number of referenced scientific publications containing key words such as "adipose tissue" or "adipose stem cells" has steadily increased since 2001 reflecting the interest it arouses in the scientific community. (6) Nonetheless, fat grafting is imperfect, as it is limited by unpredictable survival. (7) Moreover, the use of autologous fat grafts, particularly in breast volume restoration has uncovered a number of major issues due to the unpredictability of postoperative results (8) and possible associated oncogenic risks. (9)

Only a few studies have investigated human adipose tissue from a cellular perspective with the aim of developing clinical applications. (10) Indeed, autologous fat grafts cause the displacement of mature fat cells or a fat stem cells from a donor site to a host site (heterotopic transfer). The adipose tissue cell sources from different body sites that are used for autologous graft at heterotopic sites may not be equivalent. A number of unknowns exist concerning the embryologic origin of different adipose areas, the mechanisms of integration of the grafted cell and the potential associated oncogenic risks.

Homeotic genes (*HOX*) are transcription factors, which play an essential role in the positioning of cells during embryonic development, cell differentiation and, in adults, in the regulation of the mature cell. (11) Several genes are known to be specifically of embryologic origin and can be studied. Dani et al. have recently initiated the interest in the knowledge of *Hox* code (the *HOX* gene expression profile) in human adipose stem cells. It has been shown to play a critical role in mature and stem cell positional identity of fat cells. (12) More recently the homeotic gene *HOXC10* has been identified to be an important factor in the development of breast tumors by promoting cancer particularly through estrogen receptor. (13) Therefore, an improved understanding of the molecular and cellular biology of adipose tissue is necessary given conflicting results and to improve fat integration and reduce the potential risks associated with this procedure.

In this study, we have investigated the molecular profile of seven different areas of adipose tissue used in clinical practice in plastic surgery for several genes focused on the mature fat cell. Our first aim was to characterize the molecular signature of human adipose tissue for homeotic and embryonic genes. Our secondary objective was to identify which donor site had a molecular profile closest to breast tissue, which site had the most autologous harvesting and which site was the most dense in adipocytes.

MATERIAL AND METHODS

Clinical step

In this study, we were focused on the fat donor sites most frequently used in plastic and reconstructive surgery with a more pronounced interest in the most frequent host site: breast adipose tissue. The different adipose sites studied were: chin, inner arm, breast, abdomen, hip, thigh and knee. Breast adipose tissue was chosen as our reference area with a greater number of samples. For these seven adipose sites studied, the number of samples required was five. This choice of $n=5$ allowed to have a sufficient number of samples to limit individual variability and to enable statistical analysis. (14) Samples exclusively involved healthy female patients and with an excess of fat tissue on the area of interest. The non-inclusion criteria were: drug intake, active or progressive disease, age < 18 years, neoplastic history, and refusal to sign the informed consent. The exclusion criteria were: transit time or routing conditions unfulfilled samples, contamination by genomic DNA of the extracted RNA, presence of aberrant or non-significant results after analysis by quantitative PCR (incorrect dissociation curve of PCR product), and inadequacy of results between the sample and its control.

Selection of patients occurred during a dedicated initial consultation. Patients then received clear and detailed information about the objectives of the study and signed consent was indispensable for study inclusion.

Harvesting of fat tissue

The adipose tissue was collected during patient surgery. It was always adipose tissue that was to be removed during a reconstructive surgery or during a liposuction. The harvesting had no cosmetic or functional repercussions for the patient.

The harvesting of human adipose tissue was standardized for all patients. We began with an infiltration of the donor area using a solution containing the injectable serum, 7,5 mg of Naropin and 0,25 mg/ml of adrenaline. The area of harvesting was selected to be as reproducible as possible (i.e., centered on the area previously defined during preoperative drawings). Sampling was performed using 10-ml syringes, which were Luer-Lock mounted with a cannula (COLEMAN™ Aspiration Cannula, 15-cm length, 11-G width). The operator calibrated aspiration at -5 mm Hg and the harvesting was performed manually according the technique described by Coleman.

(15) To avoid bias relevant to harvesting, one operator performed all study harvests paying particular attention to having complete reproducibility of each site area. For the breast, half of the sample was obtained from the infero-external area and the other half from the infero-internal area; for the thigh from the internal-half of the anterior part; for the abdomen from the medial and infra-umbilical part 5 cm above the umbilicus; from the upper arm at the internal-half of the arm; and from the hip directly above the line of the iliac crest. Once the autologous fat was collected, each syringe was centrifuged at $12,000 \times g$ for 3 minutes and the lower liquid phase and the oily upper phase were withdrawn to keep in each syringe 5 ml of adipose tissue once purified. Two syringes per patient were harvested: one syringe was used for the study of mature fat cells and the other as a control sample to allow inclusion of the sample in the study. The samples were then immediately transferred to the laboratory to be analyzed.

Molecular study

Fat tissues were lysed by the addition of Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and RNAs were purified on RNeasy Plus Universal columns (Qiagen, France), according to the manufacturer's instructions.

Concentrations of total RNA samples were first evaluated using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus system (Applied Biosystems, Life Technologies France). Transcript expression levels were evaluated by real time PCR using the comparative CT method (2-deltaCT). Delta Ct values were used when "expression relative to *TBP*" is indicated. *TBP* was used for sample normalization.

Ten genes were targeted and studied based on a work that was previously screened genes of interest for study of fat cell. (12) Genes under study were as follows: the homeobox genes *HOXC10*, *HOXC9*, *HOXC8*, *HOXC6*, *HOXA9* and *HOXA10*; the *aP2* gene also known as fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), which reflects density of adipocytes; the *PAX3* an embryonic gene, which is a marker of neuroectodermal origin; and *UCP1*, a specific marker of brown fat cells.

Analysis

InStat3 software and a Mann–Whitney test were used for statistical analysis of real-time PCR data. The results were expressed graphically using the Microsoft Excel software - 2013® indicating their upper error bar after calculating the mean standard error and specifying for each sample the number of patients. Each adipose site was individually compared with our referent adipose site (breast). *P* values are indicated on each figure on the top of the bar: one star represents a significant result with *p*

value <0.05 and two stars represent a p value <0.01 .

RESULTS

This study was conducted prospectively between the University Hospital of Nice and the department of Stem Cells and Differentiation at the Institute of Biology Valrose over fourteen months. Fat deposits were collected from 15 Caucasian women (age 48 ± 13 years, BMI 26.4 ± 2.2 kg/m²) who underwent elective autologous fat harvesting procedures, after obtaining their informed consent. Four samples were excluded from our study due to contamination with genomic DNA in RNA preparations revealed when checking by gel (tape smear); two samples for the presence of non-compliance in quantitative PCR (abnormal dissociation curves of PCR product); two samples with inadequate results compared to the control. Finally, 40 samples were analyzed (*Table 1*).

Study of PAX3 gene (Figure 1)

There was a marked expression of this gene in breast fat and chin fat, as previously reported (12). We found a decreasing gradient of expression from the upper part to the lower part of the body with the lowest expression in the area of the thigh and knee. Furthermore, this expression in the breast was significantly greater than on adipose tissue of the hips or thighs.

Study of HOXC10 gene (Figure 2)

The thigh, hip, and generally all of the infra-umbilical fat areas strongly expressed *HOXC10*. There was an inversed gradient of expression compared with the expression of *PAX3* with a decreasing gradient of the lower body to the upper part. *HOXC10* expression was significantly higher in the thigh, hip, abdomen and knee compared to the breast tissue.

Study of aP2 gene (Figure 3)

The thigh expressed significantly greater levels of *aP2*, which strongly suggests that the quantity of fat cell is the most important for the thigh region.

Study of the other genes

The study found *UCP1* expression marked in chin fat as well as in the breast and in the thigh region. There was a tendency for the expression of this gene to be in the upper part of the body.

An analysis of *HOXA10*, *HOXA9*, *HOXC9*, *HOXC8*, and *HOXC6* did not show any significant differences in expression.

DISCUSSION

The overall results of our study are summarized in *Figure 4*.

The homeobox gene *HOXC10* is highly expressed in regions of the hip, thigh and knee. There is a gradient of expression that increases as one approaches the lower body fat. In contrast, and very significantly, the expression of this gene is very low in the breast and more generally on the upper part of the trunk. Therefore, AFG in the mammary adipose tissue host site from the abdomen, hip, thigh or knee will cause a *Hox* code mismatch for this gene. Homeotic genes play a key role in positional identity along the anterior-posterior body axis in the embryology and have a major role in mature cells. (11) An important role in the healing process has recently been demonstrated. (16,17) Some *Hox* genes are specifically expressed with roles in fetal skin development and cutaneous regeneration. Studies in animal models have shown that inadequate embryonic origin and the *Hox* code may prevent the transplanted cells participate in the tissue regeneration. The importance of homeobox genes in progenitors was previously raised by Leutch and al. (18), who showed that the *Hox* code mismatch was responsible for aberrant tibial progenitor differentiation when transplanted into the mandible (chondroblast transformations). The AFG technique transfers mature and adipose stem cells into a heterotopic site. We hypothesize that fat integration may need a match for specified genes to improve the procedure rate of success. Matching *Pax3*, and/or *HOX* code between host and donor sites could improve postoperative outcomes.

Another important issue was the study of the oncological risks of this procedure. If many studies have discussed the absence of high-risk of AFG, others have indicated potential risks of this procedure with particular concern using animal models. (19,20)

The choice of studying *HOXC10* was determining. *HOXC10* gene has recently been the subject of particular interest due to the discovery that it plays a role in several types of cancer (hematopoietic, squamous cell carcinoma of the face and neck, etc.) and has key role in cancer progression. (21,22) Its involvement in hormone-dependent breast cancer has been proven with an overexpression of *HOXC10* transcription factor controlled by estrogen. (21,13) This overexpression in mammary cancer raises an important issue: when we harvest fat cell from a donor site such as the hip or thigh, and then inject this tissue into the breast, we may graft cells strongly expressing *HOXC10* inducing factors that may promote oncogenes. In other words, as we now know that this gene is highly expressed in breast cancer pathology, can molecular mismatches of *HOXC10* cause a greater oncogenic risk? There now exists cumulative evidence that cells immediately adjacent to a tumor are not only passive structural elements but also active actors in tumor progression (23-25) Among the many different cell types surrounding breast cancer cells, the most abundant are those that compose mammary adipose tissue, mainly mature adipocytes and progenitors. (26) Many articles have shown that both progenitors and mature adipocytes are not passive towards breast cancer cells and have a role in tumor progression and affect the early stages of carcinogenesis and the response to treatment of established tumors (27-31). Clinically, there is no actually evidence of oncologic risk associated with fat grafting both for patients with previous treated malignant breast that for patient with healthy breast tissue. There is a debate in the scientific literature about the oncological risk. Although many recent articles based on clinical series have argued for the complete safety of the technique (32,33), others, based on systematic reviews, are more moderate in their assessments, concluding that oncological safety remains unclear with the necessity of long-term results and further studies. (34,35)

We found a marked and significant expression of *PAX3* in the adipose tissue of the breast. This gene appears to have specificity for the upper body with a gradient of expression that increases as we approach the chin fat. This expression is very significant in comparison to the classic adipose donor sites (sub-umbilical regions). It has been demonstrated that expression of *PAX3* is associated with the development of the neural crest in humans and that this expression is maintained in the progenitors. *PAX3* is a specific marker of adult tissues of neuroectodermal origin. (36,37) Our findings on the expression of this gene support recent publications that have shown different embryonic origins of adipose tissue in rodents. (38,39) The embryonic origin of the adipose tissue is not only mesodermal as has long been suggested. The breast fat may thus have a neuroectodermal origin and therefore a different embryonic origin of the majority of fat donor sites. *PAX3* is particularly interesting because it represents a specific marker of adipose tissue of the trunk area and more specifically breast adipose tissue.

The best donor site for grafting to a heterotopic site remains unclear. One of the challenges of lipostructure is to manage to have a maximum rate of integration of injected tissue with stable results over time. The mechanisms underlying the integration rate of a fat graft are multifactorial: the choice of the donor site, harvesting technique, the preparation of the fat reinjection technique, postoperative care, etc. Donor site selection may be a critical factor to be considered. Currently, this choice is purely clinical and does not integrate molecular characteristics of the various donor sites. The thigh by its significant expression of *aP2* appears to be a particularly noteworthy area for harvesting in clinical practice. The high density of fat cells in this tissue; its ability to take on the inner, anterior or external face; and the constant presence of this adipose tissue even in thin patients make it an attractive site for

clinical practice. However, it has not yet been demonstrated that the density of fat cells in the donor site results in improved fat grafting. Finally, the adipose donor site of the inner arm has the better embryogenic and homeotic matching with the adipose tissue of the breast. This area, little used in clinical practice, may be a prime site for breast volumetry that should be explored in future clinical studies.

Our study is the first to study, from a molecular biology perspective, the various host and donor areas of human adipose tissue conventionally used in reconstructive surgery. The reproducibility of our harvesting method, and the conservation and rigorous time of delivery resulted in high-quality study samples. Our population comprised only women. We do not know if there is a reproducibility of our findings in male patient populations. We were led to the choice of an exclusively female population as it now represents the majority of patients receiving autologous fat reinjection and was more accessible for population studies. The age of our patients was relatively homogenous and corresponded to the population age of those undergoing breast reconstructive surgery. (40) Our number of samples was sufficient but could have been greater. Host breast adipose tissue had the benefit of a greater number of samples than the others because it was our tissue of reference. Other genes could have been studied. We decided to study ten genes because the study of even one gene is a long process and requires significant handling time. We used previous genome screening studies to determine some genes of interest. Studies in progress in our team should extend these data.

This study has identified specific genes at different adipose tissue sites. Findings about *HOXC10* and recent studies on this gene highlight that much is unknown about this technique and that further molecular studies are needed for understanding adipose tissue and improving AFG technique. Based on our results, *PAX3* and *HOXC10* are

very interesting because respectively specific of adipose tissue of the breast and the thigh. Based on these findings, we have begun a clinical and molecular study in mature and stem cells to study the modifications of expression of these two genes in a heterotopic environment. Adipose cells re-injected from the thigh to the breast will be studied at different time points: on day 0 and at 6 and 12 months.

All authors separately declare they have no conflict of interest regarding this article.

Funding

None declared

Ethical approved

Not required after consultation with a national ethics committee

All authors separately declare have no funding from any organizations

Acknowledgments

This work was supported by “Fondation des Gueules Cassées” number 05-2015.

REFERENCES

1. Agha RA, Fowler AJ, Herlin C, Goodacre TE, Orgill DP. Use of autologous fat grafting for breast reconstruction: a systematic review with meta-analysis of oncological outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015 Feb;68(2):143-61
2. Piasecki JH, Gutowski KA, Lahvis GP, Moreno KI. An experimental model for improving fat graft viability and purity. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Apr 15;119(5):1571-83
3. Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME, Shippert RD, Marra KG, Rubin JP. Comparison of Harvest and Processing Techniques for Fat Grafting and Adipose Stem Cell Isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Aug;132(2):351-61
4. Zhu M, Cohen SR, Hicok KC, Shanahan RK, Strem BM, Yu JC, Arm DM, Fraser JK. Comparison of Three Different Fat Graft Preparation Methods: Gravity Separation, Centrifugation, and Simultaneous Washing with Filtration in a Closed System. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Apr;131(4):873-80
5. Mestak O, Sukop A, Hsueh YS, Molitor M, Mestak J, Matejovska J, Zarubova L. Centrifugation versus PureGraft for Fatgrafting to the Breast after Breast-Conserving Therapy. *World J Surg Oncol*. 2014 Jun 5;12:178
6. Kapur SK, Dos-Anjos Vilaboa S, Llull R, Katz AJ. Adipose Tissue and Stem/Progenitor Cells: Discovery and Development. *Clin Plast Surg*. 2015 Apr;42(2):155-67
7. Zhu M, Cohen SR, Hicok KC, Shanahan RK, Strem BM, Yu JC, Arm DM, Fraser JK. Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation,

centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system. *Plast Reconstr Surg.* 2013 Apr;131(4):873-80

8. Wetterau M, Szpalski C, Hazen A, Warren SM. Autologous Fat Grafting and Facial Reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2012 Jan;23(1):315-8

9. F. Bertolini, J.-Y. Petit and M. G. Kolonin. Stem Cells from Adipose Tissue and Breast Cancer: Hype, Risks and Hope. *Br J Cancer.* 2015 Feb 3;112(3):419-23

10. Køllef SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman ML, Thomsen C, Dickmeiss E, Drzewiecki KT. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2013 Sep 28;382

11. Wang Kc, Helms Ja, Chang Hy. Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol.* 2009 Jun;19(6):268-75

12. Kouidhi M, Villageois P, Mounier CM, Ménigot C, Rival Y, Piwnica D, Aubert J, Chignon-Sicard B, Dani C. Characterization of Human Knee and Chin Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2015;2015:592090

13. Pathiraja TN, Nayak SR, Xi Y, Jiang S, Garee JP, Edwards DP, Lee AV, Chen J, Shea MJ, Santen RJ, Gannon F, Kangaspeka S, Jelinek J, Issa JP, Richer JK, Elias A, McIlroy M, Young LS, Davidson NE, Schiff R, Li W, Oesterreich S. Epigenetic reprogramming of HOXC10 in endocrine-resistant breast cancer. *Sci Transl Med.* 2014 Mar 26;6(229):229ra41

14. Arrighi N, Moratal C, Clément N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, Kurzenne JY, Dani C, Chopard A, Dechesne CA. Characterization of adipocytes derived from

fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* 2015 Apr 23;6:e1733

15. Sydney R. Coleman. Long-Term Survival of Fat Transplants: Controlled Demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 1995 Sep-Oct;19(5):421-5.

16. Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin Nm. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129(18), 4301-4313 (2002).

17. White P, Thomas DW, Fong S, Stelnicki E, Meijlink F, Largman C, Stephens P. Deletion of the homeobox gene PRX-2 affects fetal but not adult fibroblast wound healing responses. *J Invest Dermatol.* 2003 Jan;120(1):135-44

18. Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic Origin and Hox Status Determine Progenitor Cell Fate during Adult Bone Regeneration. *Development.* 2008 Sep;135(17):2845-54

19. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):557-63

20. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, Mancuso P, Calleri A, Corsini C, Pruneri G, Manzotti M, Lohsiriwat V, Rietjens M, Petit JY, Bertolini F. The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer Res.* 2012 Jan 1;72(1):325-34

21. Khairul I. Ansari and others. HOXC10 is Overexpressed in Breast Cancer and Transcriptionally Regulated by Estrogen via Involvement of Histone Methylases MLL3 and MLL4. *J Mol Endocrinol.* 2012 Jan 25;48(1):61-75
22. Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss SJ, Trimble CL, Fearon ER, Cho KR. Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10163-72.
23. M.M. Mueller, N.E. Fusenig. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov;4(11):839-49.
24. K. Polyak, R. Kalluri. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Nov;2(11):a003244
25. A.E. Place, S. Jin Huh, K. Polyak. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):227
26. Wang YY, Lehuédé C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, Le Gonidec S, Escourrou G, Valet P, Muller C. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* 2012 Nov 28;324(2):142-51
27. M. Walter, S. Liang, S. Ghosh, P.J. Hornsby, R. Li. Interleukin six secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene.* 2009 Jul 30;28(30):2745-55
28. B. Dirat, L. Bochet, M. Dabek, D. Daviaud, S. Dauvillier, B. Majed, Y.Y. Wang, A. Meulle, B. Salles, S. Le Gonidec, I. Garrido, G. Escourrou, P. Valet, C. Muller. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion.

Cancer Res. 2011 Apr 1;71(7):2455-65

29. L. Bochet, A. Meulle, S. Imbert, B. Salles, P. Valet, C. Muller. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 22;411(1):102-6

30. Guan J, Chen J. Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment. *Biomed Rep*. 2013 Jul;1(4):517-521

31. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, Taichman R, Wicha MS. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res*. 2011 Jan 15;71(2):614-24

32. Petit JY, Maisonneuve P, Rotmensz N, Bertolini F, Clough KB, Sarfati I, Gale KL, Macmillan RD, Rey P, Benyahi D, Rietjens M. Safety of Lipofilling in Patients with Breast Cancer. *Clin Plast Surg*. 2015 Jul;42(3):339-44

33. Gale KL, Rakha EA, Ball G, Tan VK, McCulley SJ, Macmillan RD. A case-controlled study of the oncologic safety of fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2015 May;135(5):1263-75

34. Largo RD, Tchang LA, Mele V, Scherberich A, Harder Y, Wettstein R, Schaefer DJ. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 Apr;67(4):437-48

35. Claro F Jr, Figueiredo JC, Zampar AG, Pinto-Neto AM. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *Br J Surg*. 2012 Jun;99(6):768-80

36. Billon N, Iannarelli P, Monteiro Mc et al. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. 2007 Jun;134(12):2283-92
37. Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundstrom E, Garcia-Castro Mi. Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol* 344(2), 578-592 (2010)
38. Billon N, Dani C. Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies. *Stem Cell Rev*. 2012 Mar;8(1):55-66.
39. Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6676-81
40. Albornoz CR, Matros E, Lee CN, Hudis CA, Pusic AL, Elkin E, Bach PB, Cordeiro PG, Morrow M. Bilateral Mastectomy versus Breast-Conserving Surgery for Early-Stage Breast Cancer: The Role of Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2015 Jun;135(6):1518-26

Figures legends

Table 1: Final repartition of samples of the study

Figure 1: The expression of *PAX3* in human adipose tissue.

Significance is given by the values in the breast.

Figure 2: The expression of *HOXC10* in human adipose tissue.

Significance is given by the values in the breast.

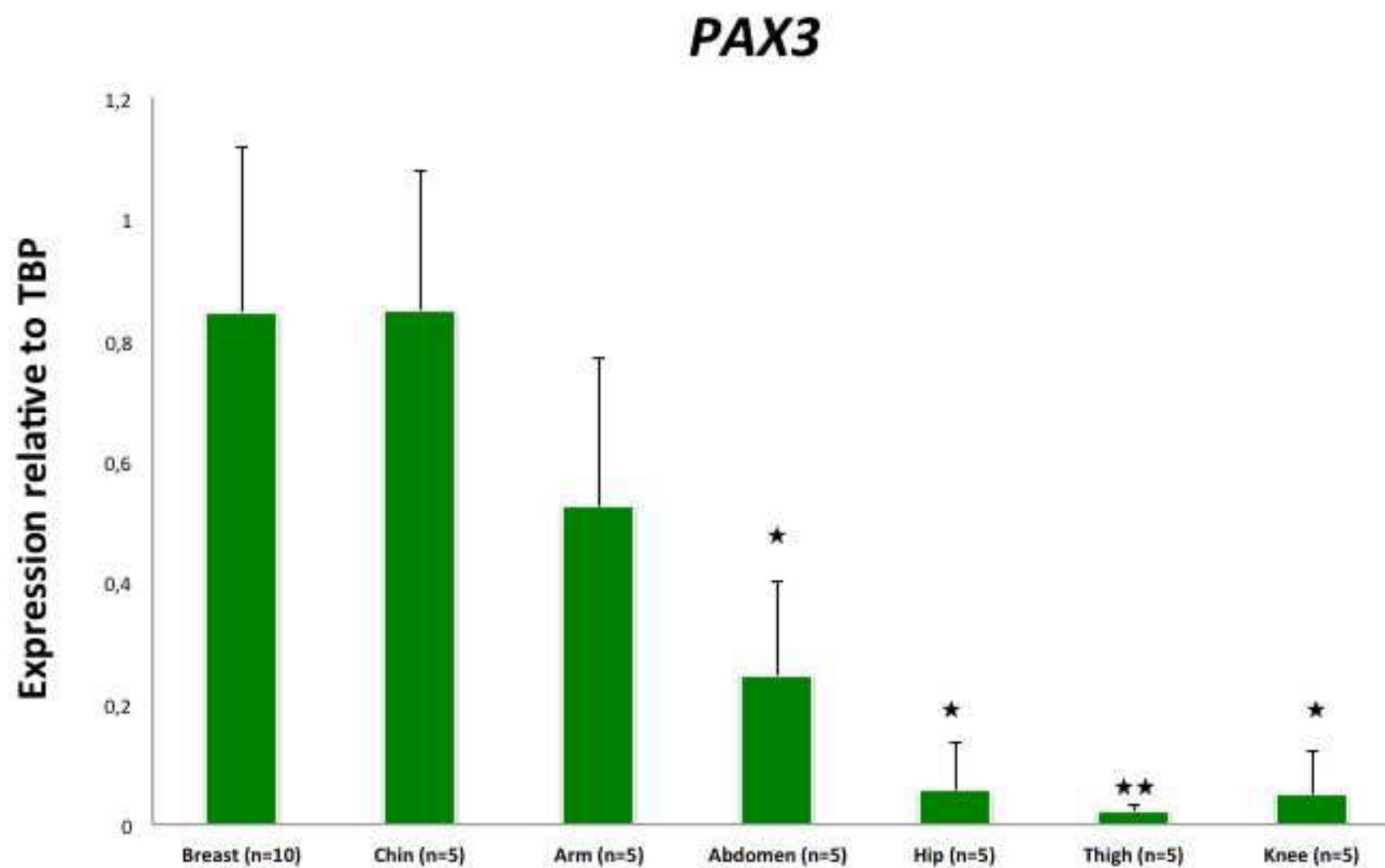
Figure 3: The expression of *aP2* in human adipose tissue.

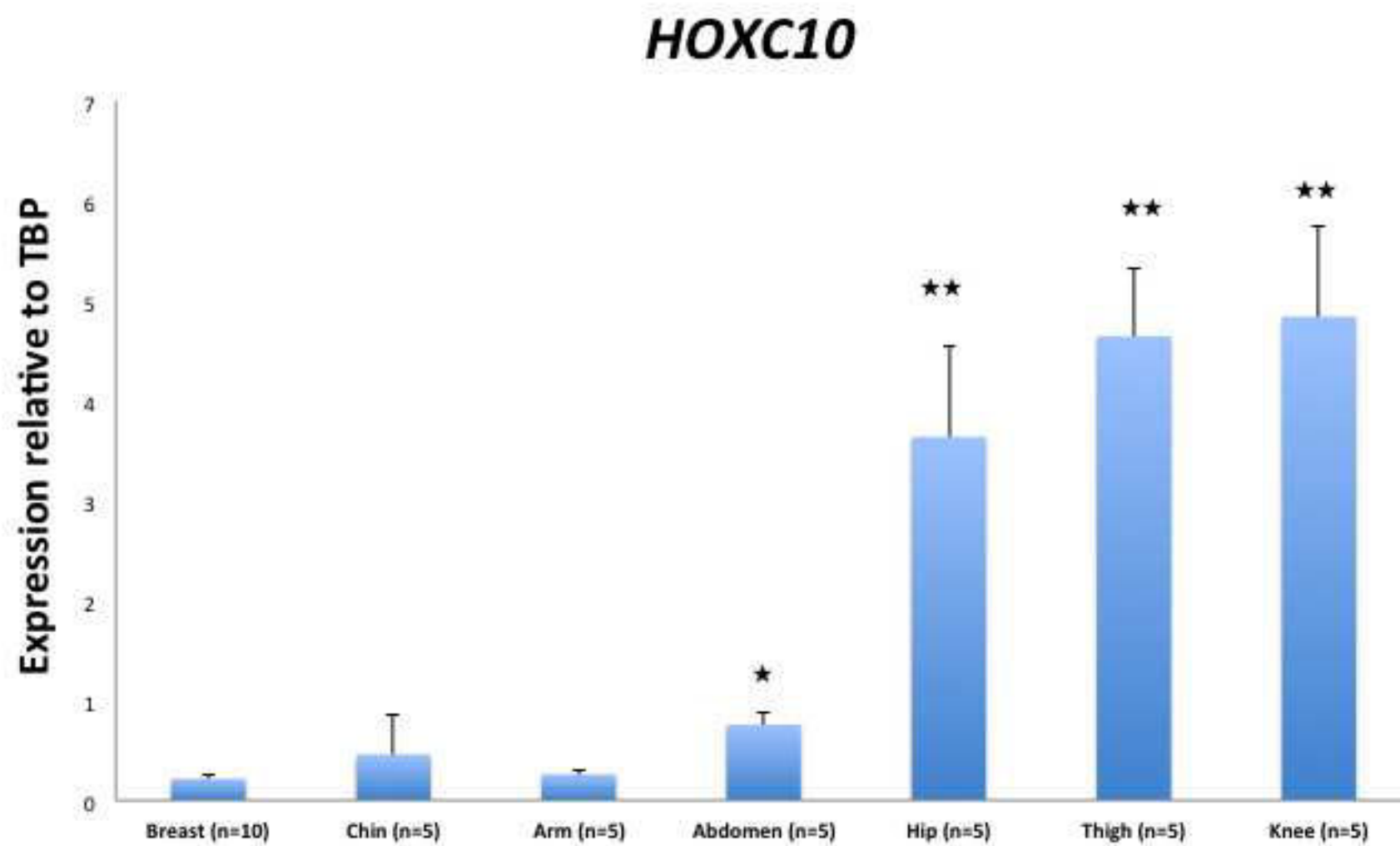
Significance is given by the values in the breast.

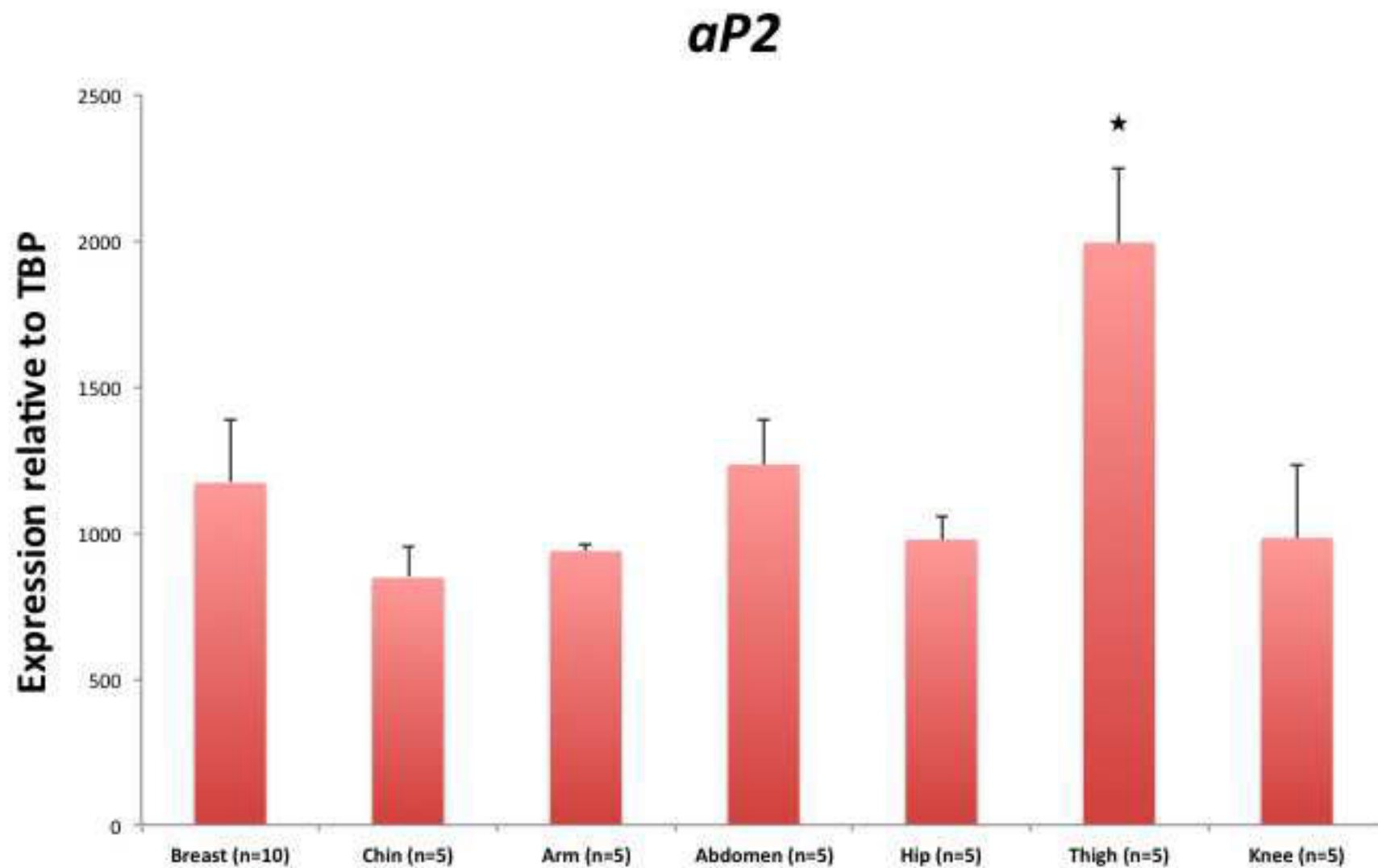
Figure 4: *PAX3*, *HOXC10* and *aP2* expression in adipose donor sites: a synthesis of the study.

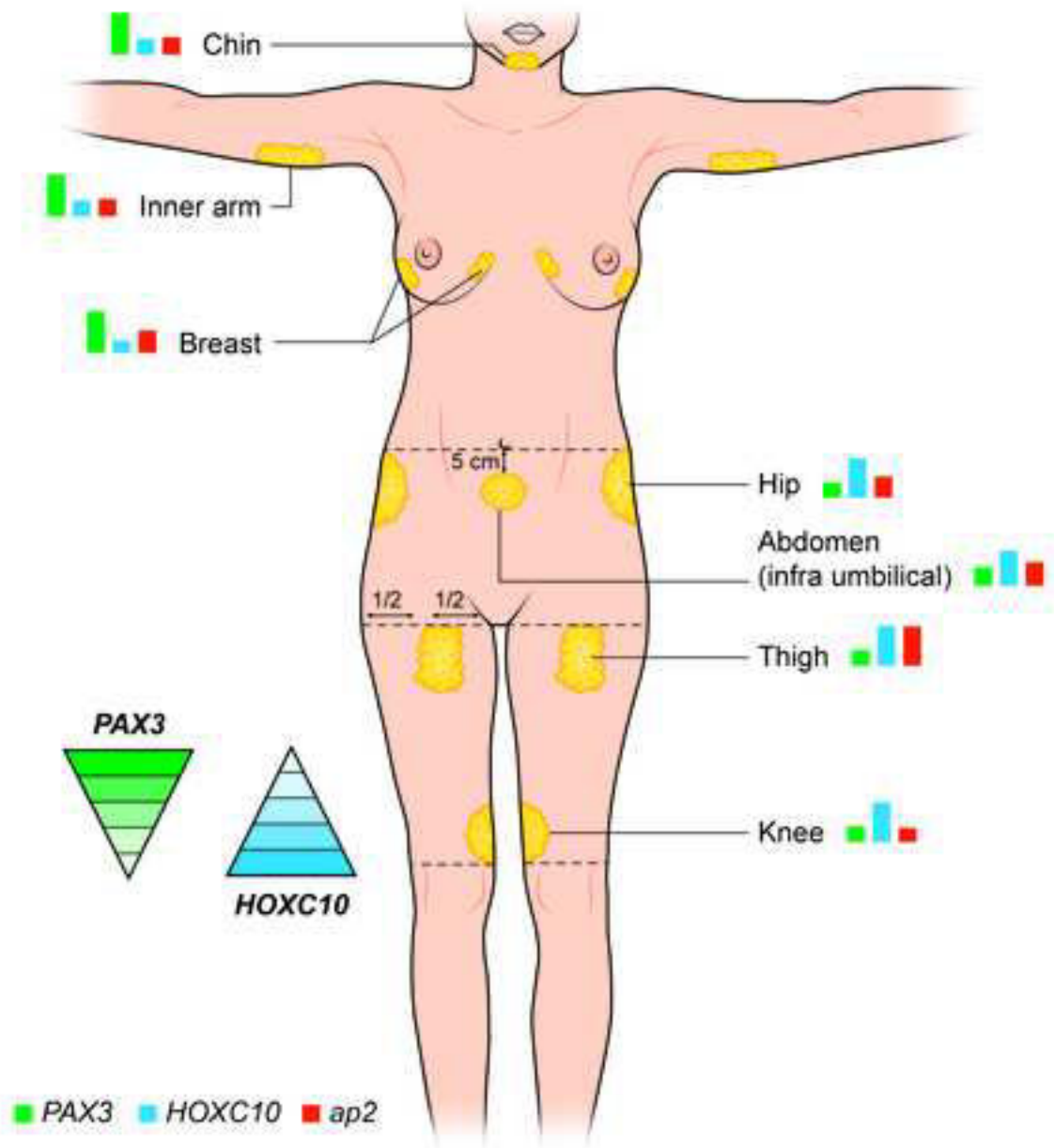
Adipose site	Number of samples
Chin	5
Breast	10
Inner Arm	5
Abdomen	5
Tight	5
Hip	5
Knee	5
<i>Total samples</i>	40

Table 1: Final repartition of samples of the study











Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells

Tala Mohsen-Kanson^{a,1}, Anne-Laure Hafner^{a,1}, Brigitte Wdziekonski^a, Phi Villageois^a, Bérengère Chignon-Sicard^{a,b}, Christian Dani^{a,*}

^a iBV, Institut Biology Valrose, University Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur, UFR Medicine, 28, avenue de Valombrose, 06189 Nice Cedex 2, France

^b University Nice Sophia Antipolis, Plastic, Reconstructive and Hand Surgery Department, Saint Roch Hospital, 5 rue Pierre Devoluy, 06000 Nice Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2012

Available online 23 December 2012

Keywords:

Human adipose-derived stem cells

hMADS cells

Cell surface markers

PDGFR α

ABSTRACT

Human adipose-derived stem cell populations express cell surface markers such as CD105, CD73, CD146 and CD140a/PDGFR α . However, it was unclear whether these markers could discriminate subpopulations of undifferentiated cells and whether the expression of these markers is modulated during differentiation. To address this issue, we analysed the immunophenotype of cultured human multipotent adipose derived stem (hMADS) cell populations at different adipocyte differentiation steps. We found that 100% of undifferentiated cells expressed CD73 and CD105. In contrast, CD146 and CD140a/PDGFR α marked two different subpopulations of cells. CD140a/PDGFR α subpopulation was regulated by FGF2, a critical factor of human adipose-derived stem cell self-renewal. During differentiation, CD73 was maintained and marked lipid-laden cells, whereas CD105 expression was inhibited in fully differentiated cells. The percentage of CD146 and CD140a/PDGFR α -positive cells declined as soon as cells had undergone differentiation. Altogether, these data support the notion that expanded adipose-derived stem cells are heterogeneous mixtures of cells and cell surface markers studied can discriminate subpopulations.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The stromal vascular (SV) fraction of human white adipose tissues is a rich source of adipose-derived stem (ADS) cells, that are studied both by fundamental and clinical research specialists [1]. ADS cells are generally isolated from heterogeneous mixtures of SV cells by their capacity to adhere to plastic culture dishes. Then, due to their self-renewal ability, stem cells can be expanded in culture while maintaining the potential to undergo differentiation at least into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. However, these criteria only enable isolation of stem cells thereafter. ADS cells are described as expressing cell surface markers such as CD105, CD73, CD146 and CD140a/PDGFR α , which could be used for their prospective isolation. However, it is necessary to know whether these markers are expressed during the different steps of ADS maturation prior to isolation undifferentiated ADS cells from heterogeneous cell mixtures. To address this issue, we investigated cell surface marker expression during adipocyte differentiation of *in vitro* expanded human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cell populations [2]. These stem cells have been isolated from white adipose tissues from young donors. They exhibit

stem cell characteristics, i.e. the capacity to self-renew and differentiate into several cell types at the clonal level, even after long-term expansion. Expanded hMADS cells are able to differentiate under serum-free adipogenic conditions into cells displaying a combination of properties similar, if not identical, to those of native human adipocytes [3,4]. Altogether, hMADS cells appear to be a powerful cellular model to investigate cell surface marker expression during self-renewal and differentiation.

Fibroblast growth factor 2 (FGF2) has been reported to have a critical autocrine/paracrine role in human adipose-derived stem cell self-renewal. In addition, cells expanded by FGF2 have a high adipogenesis potential [5–7]. However, whether FGF2 regulates self-renewal of subpopulations of adipose-derived stem cells remains to be determined. We show in this study that hMADS cell populations are composed of subpopulations of cells expressing these cell surface markers at different levels. CD140a/PDGFR α marks a subpopulation of undifferentiated hMADS cells regulated by FGF2.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and culture of human adipose progenitors

hMADS cells were obtained from the stroma of human adipose tissues as described previously [2]. Adipose tissue was collected,

* Corresponding author. Fax: +33 493 37 7058.

E-mail address: dani@unice.fr (C. Dani).

¹ These authors equally contributed to this work.

with the informed consent of the parents, as surgical scraps of surgical specimens from various surgeries, as approved by the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board. The cell populations that were studied here were isolated from the umbilical region fat pad of a 2-year old (hMADS1) female donor and from the prepubic region fat pad of a 4-month old (hMADS3) male donor. Human stroma vascular (SV) cells were isolated from subcutaneous adipose tissues from a 61 year-old female. Proliferation medium for routine maintenance of hMADS cells and SV cells was composed of DMEM (low glucose) containing 10% foetal calf serum, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and streptomycin. After reaching 80% confluence, adherent cells were dissociated in 0.25% trypsin EDTA. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified gased incubator, 5% CO₂ in air.

2.2. hMADS cell and SV cell differentiation

hMADS cell adipocyte differentiation was performed as previously described [8]. Basically, confluent cells were cultured in DMEM/Ham's F12 media supplemented with transferrin (10 µg/ml), insulin (5 µg/ml), triiodothyronine (0.2 nM), dexamethasone (1 µM), isobutyl-methylxanthine (100 µM) and rosiglitazone (1 µg/ml). Three days later, the medium was changed (dexamethasone and isobutyl-methylxanthine were omitted). The SV cell adipogenic differentiation cocktail consisted of 10% FCS supplemented with insulin (5 µg/ml), triiodothyronine (0.2 nM), dexamethasone (0.25 µM), isobutyl-methylxanthine (500 µM) and rosiglitazone (1 µg/ml).

2.3. RT-PCR analysis

All primer sequences are detailed in supplemental Table 1. Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Normalisation was performed using the geometric averages of the TBP housekeeping gene. Quantification was performed using the comparative-DCT method.

2.4. Flow cytometry analysis for cell surface markers

Cell surface antigens for hMADS cells were analysed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) of living cells. We incubated 250,000 cells with each of the following conjugated human specific monoclonal antibodies: CD73 PE, CD105 FITC, CD146 FITC, PDGFRα/CD140a PE (BD Pharmingen). Nonspecific fluorescence was determined by incubation of similar cell aliquots with isotype-matched mouse monoclonal antibodies (BD Pharmingen). Data were analysed by collecting 10,000 events using a FACSCalibur flow cytometer with Cellquest acquisition software (BD Biosciences).

For CD73 and LipidTox labelling, cells were incubated with HSC LipidTox Deep Red (Invitrogen, H34477), a neutral lipid stain and with CD73 PE antibody for 15 min at room temperature. Adipocytes were gated as previously described and the data were analysed by collecting 50,000 events using Cellquest acquisition software (BD Biosciences).

2.5. Statistical analysis

Statistical significance was determined by InStat3 software. Probability values <0.05 were considered as statistically significant. A nonparametric unpaired test (Mann–Whitney) was used.

3. Results and discussion

3.1. Expression of cell surface markers by undifferentiated and differentiating human adipose-derived stem cells

We analysed the expression kinetics of CD105, CD73, CD146 and CD140a/PDGFRα during the differentiation of two hMADS cell populations isolated from separate donors [2]. hMADS1 cells were isolated from the umbilical region fat pad of a 24-month old female donor and hMADS3 cells were isolated from the prepubic region of a 4-month old male donor. These cells populations were studied after 15–20 passages. As shown in Fig. 1A, the hMADS cell adipocyte differentiation process can be divided into two main states, i.e. the undifferentiated state corresponds to exponential cell growth phase or when cells are growth-arrested by cell–cell contact (which is determined as the day of differentiation induction). Around 7 days later, cells reached the terminal differentiated state when they accumulated lipid droplets. The expression of adipogenic genes, such as PPARγ2, FABP4 and leptin, was used to monitor the terminal differentiated state (Fig. 1B). Then cell surface marker expression during the differentiation process was determined by flow cytometry. As shown in Fig. 2, CD105 and CD73 were expressed by 90–100% of undifferentiated cells. CD106, CD34 and CD45 expression was not detectable (not shown). CD105 expression was dramatically reduced in differentiated cells, whereas CD73 expression was maintained during differentiation.

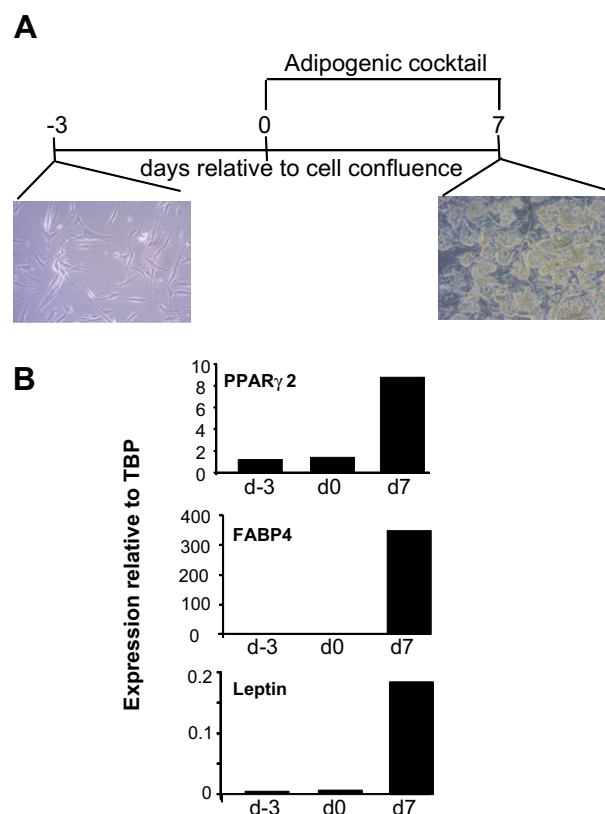


Fig. 1. Adipocyte differentiation of human adipose-derived stem cells. (A) Experimental scheme for differentiation of hMADS cells. Undifferentiated growing cells (day 3) were maintained in DMEM medium containing 10% FCS till the cells reached confluence (day 0). Then the cells were induced to undergo adipocyte differentiation in serum-free medium as described in the Materials and methods. Seven days later, cells were filled with lipid droplets. (B) Expression of adipogenic markers. RNAs were prepared at the indicated times and PPARγ2, FABP4 and leptin expression was analysed by real-time PCR. The kinetics of expression is representative of several independent experiments.

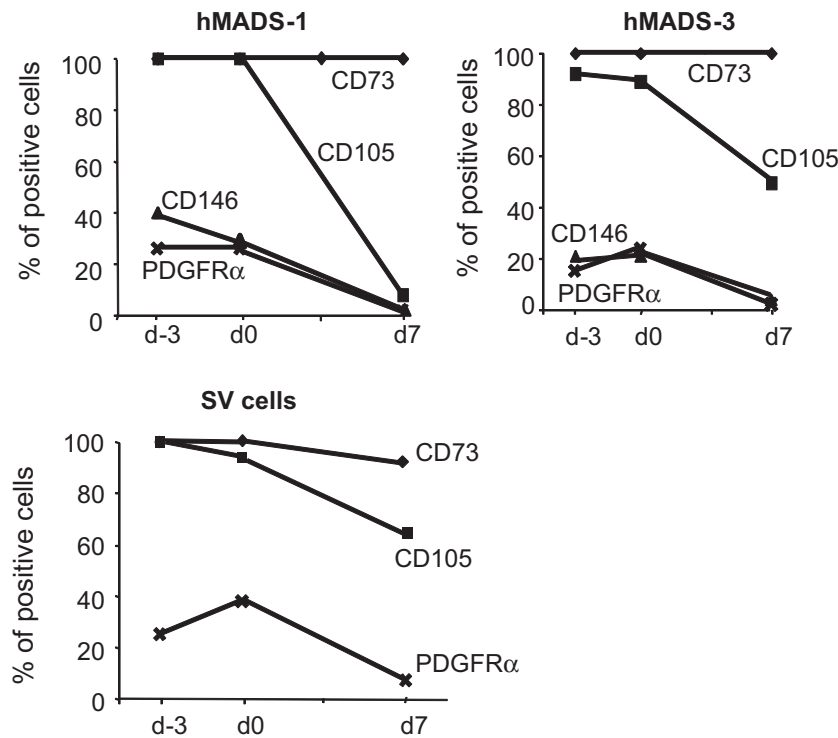


Fig. 2. Flow cytometry analysis of cell surface markers during adipocyte differentiation of hMADS cells and human adipose-derived stroma (SV) cells. hMADS1, hMADS3 and SV cells were stained at the indicated times for the surface antigens CD73, CD105, CD146 and CD140a/PDGFRα, and FACS analysis was performed. The y axis represents the percentage of positive cells.

To determine whether CD73 was also expressed in lipid-laden cells, cells were stained with Lipidtoxin, for triglyceride staining, and adipocytes were quantified by flow cytometry based on Lipidtoxin staining and granularity parameters, as previously described [9]. As shown in Fig. 3, CD73 marked both undifferentiated cells and adipocyte derivatives.

CD140a/PDGFRα and CD146 were expressed by a subpopulation of undifferentiated cells that represented around 20% of the total cell population. Then their abundance declined as soon as the cells had undergone differentiation. The abundance of CD140a/PDGFRα and CD146 subpopulations was 4 times lower in 7-day differentiated cultures than in undifferentiated ones ($n = 4$, $p < 0.05$). A similar expression profile was observed during differentiation of hMADS3 and hMADS1 expanded cell populations isolated from young donors and during differentiation of a primary culture of adipose tissue stroma cells isolated from an older subject (Fig. 2). These data indicated that CD140a/PDGFRα and CD146 allowed to distinguish two subpopulations of undifferentiated cells.

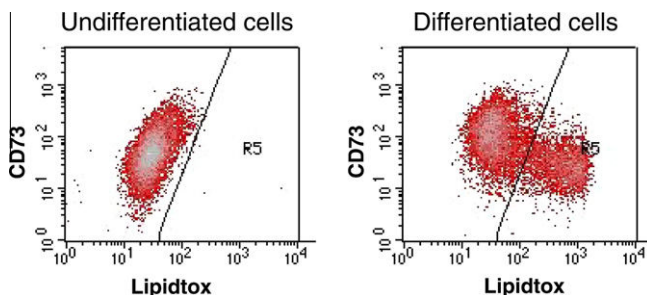


Fig. 3. CD73 marks both undifferentiated cells and mature adipocytes. Undifferentiated (day 0) and differentiated (day 7) cells were stained with Lipidtoxin and CD73 and then analysed by flow cytometry. This result is representative of 2 independent experiments.

Interestingly, the double positive CD140a/PDGFRα and CD146-positive cells represented a weak percentage of the undifferentiated culture (2%, not shown). The requirement of CD146 and of CD140a/PDGFRα inhibition for terminal adipogenic differentiation has yet to be demonstrated, but would be in agreement with the previously reported anti-adipogenic effect of PDGFRα [10]. Altogether, these data highlighted that subpopulations of cells coexisted in undifferentiated hMADS cell populations. The properties of each subpopulation should be analysed in detail and the first step could be to investigate their regulation by factors that play a critical role in human adipocyte differentiation.

3.2. Regulation of cell surface markers by FGF2

We investigated factors regulating CD146 and CD140a/PDGFRα subpopulation abundance. First, we analysed whether component(s) involved in adipogenic commitment (see Materials and methods) might be involved in their down-regulation. hMADS cells were thus maintained in serum-free medium supplemented with transferrin and insulin and then exposed to dexamethasone (DEX) and IBMX for 3 days. Flow cytometry analysis revealed that a similar percentage of subpopulation was present in untreated and DEX-IBMX-treated cells (not shown). Then we investigated the effects of FGF2, i.e. a critical factor for stem cell maintenance. Interestingly, the percentage of CD140a/PDGFRα expressing cells dramatically increased upon FGF2 addition. As shown in Fig. 4, more than 80% ($n = 4$, $p < 0.05$) of the cells expressed CD140a/PDGFRα after 3 day stimulation with FGF2. In contrast, CD73, CD105 and CD146 subpopulations were not significantly changed. Inhibition of CD140a/PDGFRα expression during differentiation was maintained even when undifferentiated cells were treated with FGF2 (not shown). As we previously reported that hMADS cells secrete FGF2 [5], we analysed the role of the FGF2 auto-crine/paracrine loop in the maintenance of a CD140a/PDGFRα-po-

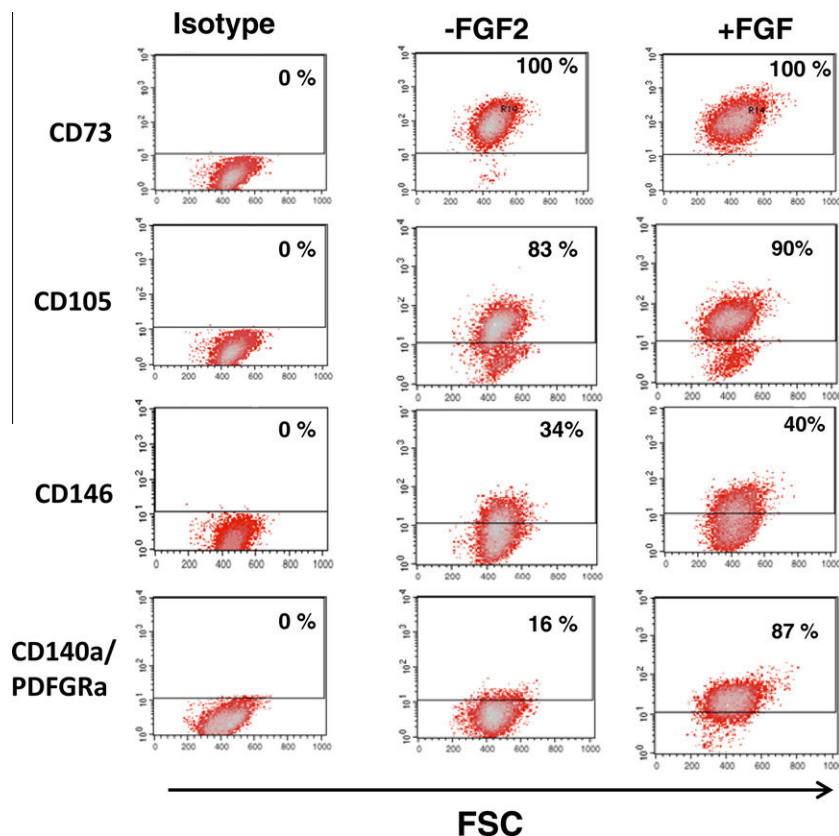


Fig. 4. Effects of FGF2 on the PDGFR α cell population percentage. hMADS3 cells were maintained in the absence or presence of 2.5 ng/ml FGF2 for 3 days. Cells were then stained for the indicated surface antigens. The x-axis represents the cell size and the y-axis indicates the relative fluorescence intensity from 10 to 10,000 on a logarithmic scale.

sitive cell population. In the absence of exogenous FGF2 addition, inhibition of the FGF pathway using PD173074, i.e. a specific FGF receptor inhibitor [11], led to a 70% $\pm$ 10% ($n = 2$) reduction in PDGFR α -positive cell abundance. These observations strongly suggest that the CD140a/PDGFR α cell sub-population was maintained mainly via endogenous FGF2 expression.

Altogether, these data indicate that CD140a/PDGFR α marks a subpopulation of cells in undifferentiated human adipose-derived stem cell populations. Interestingly, it has been reported, in a mouse muscle-derived cell population, that only the CD140a/PDGFR α cell population supports the adipogenic potential [12], as we also noted in humans (N. Clement and C. Dechesne, unpublished data). CD146 is described as a universal adult stem cell marker [13], but the CD146 cell population derived from adipose tissue does not display a high adipogenic potential [14]. To go further, it would be interesting to compare the adipogenic potential of CD146 and CD140a/PDGFR α cells and to more thoroughly investigate their self-renewal and the multipotency potential.

Our study revealed that expanded hMADS cells are heterogeneous populations, in agreement with the hierarchical model proposed for bone marrow-derived mesenchymal stem cell populations [15] and for a recent review see [16]). We suggest that the CD140a/PDGFR α cell subpopulation could represent a core of immature cells that is maintained by the FGF2 pathway.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fondation ARC (grant 6554) and ANR (grant 2010-RFCS-007-01 and T. M-K PhD fellowship).

References

- [1] A.M. Rodriguez, C. Elabd, E.Z. Amri, G. Ailhaud, C. Dani, The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Biochimie* 87 (2005) 125–128.
- [2] A.-M. Rodriguez, D. Pisani, C.A. Dechesne, C. Turc-Carel, J.-Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J.-P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, C. Dani, Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1397–1405.
- [3] V. Bezaire, A. Mairal, C. Ribet, C. Lefort, A. Girousse, J. Jocken, J. Laurencikienė, R. Anesia, A.M. Rodriguez, M. Ryden, B.M. Stenson, C. Dani, G. Ailhaud, P. Arner, D. Langin, Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 18282–18291.
- [4] C. Poitou, A. Divoux, A. Faty, J. Tordjman, D. Hugol, A. Aissat, M. Keophipath, C. Henegar, S. Commins, K. Clement, Role of serum amyloid A in adipocyte-macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 1810–1817.
- [5] L.E. Zaragosi, G. Ailhaud, C. Dani, Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells, *Stem cells* 24 (2006) 2412–2419.
- [6] N. Kakudo, A. Shimotsu, K. Kusumoto, Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 239–244.
- [7] D.A. Rider, C. Dombrowski, A.A. Sawyer, G.H. Ng, D. Leong, D.W. Huttmacher, V. Nurcombe, S.M. Cool, Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Stem cells* 26 (2008) 1598–1608.
- [8] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 255–263.
- [9] K. Schaedlich, J.M. Knelangen, A. Navarrete Santos, B. Fischer, A. Navarrete Santos, A simple method to sort ESC-derived adipocytes, *Cytometry A* 77 (2010) 990–995.
- [10] Y. Artemenko, A. Gagnon, D. Aubin, A. Sorisky, Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition, *J. Cell. Physiol.* 204 (2005) 646–653.
- [11] S.D. Skaper, W.J. Kee, L. Facci, G. Macdonald, P. Doherty, F.S. Walsh, The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1520–1527.

- [12] A. Uezumi, S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, K. Tsuchida, Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 143–152.
- [13] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badyrak, H.J. Buhring, J.P. Jacobino, L. Lazzari, J. Huard, B. Peault, A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs, *Cell Stem Cell* 3 (2008) 301–313.
- [14] H. Li, L. Zimmerlin, K.G. Marra, V.S. Donnenberg, A.D. Donnenberg, J.P. Rubin, Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations, *Plast. Reconstr. Surg.* 128 (2011) 663–672.
- [15] J.E. Aubin, Bone stem cells, *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30–31 (1998) 73–82.
- [16] M. Pevsner-Fischer, S. Levin, D. Zipori, The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity, *Stem Cell Rev.* 7 (2010) 560–568.

Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Brown and White Adipocytes: Role of Pax3

Tala Mohsen-Kanson¹, Anne-Laure Hafner¹, Brigitte Wdziekonski¹, Yasuhiro Takashima², Phi Villageois¹, Audrey Carrière³, Maria Svensson⁴, Claude Bagnis⁵, Bérengère Chignon-Sicard^{1,6}, Per-Arne Svensson⁴, Louis Casteilla³, Austin Smith² and Christian Dani^{1*}

¹ Université Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR CNRS/INSERM, Faculté de Médecine 06107 Nice Cedex 2, France ;

² Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute, University of Cambridge, UK; ³ UMR UPS/CNRS/EFS 5273, INSERM U1031, Toulouse, France ; ⁴ Department of Molecular and Clinical Medicine, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; ⁵ Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée 13005 Marseille, France; ⁶ Plastic, Reconstructive and Hand Surgery Department, Saint Roch Hospital, Nice, France

Key words. human induced pluripotent stem cells • adipocyte development • adipocyte progenitors • Pax3

ABSTRACT

Identification of molecular mechanisms involved in generation of different types of adipocytes is progressing substantially in mice. However, much less is known regarding characterization of brown and white adipocyte progenitors (APs) in humans, highlighting the need for an *in vitro* model of human adipocyte development. Here we report a procedure to selectively derive brown and white APs from human induced pluripotent stem cells. Molecular characterization of APs of both phenotypes revealed that *BMP4*, *Hox8*, *Hoxc9* and *HoxA5* genes were specifically expressed in white APs, whereas expression of *PRDM16*, *Dio2* and *Pax3* marked brown APs. We focused on Pax3 and we showed that

expression of this transcription factor was enriched in human perirenal white adipose tissue samples expressing *UCP1* and in human classical brown fat. Finally, functional experiments indicated that Pax3 was a critical player of human AP fate as its ectopic expression led to convert white APs into brown-like APs. Together, these data support a model in which Pax3 is a new marker of human brown APs and a molecular mediator of their fate. The findings of the present study could lead to new anti-obesity therapies based on the recruitment of APs and constitute a platform for investigating *in vitro* the developmental origins of human white and brown adipocytes.

INTRODUCTION

Brown and white adipose tissues coexist in mammals and both are involved in the energy balance but have opposite functions. White adipose tissue (WAT) is mainly involved in

energy storage whereas brown adipose tissue (BAT) is specialized in energy expenditure. Brown adipocytes convert nutrients into heat by uncoupling respiration from ATP synthesis, this process being mediated by the brown adipocyte-specific uncoupling protein (UCP) 1. Major progress has been done in

Author contributions: T.M.: conception and design; A.H.: conception and design; C.D.: conception and design, financial support, manuscript writing; B.W.: conception of experiments; P.V.: conception of experiments; Y.T.: conception and design of experiments, provision of human ES cells; A.C.: conception and design of experiments; M.S.: conception and design of experiments, provision of human subjects; C.B.: conception and design, financial support; B.C.: provision of human subjects; P.S.: design, provision of human subjects, financial support; L.C.: design, provision of mouse materials, financial support; A.S.: design, provision of human ES cells, financial support

*Corresponding author: Christian Dani. iBV. Faculté de Médecine, Nice, France, Phone: +33 (0)4 93 37 76 47, Fax: +33 (0)4 93 37 70 58, e-mail: dani@unice.fr, <http://ibv.unice.fr/EN/equipe/dani.php>; Acknowledgments: The authors thank all members of the "Stem Cells and Differentiation" team for helpful discussions. This work was supported in part by the Fondation ARC (grant 6554), ANR (grant 2010-RFCS-007-01 and T. M-K PhD fellowship), the Swedish federal government under the LUA/ALF agreement. This work was partially supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE : program reference # ANR-11-LABX-0028-01. The authors state that they have no conflict of interest; Received September 19, 2013; accepted for publication November 03, 2013; 1066-5099/2013/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1607

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/stem.1607

characterization of the transcriptional networks that control adipogenesis. PPAR γ , PGC1 α and PRDM16 appear to be the three determinant factors for the acquisition of brown adipocyte phenotype [1]. Although BAT is mainly present in newborns and decreases with aging in humans, metabolically active BAT exists in adults and could contribute to the energy balance [2, 3]. White fat depots contain UCP1-expressing cells that can be recruited upon certain stimuli [4]. These adipocytes, now named brite or beige, have been characterized recently in more detail [5, 6]. Beige/brite adipocytes are mainly perceived as the result of transdifferentiation of white adipocytes to brown-like adipocytes [7, 8], but the existence of a dedicated brite/beige progenitor in white fat cannot be excluded [6]. These recent findings offer promising prospects for basic research and clinical medicine, since increasing energy expenditure via recruitment of brown adipocyte progenitors could constitute a valuable therapeutic approach to counteract obesity and its associated metabolic complications. However, the identity of brown and white adipocyte progenitors (APs) and transcription factors regulating their fate remain to be characterized in humans, mainly because the lack of appropriate *in vitro* cellular models. The potential of induced pluripotent stem cells (hiPSCs), resembling human embryonic stem cells [9], to generate functional adipocytes [10-13] has dramatically enhanced the prospects for investigating the earliest steps of human brown and white adipogenesis. However, development of a procedure allowing selective derivation of human brown and white adipocyte progenitors from hiPS cells remains to be established.

MATERIALS AND METHODS

Human induced pluripotent stem cell generation, maintenance and adipocyte differentiation

Human iPS cells, named hiPS NOK6, -NOK6-tat and -O27-tat, were generated by reprogramming neural stem cells [14] with PiggyBac technology [15, 16]. Reprogramming genes were Nanog-Oct4-Klf4 transgene cassette or Oct4 only. hiPS cells, named hiPS-10, were generated by reprogramming adipose-

derived stem cells (hASCs [17]) and using pMX retroviral vectors expressing Oct4 (Addgene plasmid 17220), Sox2 (Addgene plasmid 17218), Klf4 (Addgene plasmid 17219) and c-Myc (Addgene plasmid 17219), as described in detail by the Yamanaka team [9]. hiPS and hES cells were maintained undifferentiated in DMEM/F12 medium containing 20% KSR and 10 ng/ml FGF2 on STO or MEF feeder layers.

In contrast to mouse ES cells, the potential of hiPSCs to generate adipocytes is low. We conducted optimization experiments based on the procedures described previously for mouse ES cell adipogenesis ([18, 19]) and more recently for human pluripotent stem cells [10]. In our hands the best adipocyte differentiation protocol to generate brown and white adipocytes is the following: Differentiation was initiated by floating cultivation to form embryoid bodies (EBs) by plating undifferentiated cells onto six well plates (Costar, Ultra Low Cluster plate, Ultra Low Attachment ref 3471) in DMEM/F12 medium supplemented with 20% KSR (proliferative medium). When indicated, 10⁻⁶M retinoic acid (RA) was added from days 3 to 5. Ten days after EB formation, EBs were plated onto gelatin-coated culture plates and outgrowths were maintained in DMEM/F12 supplemented with 20% KSR. Ten days later, outgrowths were induced to undergo adipocyte differentiation with a cocktail composed of 10% KSR in DMEM/F12 supplemented with 0.5 mM IBMX, 0.25 μ M Dex, 0.2 nM T3, 1 μ g/ml insulin and 1 μ M BRL. This medium was renewed every 3 days. The percentage of adipocytes varied from 2% to 15% depending on the small molecules used to promote differentiation. It is important to note that the increase number of adipocyte was accompanied with a change in the adipocyte phenotype (see Fig.1 and Fig.S1).

Derivation of AP populations from differentiating hiPSCs

Derivation of AP populations were mainly performed as previously described by Brown and colleagues for mesenchymal stem cell derivation from hESCs [20]. Briefly, 10 days after EB plating, outgrowth cells were

maintained for 1 week in mesenchymal cell growth medium composed of DMEM supplemented with 10% FCS and with 5 ng/ml FGF2. Outgrowths were then trypsinized, passaged with a 1:3 split ratio until achieving homogeneous CD73 labelling (around two passages). Then, cells able to form clones 10 days after plating at low density (18 cells/cm² in 100-mm² dishes) were pooled and expanded for differentiation. The number of clones for generating APs was similar (around 100 hundred/dish) from untreated and RA-treated hiPSCs. Clonogenic potential of APs changed thereafter according their passage number (see Figure S3A).

APs were transduced with a retroviral vector expressing C/EBP β -LAP in order to amplify their adipogenic potential. Cells were then induced to undergo differentiation using the adipogenic medium composed of DMEM supplemented with 10% FCS, 0.5 mM IBMX, 0.25 μ M Dex, 0.2 nM T3, 1 μ g/ml insulin and 1 μ M BRL.

Generation and differentiation of AP-Pax3 cells

Lenti6/Ubc-Slc7a1, a lentiviral vector expressing Slc7a1 (Addgene 17224), was first used to generate APs and hASC cells harbouring the mouse ecotropic retrovirus receptor (EcoRec) using a previously described procedure [21]. APs-EcoRec and ASC-EcoRec cells were then selected in the presence of 2.5 μ g/ml blasticidin. Ecotropic retroviral vector expressing Pax3-EGFP, or Pax3 dominant-negative-form-EGFP or EGFP construct as control (both a gift from the Zammit P.S laboratory (London, UK)) were produced in PLAT-E cells (Cell Biolabs). Twenty-four hours after transfection, medium was collected, filtered through a 0.22 μ m filter, and transferred to AP-EcoRec and hASC-EcoRec dishes for 24 h in the presence of 5 μ g/ml protamine sulfate. Twenty-four hours later, cells reached confluence and were induced to undergo differentiation. Flow cytometry analysis, thanks to the EGFP cassette included in Pax3 constructs, revealed similar transduction efficiency.

Oil red O Staining

Adipose cells with lipid droplets were microscopically visualized after Oil Red Staining as previously described [22].

Immunocytochemistry

BAP and WAP cells were rinsed twice with PBS at 4 °C, and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Fixed cells were permeabilized with 0.5% triton for 10 min, and unspecific reactions blocked with 5% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Cells were then incubated for 1h with an anti-Pax3 (Abcam ab137470) Nuclei were counterstained with DAPI. Images were taken on a Zeiss Observer Z1 microscope.

Human subjects

Biopsies of perirenal adipose tissue from 55 healthy subjects from Gothenburg University, scheduled for kidney donation, were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction. This group of subjects were subgrouped into a group with high perirenal adipose tissue *UCP1* expression (classified as BAT-positive samples). A control group with low perirenal adipose tissue *UCP1* expression was matched to the BAT-positive group based on sex, age and BMI (classified as BAT-negative samples). The hBAT+ samples had more than 200-fold higher *UCP1* expression ($P < 0.05$) compared to the hBAT-negative samples. The regional ethics committee in Gothenburg approved the study protocols and all subjects in the study received written and oral information before providing written informed consent for the biopsy collection. Biopsies of neck fats from 5 subjects were collected postmortem. RNAs could be prepared in a quality enough to perform real-time PCR from three subjects. Subject 1: 94 year-old female; RNAs prepared 8 days after death. Subject 2: 94 year-old female; RNAs prepared 3 days after death. Subject 3: 85 year-old male; RNAs prepared 5 days after death.

Real-time PCR and Statistical analysis

Total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen). Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied

Biosystems). Transcript expression levels were evaluated using a comparative CT method (2-deltaCT). Delta delta Ct values were used when “expression relative to *TBP*” is indicated. *TBP* was used as a reference gene when analyzing human samples. For mouse, *36B4* was used because variability of *TBP* gene expression. For expression in perirenal adipose tissues, total RNA from was isolated using the RNeasy lipid tissue midi kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for cDNA synthesis. cDNA was preamplified using the TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, Ca, USA) with a pool of primers for *PAX3*, *UCP1* and *TBP* (Hs00240950_m1, HS00222453_m1, Hs00427620_m1, all from Applied Biosystems). TaqMan analysis was carried out using a multiplex approach by combining a VIC-labelled primer-limited assay for *TBP* with FAM-labelled target assays for *UCP1* and *PAX3*, respectively. Gene expression analysis was carried out using Viiia7 RUO software (Applied Biosystems).

Statistical significance was determined using InStat3 software for all results except in the human perirenal fat study. Probability values <0.05 were considered as statistically significant and marked with a single asterisk, <0.01 by double asterisks and <0.001 by a triple asterisk. A nonparametric unpaired test (Mann-Whitney) was used. The T-test (2-tailed, unequal variance) was used in the matched analysis (10+10 individuals) in the perirenal fat studies. All primer sequences are detailed in Table S4.

RESULTS AND DISCUSSION

Derivation of brown and white adipocyte progenitors from human iPSCs

Human Adipose-derived Stem Cells (ASCs) were used as a cell source to generate iPSCs, because it has been shown that they can be reprogrammed with efficiencies higher than with other cell sources [23]. As there are indications that some iPSC lines favour specific differentiation pathways due to epigenetic memory, we also used human iPSCs that we generated by reprogramming neural

stem cells. Adipogenesis of both hiPSC lines were investigated and we did not observe significant difference between them (see Materials and Methods for the name of hiPSC lines used). hiPSCs were differentiated into embryoid bodies (EBs) to induce formation of the three germ layers. After 10 days in suspension, EBs were plated on adherent cell culture dishes and outgrowths were maintained in proliferative medium for 10 days, and then in adipogenic medium for another 10-day period (see Figure 1A for the experimental scheme with timeline). Several cell types were observed in differentiated cultures, as expected for the development of pluripotent stem cells. Microscopic observation indicated that adipocyte differentiation efficiency was low and FACS analysis revealed that adipocytes represented around 2% of total differentiated cells (Figure S1A). Gene expression analysis allowed phenotyping of generated adipocytes. *PPAR γ 2*, *FABP4*, *CPT1M* and *UCP1* expression dramatically increased when hiPSCs were induced to undergo adipocyte differentiation (Figure 1B). Expression of other adipocyte genes, such as *C/EBP δ* , *C/EBP β* , *leptin*, *Dio2*, *PGC1 α* and *PRDM16*, was detected both in undifferentiated and differentiated cultures (not shown). Interestingly, *UCP1*, *Dio2* and *PGC1 α* expression was increased in differentiated hiPSCs upon stimulation with a β -adrenergic agonist (Figure 1C). Together, these data indicate that differentiated hiPSC cultures contained cells expressing a brown adipocyte gene program. We performed a small-scale drug screening to reveal small molecules allowing selective derivation of brown and white APs (see Table S1). EB derived from hiPSCs were thus treated with different pharmacological inhibitors or activators of signalling pathways known to govern differentiation of stem cells. At the concentration and the period of time we used the molecules, we did not observe any significant effect of ERK, p38MAPK, Wnt and Hhg pathways on hiPSCs adipogenesis. In contrast, retinoic acid (RA) and TGF β pathways appeared to be involved (Figure S1B-C). Because the relevance of RA in stem cell adipogenesis, its effects were investigated in further detail. *FABP4* and *PPAR γ 2*

expression was significantly increased in RA-treated cultures. In contrast, *UCP1* expression was inhibited. Similar data were obtained with hiPSCs generated from ASCs and from neural stem cells (Figure 1D). More interestingly, a similar expression pattern was observed when the human H9 embryonic stem cell line was maintained in the same culture conditions as hiPSCs (Figure S1D). Together, these data support the hypothesis that RA treatment at an early development stage selectively induced the differentiation of hiPSCs into *UCP1*-low adipocytes, i.e. white adipocytes, while inhibiting generation of *UCP1*-high adipocyte, i.e. brown adipocytes. This is reminiscent of the critical role of RA in the generation of white adipocytes originated from neural crest during differentiation of mouse ES cells [24, 25], and in developing zebrafish embryos [26]. It is worth noting that several publications have previously demonstrated a positive effect of retinoic acid on *UCP1* gene expression and on terminal differentiation of brown APs in rodents [27]. However, effect of RA during the earliest steps of brown adipocyte development, i.e. before the generation of brown APs shown in this work, has never been reported. Thus, the use of RA opened the opportunity to derive both brown and white APs despite the low adipogenic potential of hiPSCs. Flow cytometry analysis in differentiating hiPSCs revealed at day 20 the presence of cells expressing CD73, a marker of mesenchymal stem cells and APs [28]. The procedure to isolate APs of both phenotypes was therefore based first on early treatment of EBs with RA or not, and then derivation of CD73-expressing cells from 20 day-old outgrowths. Hereafter, CD73+ cells derived from untreated hiPSCs are named brown adipocyte progenitors (“BAPs”), and those derived from RA-treated hiPSCs are named white AP (“WAPs”). Both APs exhibited a similar morphology and the immunophenotype of adult APs, i.e. positive for CD90, CD105 and CD146 surface antigens and negative for CD45 and CD31 [29] (Table S2). They grew with a doubling time (30-35 hours) similar to that of human ASCs derived from post-natal adipose tissue (named hMADS cells in previous publications [17, 30], and WAPS displayed a clonogenic potential dramatically reduced compared to BAPs

(Figure S2A). As expected, *FABP4* and *PPAR γ 2* were expressed in both differentiated APs and *UCP1*, *PRDM16* and *PGC1 α* genes expression was enhanced in BAPs (Figure 2A). Differential expression of *UCP1* between BAPs and WAPs was confirmed at the protein level (Fig.S2B). Low adipogenicity of human ESCs- and iPSCs-derived cells has been reported by others (see for discussion [31]). More intriguing is the low level of differentiation we observed even after overexpression of C/EBP β -LAP. These data strongly suggest that the appropriate microenvironment for AP differentiation *in vitro* remains to be characterized and/or that potent anti-adipogenic factors were expressed in cells derived from human embryonic stem cells. The reasons of the low adipogenicity compared to cells derived from adult tissues are not yet known. They are likely multiple and will require further investigations. We showed that APs derived from hiPSCs displayed limited adipogenic differentiation, around 20 times less, compared to APs we derived from adult human abdominal fat and to hASCs. Expression of Fatty-Acid Binding Protein 4 (FABP4), an adipocyte-specific gene, could be used to monitor the number of adipocytes in AP differentiated cultures (as shown by comparing Figure 2B and Figure S2C). However, hiPSCs-derived BAPs expressed *UCP1* at similar levels than hASCs induced to undergo differentiation into brite/beige adipocytes [32] (Figure S2D). Therefore, hiPS-derived BAPs expressed much more *UCP1* than hASCs when comparing with a same number of adipocytes by normalizing with expression of *FABP4* (Figure 2C). Higher levels of *UCP1* expression in hiPSC-derived BAPs than in others APs studied, such as in the beige hMADS cell line [33] strongly suggest that the formers were “classical” brown adipocytes. The relative expression of *Hoxc8* and of *Hoxc9* (see below) was also in agreement with a classical brown adipocyte molecular signature of hiPSC-derived BAPs [34].

Pax3 is preferentially expressed in brown adipocyte progenitors derived from hiPSCs
Homemade real-time qPCR arrays (Table S3) were used to characterize a molecular mechanism involved in brown and white AP

identity (Figure 3). From the 118 candidate genes tested, 7 displayed significant differential expression. Differential gene expression analysis revealed that *Hoxc8*, *Hoxc9* and *HoxA5* genes were specific of undifferentiated WAPs, in agreement with previous reports showing that these *Hox* genes are preferentially expressed in white adipose tissues [35, 36]. The very low or absence of *Hoxc9* gene expression in BAPs supported their “classical” brown phenotype [5]. *BMP4* has been shown to play a role in human adipose-derived stem cells proliferation and commitment [37]. However, a differential expression between brown and white APs has never been reported. Our data, combined with those of Qian and colleagues [38] strongly suggest that elevated *BMP4* expression indicates white or beige adipocytes but not the classical brown adipocytes. Interestingly, *Pax3* was enriched in BAPs compared to WAPs (Figure 3A-B) and appeared as a new marker of human brown adipocyte progenitors. Liu et al. recently performed lineage tracing using *Pax3*-cre mice. They analyzed white adipose tissue depots and they show that non-*Pax3* lineage contributes preferentially to beige adipocytes [39]. Previously the same authors showed that classical brown adipocytes derived from *Pax3* lineage [40]. Altogether these data strongly suggest that *Pax3* could play a role in brown and white adipocyte lineage specification. This hypothesis prompted us to investigate *Pax3* expression in humans and to determine whether this transcription factor could play a functional role in human AP phenotype.

***Pax3* is preferentially expressed in human brown adipocyte tissues**

In contrast to mouse, human BAT represents a minor fraction of adipose tissue, is scattered throughout the body and disappears from most areas with age, persisting only around deeper organs. Perirenal fat is one of the sites where brown-like adipocytes have been found most frequently (see for review [41]). Therefore, we investigated *Pax3* expression in human perirenal adipose tissue samples expressing *UCP1* at a low (hBAT-) or a higher (hBAT+) level. *Pax3* expression was 2.7-fold higher in BAT-positive than BAT-negative samples (see

Figure S3A). However, this difference was at the limit of significance ($P=0.053$). We hypothesized that there might be a link between *Pax3* and hBAT but, as *Pax3* labels brown-like adipocyte progenitors, which are scarce in WAT, its expression was too weak to be detected *in vivo*. More recently, the deep fat of adult neck has been shown to be enriched in classical brown adipose tissue, whereas the most peripheral adipose tissue being white [35]. Therefore, subcutaneous and prevertebral neck fat tissues, as well as knee white fat depot, were collected from three postmortem subjects and differential *Pax3* expression was investigated. *FABP4* expression, used to monitor adiposity of each sample, was around 5 times higher in superficial than in deep depots (Fig.3C). Although variability among individuals in terms of *FABP4*, *Pax3* and *UCP1* expression (Figure S3B), *Pax3* was highly expressed and more in brown fat depot than in white fat depots (Figure 3C). As the postmortem samples were obtained from elderly subjects, it would be interesting to investigate the age-dependent effect on *Pax3* expression levels. Finally, *Pax3* expression was analyzed in mouse fat. *Pax3* expression was detectable in interscapular brown adipose tissue (mBAT, real-time PCR CT values, 29-32), whereas was very low or undetectable in white epididymal fat (mWAT, real-time PCR CT values, 33-36) (Figure 3D). Overall, these data support a model in which *Pax3* labels brown adipose tissues.

Ectopic expression of *Pax3* converts human white into brown adipocyte progenitors

A functional role of *Pax3* was then investigated both in hiPSC-derived APs and in hASCs. For that purpose, hASC cells were transduced with a retroviral vector expressing *Pax3* [42] and the impact on adipocyte phenotype has been analyzed. *Pax3* overexpression did not change significantly the level of hASC adipocyte differentiation as indicated by Oil Red O staining for triglycerides and levels of *FABP4* and *PPAR γ* expression (Fig.4A-B). In contrast, *Pax3* overexpression promoted expression of *UCP1* and *Dio2* brown adipocyte genes. Repression of *Pax3* transcriptional targets using a dominant-negative form of *Pax3* led to inhibit *UCP1* and *Dio2* gene expression as well

as expression of *FABP4* and *PPAR γ* . Induction of brown adipogenic gene expression was also observed when hiPSC-derived WAPs were transduced with the retrovirus vector expressing Pax3, then induced to undergo differentiation (Figure 4C). In contrast to *UCP1*, expression of *Dio2*, *PRDM16* and *BMP4* was dramatically increased in undifferentiated WAPs overexpressing Pax3 before adipogenic induction (Figure 4D). As these three factors are known to play a critical role in brown adipogenesis [1, 38], it is tempting to propose that they mediate Pax3 browning effects. Together these data indicate that *Pax3* plays a critical role in brown adipogenic differentiation and is able to confer a brown phenotype to white APs derived both from embryonic-like cells and from post-natal fat tissues.

CONCLUSIONS

The major conclusions of this study (schematically presented in Figure S4) are that brown and white adipocytes derive from different progenitors during *in vitro* development of hiPSCs. Lineage tracing in mouse previously showed that brown adipocytes, but not white adipocytes, originated from ancestor *Pax3/Myf5*-myogenic progenitors [40, 43, 44]. However, new transgenic animal models recently published suggest that this vision requires to be revisited (for recent review see [45]) and it has yet to be demonstrated that human brown APs and muscle cells could have a common progenitor. We failed to detect *Myf5* gene expression in hiPSC-derived BAPs (not shown), suggesting

that subsets of brown adipocytes could derive from different lineages in humans.

Pax3 plays a functional role in white versus brown adipocytes phenotype acquisition. This finding opens the opportunity to investigate the developmental origins of human brown adipocytes. Indeed, while the mesoderm has long been considered the only source of adipocytes, others and we have shown that subsets of white adipocytes derived from neural crest in mice [25, 46, 47]. Pax3 has been largely described as a regulator of the generation of skeletal myocyte progenitors from developing dermomyotomes, but Pax3 is also associated with early neural crest development in humans [48, 49]. Therefore, enriched expression of Pax3 in human brown APs could thus mark their neural crest origin and not the myogenic lineage origin.

The findings of the present study could lead to new anti-obesity therapies based on the recruitment of APs and constitute a platform for investigating *in vitro* the embryonic origins of human white and brown APs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all members of the “Stem Cells and Differentiation” team for helpful discussions. This work was supported in part by the Fondation ARC (grant 6554), ANR (grant 2010-RFCS-007-01 and T. M-K PhD fellowship) and the Swedish federal government under the LUA/ALF agreement. The authors state that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Seale P, Kajimura S, Yang W, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* Jul 2007;6(1):38-54.
2. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Aug 2007;293(2):E444-452.
3. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* Apr 9 2009;360(15):1518-1525.
4. Cousin B, Cinti S, Morroni M, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* Dec 1992;103 (Pt 4):931-942.
5. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* Mar 5 2010;285(10):7153-7164.

6. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. Jul 20 2012;150(2):366-376.
7. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. Jun 2013;15(6):659-667.
8. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. May 19 2009.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30 2007;131(5):861-872.
10. Taura D, Noguchi M, Sone M, et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett*. Mar 18 2009;583(6):1029-1033.
11. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, et al. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. Jun 10 2013.
12. Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, et al. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol*. Jan 15 2012.
13. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, et al. Production of Functional Classical Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells using Specific Hemopoietin Cocktail without Gene Transfer. *Cell Metab*. Sep 5 2012;16(3):394-406.
14. Sun Y, Pollard S, Conti L, et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci*. Jun 2008;38(2):245-258.
15. Guo G, Yang J, Nichols J, et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. Apr 2009;136(7):1063-1069.
16. Nolden L, Edenhofer F, Peitz M, Brustle O. Stem cell engineering using transducible Cre recombinase. *Methods Mol Med*. 2007;140:17-32.
17. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med*. May 2, 2005 2005;201(9):1397-1405.
18. Dani C, Smith A, Dessolin S, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci*. 1997;110(11):1279-1285.
19. Wdziekonski B, Villageois P, Dani C. Development of adipocytes from differentiated ES cells. *Methods Enzymol*. 2003;365:268-277.
20. Brown SE, Tong W, Krebsbach PH. The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):256-260.
21. Bagnis C, Bailly P, Chapel-Fernandes S. Using an EGFPmeter to evaluate the lentiviral vector production: tricks and traps. *Methods Mol Biol*. 2009;515:151-163.
22. Wdziekonski B, Villageois P, Dani C. Differentiation of mouse embryonic stem cells and of human adult stem cells into adipocytes. *Curr Protoc Cell Biol*. Mar 2007;Chapter 23:Unit 23 24.
23. Sugii S, Kida Y, Kawamura T, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 23 2010;107(8):3558-3563.
24. Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone*. May 2005;36(5):758-769.
25. Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, et al. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. Jun 2007;134(12):2283-2292.
26. Li N, Kelsh RN, Croucher P, Roehl HH. Regulation of neural crest cell fate by the retinoic acid and Pparg signalling pathways. *Development*. Feb 2010;137(3):389-394.
27. Mercader J, Palou A, Bonet ML. Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity (Silver Spring)*. Apr 2010;18(4):655-662.
28. Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Villageois P, Chignon-Sicard B, Dani C. Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 18 2012;430(3):871-875.
29. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. Feb 2006;24(2):376-385.
30. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. Nov 2006;24(11):2412-2419.
31. Chen YS, Pelekanos RA, Ellis RL, Horne R, Wolvetang EJ, Fisk NM. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. Feb 2012;1(2):83-95.
32. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, et al. Human Multipotent Adipose-derived Stem Cells Differentiate into Functional Brown Adipocytes. *Stem Cells*. Aug 20 2009.
33. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:87.
34. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jan 1 2012;302(1):E19-31.
35. Cypess AM, White AP, Vernochet C, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med*. May 2013;19(5):635-639.
36. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of

- adult humans. *Cell Metab.* May 7 2013;17(5):798-805.
37. Vicente Lopez MA, Vazquez Garcia MN, Entrena A, et al. Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem Cells Dev.* Jun 2010;20(6):1011-1019.
 38. Qian SW, Tang Y, Li X, et al. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 26 2013;110(9):E798-807.
 39. Liu W, Shan T, Yang X, et al. Heterogeneous lineage origin underlies phenotypic and molecular differences of white and beige adipocytes. *J Cell Sci.* Jun 18 2013.
 40. Liu W, Liu Y, Lai X, Kuang S. Intramuscular adipose is derived from a non-Pax3 lineage and required for efficient regeneration of skeletal muscles. *Dev Biol.* Jan 1 2011;361(1):27-38.
 41. Enerback S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab.* Apr 7 2010;11(4):248-252.
 42. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, et al. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One.* 2009;4(2):e4475.
 43. Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* Aug 21 2008;454(7207):961-967.
 44. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 13 2007;104(11):4401-4406.
 45. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta.* Jun 4 2013.
 46. Lemos DR, Paylor B, Chang C, Sampaio A, Underhill TM, Rossi FM. Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. *Stem Cells.* Jun 2012;30(6):1152-1162.
 47. Billon N, Dani C. Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies. *Stem Cell Rev.* Mar 2 2011.
 48. Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundstrom E, Garcia-Castro MI. Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol.* Aug 15 2010;344(2):578-592.
 49. Wu M, Li J, Engleka KA, et al. Persistent expression of Pax3 in the neural crest causes cleft palate and defective osteogenesis in mice. *J Clin Invest.* Jun 2008;118(6):2076-2087.

See www.StemCells.com for supporting information available online.

Figure 1. Adipocyte differentiation of hiPSCs and effects of retinoic acid.

A) Experimental scheme with timeline for adipogenic differentiation of human Pluripotent stem cells and derivation of adipocytes progenitors. hiPSC and hES cells were differentiated into embryoid bodies (EBs) and treated or not with RA between days 3 and 6. EBs were plated at day 10 and outgrowths were maintained in proliferative medium until day 20. The adipogenic cocktail was added from days 20 to 30. The hiPSC and hESC clones used are indicated. Fibroblast-like cell populations were derived at day 20 from hiPS-NOK6 and hiPS-10 clones. These populations contained adipocyte progenitors (APs) and were able to differentiate into brown or white adipocytes when maintained in the appropriate medium. (B) RNAs were prepared from undifferentiated hiPSCs corresponding to d0 of differentiation and from 30 day-old outgrowths. Adipogenic gene expression was quantified by real-time PCR. The expression of each gene was taken as 1 in undifferentiated cells. The data shown were obtained from hiPS-NOK6-tat clones. Values are means $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=6$. Similar data were obtained from hiPS-NOK6, hiPS-O27 and hiPS-10 clones. (B) RNAs were isolated from 30 day-old outgrowths treated with 10 μ M forskolin for 4 h and assayed for the indicated RNA levels. The expression of each gene was taken as 1 in untreated outgrowths. Values are means $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, $n=4$. (C) RNAs were prepared from 30 day-old outgrowths generated from hiPSc-derived EBs treated with RA (black box) or not (white box). Gene expression was quantified by real-time PCR. The expression of each gene was taken as 1 in untreated conditions. The data were obtained from hiPS-NOK6-tat and hiPS-10 clones. Values are means $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, $n=4$. See also Figures S1.

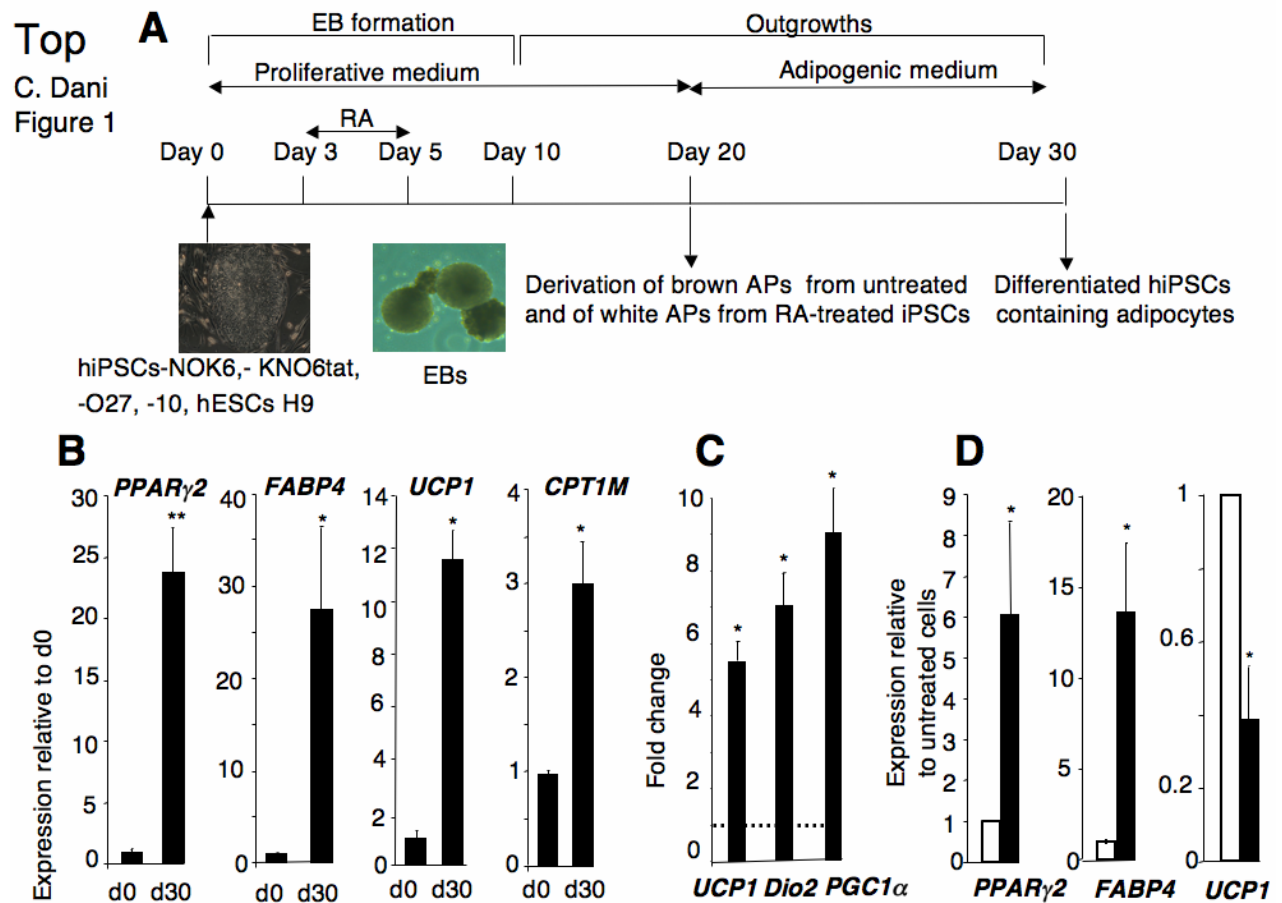


Figure 2. Adipogenic potential of hiPSC-derived APs

(A) APs were induced to undergo adipocyte differentiation and RNAs were prepared 20 days later. The expression of each gene was relative to *TBP* housekeeping gene. Data were obtained with APs derived from hiPS-NOK6 and hiPS-10 clones. Values are means $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=6$. (B) hASCs derived from young donors (hMADS cells) and adipocyte progenitors isolated from the stromal vascular fraction of adult abdominal fat (Abd.) were induced to undergo differentiation in the same culture conditions as hiPSC-derived APs. Levels of differentiation were monitored using *FABP4* gene expression. (C) Cells were induced to undergo differentiation as in (B) and expression of *UCP1* was quantified then normalized with *FABP4* expression. See also Figure S2.

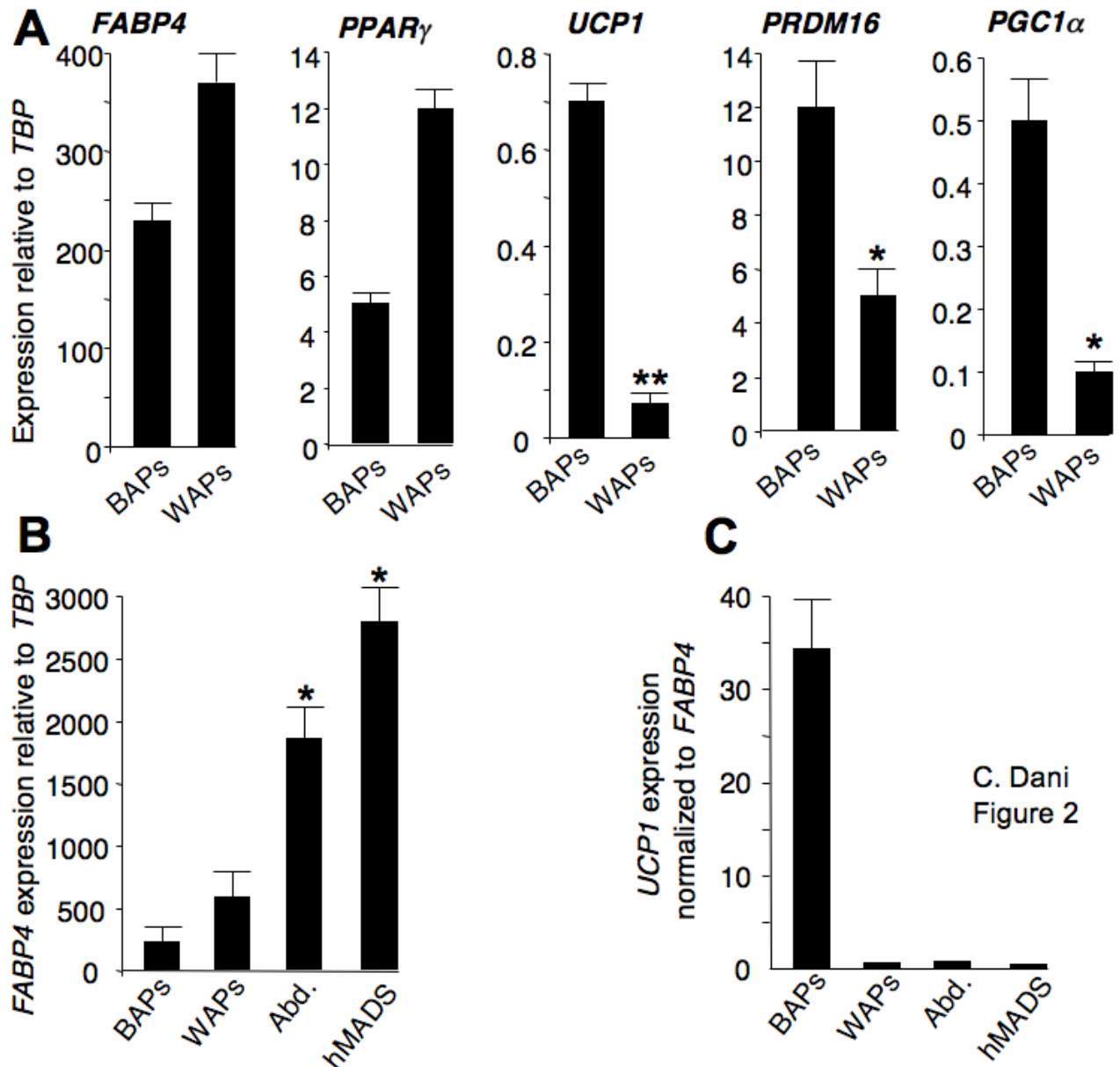


Figure 3. Pax3 expression in progenitors and adipose tissues.

(A) RNAs were prepared from undifferentiated brown (BAP) and white (WAP) adipocyte progenitors derived from hiPS cells and the ratio of indicated gene expression is shown. Values are means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$, $n = 6$. Similar results were obtained with APs derived from hiPS-Nok6 and hiPS-10 clones. (B) Immunostaining of APs with Pax3. Undifferentiated BAPs and WAPs were paraformaldehyde-fixed and stained with anti-Pax3 antibody and DAPI. (C) Expression of *Pax3* in postmortem human neck brown fat. Superficial and deep fat samples were collected from the neck of 3 postmortem subjects. RNAs were prepared and expression of *FABP4* was quantified in both depots. Then, *UCP1* and *Pax3* was quantified and normalized with *FABP4* expression. Expression in knee fat was used as an addition control of white fat depot. Data are represented as mean and error bars represent SEM. Each sample fat depot of the three subjects was analyzed twice by real-time PCR with technical duplicate. (D) *Pax3* expression in mouse adipose tissues. RNAs were prepared from brown fat and white epididymal fat and *Pax3* expression was analyzed. Values are means $\pm$ SEM. *** $P < 0.0001$, $n = 12$. See also Figure S3, tables S2 and S3.

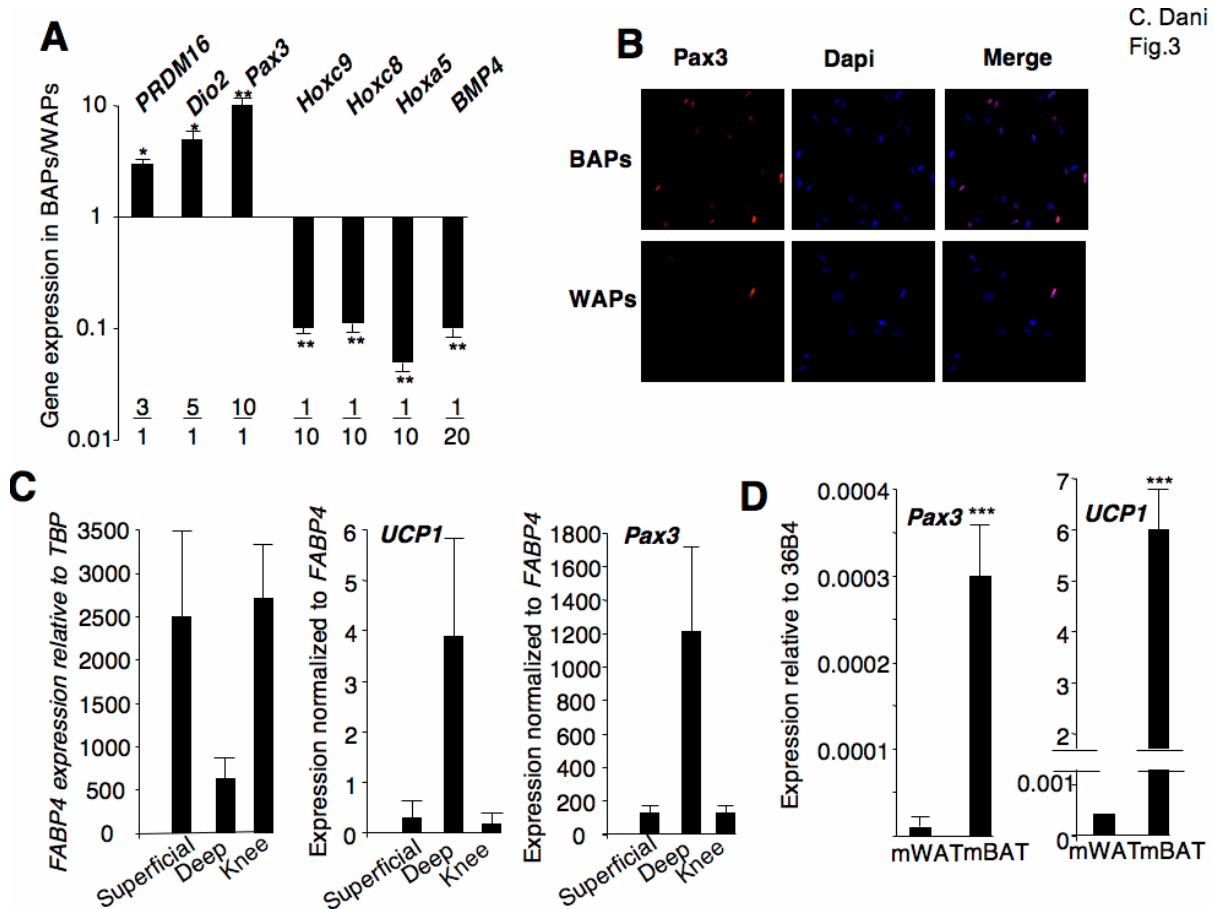
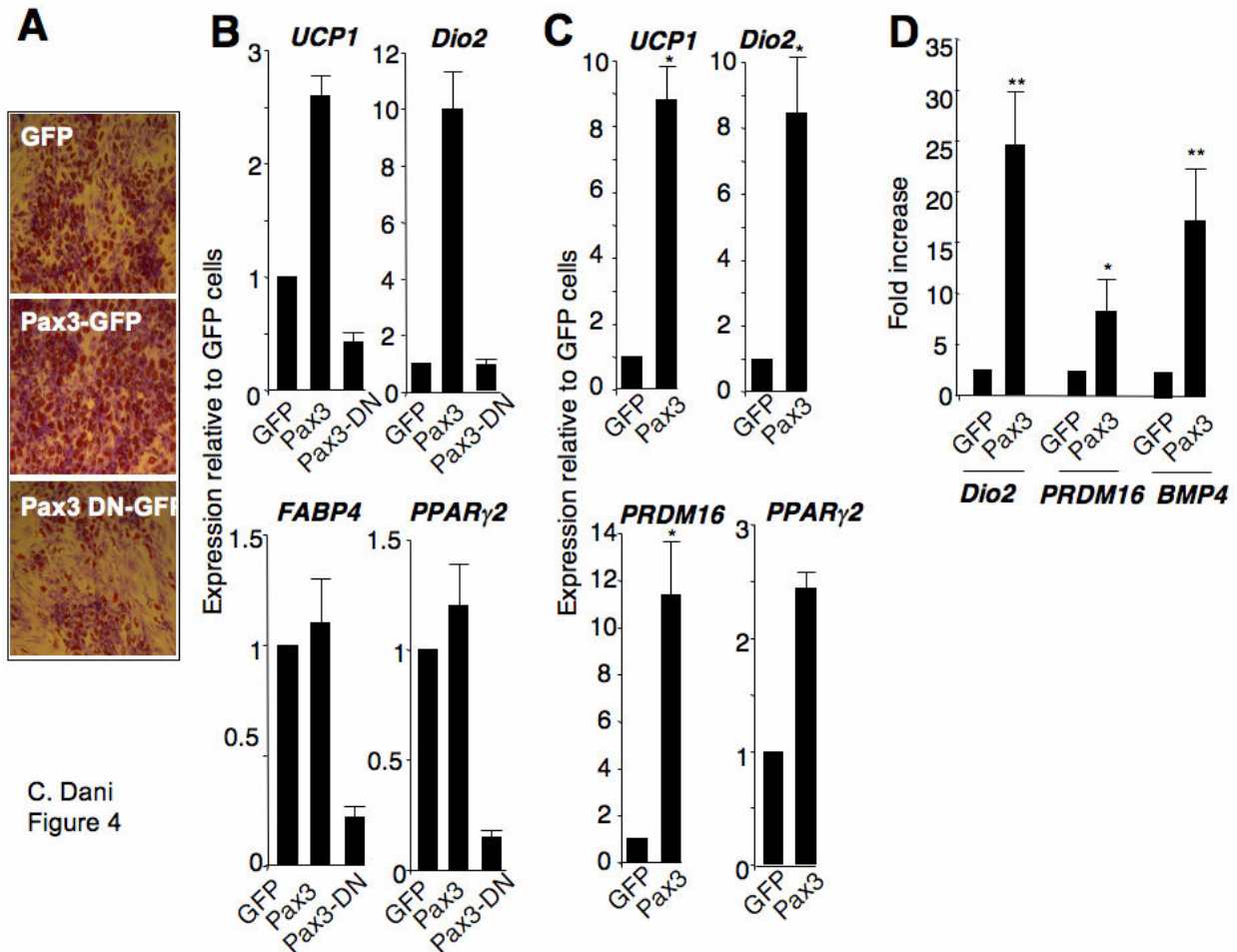


Figure 4. Effects of Pax3 on the adipocyte progenitor phenotype.

(A) hASCs were transduced with a retrovirus vector expressing *gfp*, Pax3 or a dominant negative (DN) form of Pax3 then induced to undergo differentiation. Cells were stained with Oil red O for lipid droplets 10 days after. Image magnification x20 (B) RNAs were prepared 10 days after differentiation. Values are means of two experiments. (C) White APs derived from hiPS cells were transduced with a retroviral vector expressing Pax3-GFP or GFP then induced to undergo differentiation. RNAs were prepared 10 days after. Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, $n = 3$. D) White APs derived from hiPS cells were transduced with a retroviral vector expressing Pax3-GFP or GFP and RNAs were prepared before induction of differentiation. Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$.



Supplementary Information:

Extended Supplemental figures titles and legends

Figure S1: Adipocyte quantification by FACS analysis and effects of RA and of SB431542 treatments. See also Figure 1. Cells were induced to undergo differentiation in the absence (A) or presence of RA (B) or SB431542 (C) from days 3 to 6. Cells were stained at day 30 with Lipidtox, for triglyceride staining, and adipocytes were quantified by flow cytometry. Lipidtox staining and granularity parameters have been previously described ¹. To increase the adipocyte detection specificity, cells were co-labelled for CD73, a cell surface marker expressed by APs and mature adipocytes ². A) Blue line: hiPSCs at day 0 of differentiation; red line: differentiated cells. B) Red line: differentiated cells with no RA; green line: differentiated cells with RA pre-treatment. C) Red line: differentiated cells with no SB431542; green line: differentiated cells with SB 431542 pre-treatment. The number of Lipidtox⁺/CD73⁺ cells represented 2%±0.3; 5%±1 and 15%±3 (n=3 hiPS clones) in A), B) and C) respectively. D) Differentiation of hES cells pretreated or not with RA. hESCs were induced to undergo adipocyte differentiation, as described for hiPSC differentiation. RNAs were prepared at day 30 from outgrowths generated from hESc-derived EBs treated with RA (black box) or not (white box). Gene expression was quantified by real-time PCR. The expression of each gene was taken as 1 in untreated conditions.

Figure S2: Adipocyte differentiation of hiPSCs-derived APs and of hASCs. See also Figure 2. A) Clonogenicity of WAPs and BAPs. Cells were plated at low density (18 cells/cm²) and maintained in proliferative medium for 10 days before staining. Experiments were performed at two cell passages. B) Proteins were prepared from differentiated BAPs and WAPs and expression of indicating proteins were analyzed by Western blotting. Anti-UCP1

antibody was from Calbiochem (cat No 662045), dilution 1:500; Anti-tubulin from Hybridoma Bank, dilution 1:5000. C) Photomicrographic records of differentiated cultures of APs derived from 20 day-old outgrowths (upper panel) and hASCS (previously named hMADS cells (lower panel). D) Cells were induced to undergo differentiation in the same culture condition and *UCPI* gene expression was analyzed. Values are means $\pm$ SEM. * $P<0.05$, $n=3$. ns: non significant.

Figure S3: Expression of *Pax3* in perirenal adipose tissue samples and in postmortem human neck brown fat. See also Figure 3. A) Expression of *Pax3* in human BAT containing perirenal adipose tissue samples. *Pax3* expression levels were determined in 10 BAT-positive samples (hBAT+) and 10 BAT-negative samples (hBAT). *Pax3* expression was normalized to *TBP* expression and presented as relative expression and SEM. B) RNAs were prepared from superficial and deep fats of human neck of three subjects. Expression of indicated gene was quantified by real-time PCR and normalized *TBP*.

Figure S4: Summary scheme of adipocyte progenitor generation and role of *Pax3*.

Supplemented tables

Table S1: Molecules used to activate or inhibit relevant signalling pathways.

Table S2: hiPS-derived APs express mesenchymal cell surface markers. See also Figure 3
10⁶ differentiated iPS cells were incubated with HSC LipidTox Deep Red (Invitrogen, H34477), a neutral lipid stain and with CD73 PE antibody for 15 min at room temperature. Adipocytes were gated as previously described¹⁶ and the data were analysed after collecting 50 000 events using Cellquest acquisition software (BD Biosciences). Cell surface antigens for APs and iPS cells were analysed by FACS of living cells. 25x10⁴ APs were incubated

with each of the indicated conjugated human specific monoclonal antibodies. Nonspecific fluorescence was determined by incubation of similar cell aliquots with isotype-matched mouse monoclonal antibodies (BD Pharmingen). The data were analysed after collecting 10^4 events using a FACSCalibur flow cytometer with Cellquest acquisition software (BD Biosciences). Table showing the results of flow cytometry analysis of APs derived from hiPS-NOK6 and hiPS clone 10. Numbers represent the percentage of positive cells. Human ASCs (previously named hMADS) cells) were used as positive control, and undifferentiated pluripotent hiPS-NOK6 cells as negative control.

Table S3: List of genes analyzed by real-time PCR for differential expression in brown and white APs. See also Figure 3. We investigated expression of genes described for playing a role in stem cell self-renewal or reported to be express during adipocyte development.

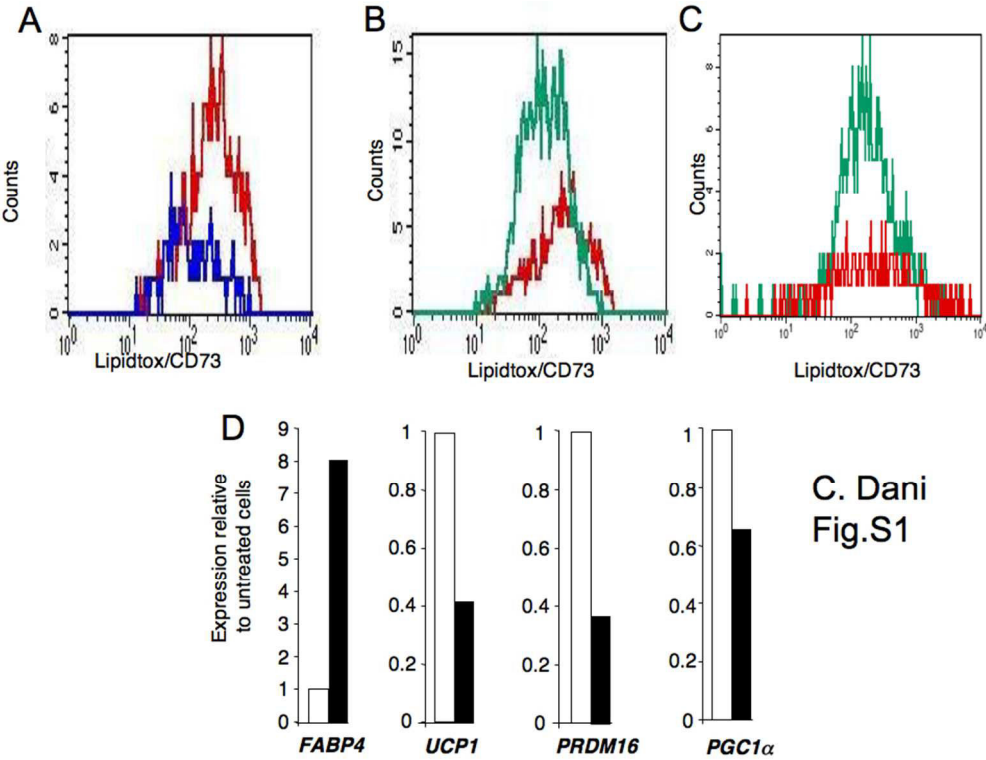
Table S4 : Real-time RT-PCR primer sequences

Regulation of *Dio2*, *PRDM16* and *BMP4* by Pax3 in undifferentiated APs.

WAPs were transduced with Pax3 or GFP retrovirus vectors and expression of the indicated genes was analyzed by real-time PCR. Data are the means of two experiments.

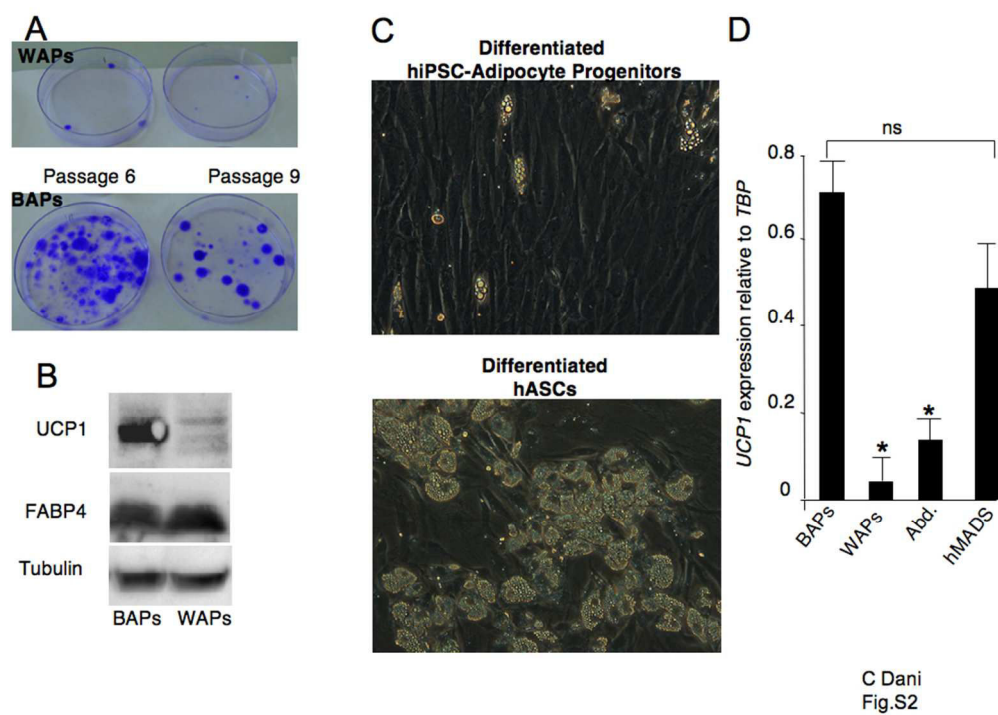
Supplemental references

1. Schaedlich K, Knelangen JM, Navarrete Santos A, Fischer B, Navarrete Santos A. A simple method to sort ESC-derived adipocytes. *Cytometry A*. Oct 2010;77(10):990-995.
2. Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Villageois P, Chignon-Sicard B, Dani C. Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 18 2012;430(3):871-875.



C. Dani
Fig.S1

339x261mm (72 x 72 DPI)



349x256mm (72 x 72 DPI)

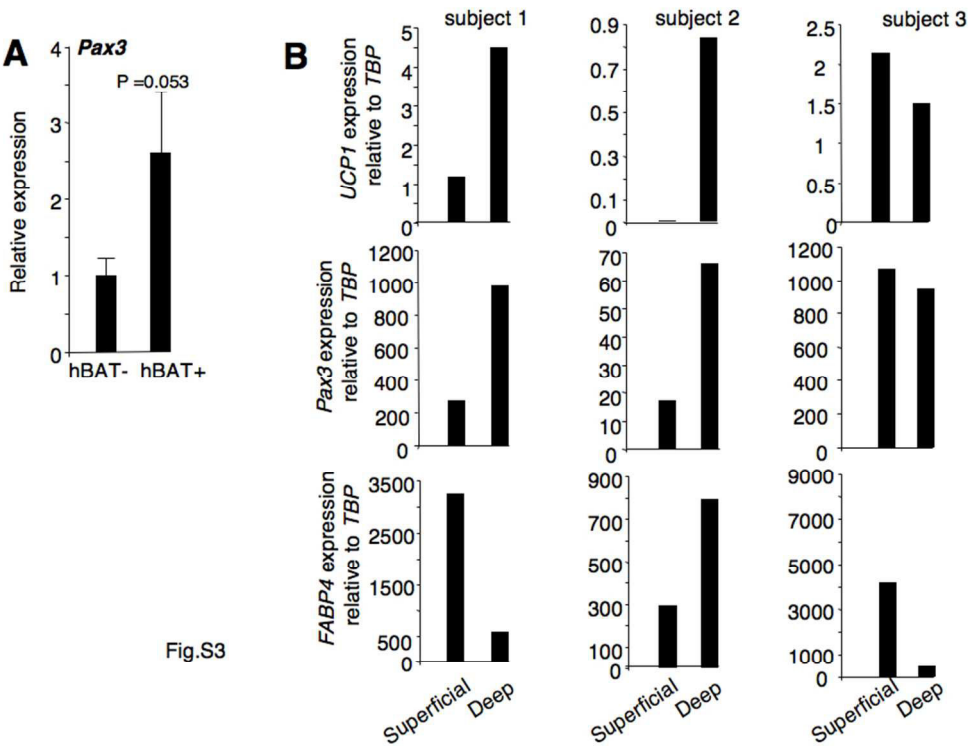


Fig.S3

325x246mm (72 x 72 DPI)

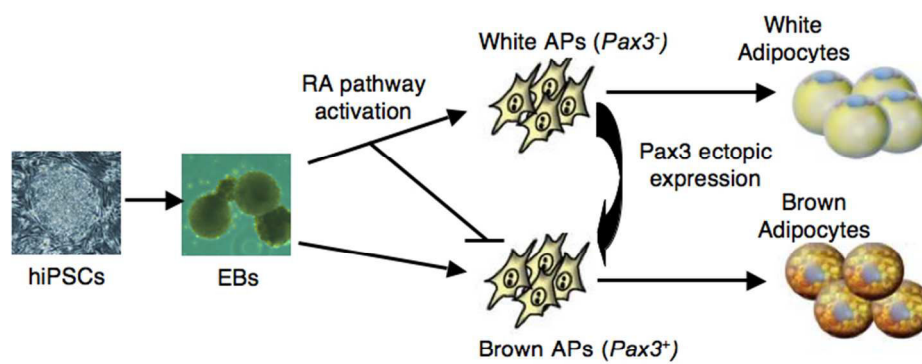


Fig.S4

297x171mm (72 x 72 DPI)

Table S1: Molecules used to activate or inhibit relevant signalling pathways.

Compound	Concentration	Effect on signalling pathways
Retinoic Acid	1 μ M	RA activation
SB431542	5 μ M	TGF β inhibition
Bio	5 μ M	Wnt activation
U0123	10 μ M	ERK inhibition
Purmorphamine	2 μ M	Hedgehog activation
Cyclopamine	5 μ M	Hedgehog inhibition
SB20350	5 μ M	P38 MAPK inhibition

hiPS cells were induced to form embryoid bodies and then were treated between days 3 and 6 with the molecules at the indicated concentration. The consequences, if any, on generation of adipocytes were assessed by microscopic visualisation at day 30.

Markers	hASCs	Undifferentiated hiPS cells	BAPs		WAPs	
			NOK6	10	NOK6	10
CD90	97	91	100	95	100	88
CD105	72	0	95	85	79	63
CD31	0	0	0	0	0	0
CD146	42	nd	80	40	94	73
CD45	0	0	0	0	0	0
CD73	100	3	100	100	100	100

Table S2

306x160mm (72 x 72 DPI)

Self-renewal genes		Adipogenic genes	
Oct3/4	RUNX2	CEBPA	HOXA5
Rex1	BMP1	CEBPB	PRDM16
CD29	BMP2	CEBPD	PGC1a
CD30	BMP3	PPARa	DIO2
CD34	BMP4	PPARd	PPARG
CD44	BMP5	CREB	CPT1M
CD49b	BMP6	RXRa	
CD71	BMP7	FRX	
CD90	BMP8	SREBP	
CD105	BMP9	ACLP	
CD106	BMP10	PREF1	
CD120a	BMPR1A	GPDH	
CD124		aFABP	
CD133		FABP5	
c-kit		A2COL6	
SCF		GLUT 4	
BMI1		GCCR	
STRO1		IP-R	
NESTIN		ADRB1	
AFP		ADRB2	
Brachyury		ADRB3	
TDGF-1		UCP1	
PAX6		UCP2	
PAX3		UCP3	
TERT		AGT	
TEP1		LEP	
TERF1		PTX3	
SHH		DIPA	
PTCH		HP	
PTCH2		PAI	
BCRP1		IL6	
LIF		PLIN	
LIFR		RETN	
NODAL		TNF	
UTF1		ACDC	
LEFTYA		Adipsin	
FOXD3		CD36	
FOXG1		LPL	
FOXH1		FASN	
FOXM1		HSL	
NOTCH1		PEPCK	
NOTCH2		GATA2	
NOTCH3		GATA3	
NOTCH4		Id1	
SOX2		Id2	
SOX4		Id3	
SOX5		Id4	
SOX6		FOXO1	
SOX8		HOXC8	
BMPR1B		HOX9	

Table S3. Real-Time RT-PCR Primer Sequences

hPPAR γ 2

AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA
TCCGGAAGAAACCCTTGCA

hFABP4

GGGACGTTGACCTGGACTGA
GGGAGAAAATTACTTGCTTGCTAAA

hUCP1

GTGTGCCCAACTGTGCAATG
CCAGGATCCAAGTCGCAAGA

hCPT1-M

GAGCAGCACCCCAATCAC
AACTCCATAGCCATCATCTGCT

hDIO2

GTCAGTGGTCAGCGTGGTTTT
TTCTTCACATCCCCCAATCCT

hPGC1 α

CTGTGTCACCACCCAAATCCTTAT
TGTGTCGAGAAAAGGACCTTGA

hPAX3

ACACCGTGCCGTCAGTGAGT
TCGCTTTCCTCTGCCTCCTT

hBMP 4

CCTGTTGTGTGCCCACTGAAC
ATCTCAGCGGCACCCACAT

hPRDM16

GAAACTTTATTGCCAATAGTGAGATGA
CCGTCCACGATCTGCATGT

hCD137

AGCTGTTACAACATAGTAGCCAC
TCCTGCAATGATCTTGCCTCT

mUCP1

CACCTTCCCGCTGGACACT
CCTGGCCTTCACCTTGAT

mPax3 (variant1)

ACCTCTTGCTTGAGAACGGG
TTACACAAGGGAGCCTGTGC

mPax3 (variant2)

CAGTATGGACAAAGTGCCTTTCA
TAGTCTGTGGAGGCCGAAA

RESUME

TITRE : Effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains et Analyse moléculaire du Tissu Adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique.

Différents domaines en Chirurgie Plastique et Esthétique ont évolué au cours de ces dernières années et notamment le transfert et injection de Tissu Adipeux autologue. Les premières données cliniques ont été présentées sans véritable appui scientifique. Cette thèse a pour objet de confirmer les données cliniques retrouvées et de permettre d'améliorer cette technique par des preuves scientifiques.

Deux questions sont à considérer :

- 1) Le tissu adipeux a-t-il selon son origine anatomique des caractéristiques différentes et certaines régions seraient-elles à privilégier lors d'une autogreffe ?
- 2) Existe-t-il des facteurs de croissances autologues permettant de stimuler la prise de greffe, la prolifération et la différenciation des cellules greffées ?

La première partie de ce travail a consisté à analyser le tissu adipeux en fonction du site de prélèvement. A cet effet, nous avons analysé le tissu adipeux provenant de 2 sites anatomiques : le genou et le menton. Le choix topographique découle d'une raison technique et d'une raison théorique. Nos résultats suggèrent que les deux sites étudiés ont des origines embryonnaires différentes, et montrent que ces deux sites présentent une signature moléculaire et une fonctionnalité différentes.

La seconde partie porte sur l'effet *in vitro* de facteurs de croissances autologues humains. Nous avons analysé la prolifération et la différenciation de cellules souches adipogéniques (ASCs) humaines. Nous avons pour cela utilisé des concentrés plaquettaires issus de prélèvements sanguins autologues, et donc utilisables en pratique thérapeutique humaine. Il s'agit du PRF (plaquette riche en fibrine) et du PRP (plaquette riche en plasma). Les résultats de l'étude montrent que la présence de PRF ou de PRP dans le milieu de culture permet une augmentation drastique de la prolifération cellulaire d'environ 4 à 5 fois. A contrario, les résultats obtenus montrent un blocage partiel de la différenciation adipocytaire, quelque soit le moment et le temps de mise en contact. Nous avons alors étudié par quelle voie de blocage la différenciation était induit et avons montré l'implication de la voie du TGFB qui dans ces conditions de culture induit un blocage partiel de la différenciation des ASCs vers un adipocyte mature. Notre étude montre qu'en parallèle à l'effet antiadipogénique, la différenciation s'oriente vers des cellules myofibroblastes-like. Nous avons alors testé l'effet de l'ajout d'un inhibiteur du TGFB (SB431542) dans le milieu de culture et avons observé une relance de la différenciation cellulaire vers la voie adipogénique confirmant que le PRP a un effet antiadipogénique et promyofibroblastique. Par ailleurs, nous avons analysé la composition du PRP utilisé en dosant les taux de facteurs de croissance présents.

En conclusion, ce travail permet de confirmer l'augmentation de la prolifération cellulaire des ASCs en présence de PRP autologue. Ceci nous permet donc une transposition clinique immédiate en utilisant en peropératoire l'association PRP et prélèvement de tissu adipeux lors d'un lipofilling. Ce travail permet également de mettre en lumière la probable différence de fonction des adipocytes prélevés en fonction de leur site anatomique d'origine. Ceci a probablement une conséquence sur l'évolution long terme de ces greffes de tissu adipeux en fonction d'une modification pondérale.