

Comparaison de trois méthodes de préparation de greffe adipocytaire : séparation par gravité, centrifugation et système PureGraft™ 250/PURE de Cytori

MOTIF :

La greffe adipocytaire autologue est de plus en plus utilisée dans diverses applications cliniques¹⁻³. Les médecins savent que la prise à long terme d'une greffe dépend de la technique utilisée pour préparer le tissu⁴. Chacune de ces techniques a entre-autres pour objectif d'éliminer les contaminants, notamment le lipide libre libéré par les adipocytes rompus, les hématies et les leucocytes, qui nuisent à la prise de la greffe et exacerbent la réaction inflammatoire. Ces techniques servent en outre à éliminer l'excès de liquide tumescent qui ne fait que diluer le tissu de la greffe. Les médecins ont donc besoin de techniques qui éliminent les contaminants indésirables et réduisent le taux de composant liquide aqueux de la greffe, tout en maintenant les caractéristiques de manipulation souhaitées (par ex. la viscosité).

Les trois principales techniques de préparation décrites dans la littérature sont la séparation par gravité seule (qui nécessite le moins de traitement et de manipulation de la part de l'utilisateur), la centrifugation et le lavage de la greffe adipocytaire avant la séparation par gravité⁴. Chacune de ces méthodes possède ses propres avantages et inconvénients en termes de complexité, de temps de préparation de la greffe et de taux résiduel de contaminants et de liquide aqueux. Dans la présente étude, nous avons établi une comparaison côte-à-côte du lavage d'une greffe avec le système Cytori PureGraft™, la centrifugation et la séparation par gravité. Le taux de lipide libre, de liquide aqueux et de cellules sanguines a été étudié.

MÉTHODES:

Du tissu adipeux provenant de 14 donateurs de sexe féminin a été prélevé dans des dépôts de tissu adipeux sous-cutanés de l'abdomen, du flanc, de la cuisse et du dos par aspiration assistée par dépression (n=7), « liposculpture » au laser (n=5) et liposuccion à l'eau (n=2). Le tissu de chaque donneur a été divisé en quatre groupes traités selon différentes méthodes : contrôle (équivalent à un chirurgien qui aspire le tissu et l'utilise immédiatement pour l'auto-greffe), séparation par gravité, centrifugation classique et lavage dans un système PureGraft™. Les échantillons de contrôle ont été analysés sans manipulation complémentaire. Les échantillons traités par séparation par gravité ont été conservés dans une seringue de 60 mL pendant 10 minutes, puis l'infrangeant (principalement composé de solution tumescente et de sang) a été retiré avant de poursuivre le test. Les échantillons traités par centrifugation ont été chargés dans une seringue de 10 mL fermée, placée dans une centrifugeuse à rotor à angle fixe IEC et centrifugée à 3 000 tr/min (-1 200 x g) pendant 3 minutes. Le lipide libre flottant au-dessus du tissu adipeux a été retiré par aspiration et l'infrangeant a été drainé. Les échantillons PureGraft™ ont été préparés à l'aide du système PureGraft™ de Cytori, avec deux étapes de lavage.

Chaque échantillon de greffe préparé possédait quatre composants : tissu adipeux, liquide aqueux (solution tumescente résiduelle ou solution de lavage), lipide libre libéré par les adipocytes rompus ou la lipolyse adipocytaire et un composant non flottant composé de cellules sanguines et de

fragments de tissu. Afin d'évaluer l'apport de chaque composant au volume total de la greffe, trois échantillons de 10 mL ont été préparés pour chaque groupe de chaque donneur. Le tissu a été transféré dans des tubes de centrifugation (Falcon) de 15 mL, puis traités par centrifugation à 400 x g pendant 5 minutes à température ambiante afin de séparer la greffe en quatre composants. Le volume de chaque composant a été déterminé et consigné sous forme de pourcentage de la greffe entière. Le culot cellulaire a ensuite été récupéré, puis remis en suspension pour permettre la quantification des leucocytes à l'aide d'un analyseur d'hématologie Coulter (Beckman Coulter modèle AC.T10). La moyenne des résultats de la numération cellulaire a été calculée et exprimée sous forme de pourcentage du groupe de contrôle, sur la base de cellules par gramme de greffe. Les données ont ensuite été étudiées par analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification afin de déterminer les différences entre les quatre méthodes de préparation de la greffe. Des échantillons de chaque groupe ont également été répartis sur une lame de microscope, puis examinés à la recherche de contaminants tels que du lipide libre et des cellules sanguines.

RÉSULTATS:

Apparence de la greffe : Des exemples représentatifs de greffes préparées selon chacune des quatre méthodes sont présentés dans **Illustration 1**. L'apparence du tissu indique que les greffes préparées avec le produit PureGraft™ présentent le moins de contamination par les hématies. Cette observation est soutenue par

la taille du culot cellulaire obtenu suite à la centrifugation de chaque greffe (**Illustration 2**).

HISTOLOGIE:

Des aliquotes de tissu de greffe, préparées selon chaque méthode, ont également fait l'objet d'analyses au microscope. Des photos représentatives sont proposées dans l'**illustration**



Illustration 1. Tissu de greffe préparé selon différentes méthodes. Cette illustration présente des exemples de greffes préparés par (de gauche à droite) : contrôle, séparation par gravité, centrifugation et préparation PureGraft™ de Cytori.

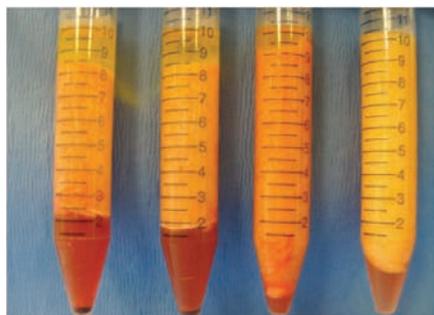
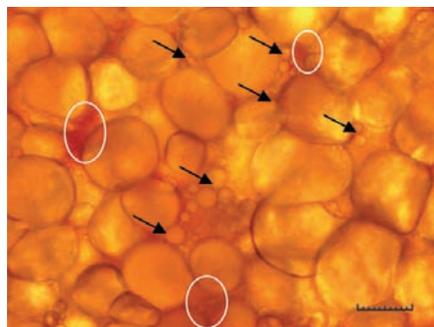


Illustration 2. Tissu de greffe préparé selon différentes méthodes. Cette illustration présente des exemples de greffes préparés par (de gauche à droite) : contrôle, séparation par gravité, centrifugation et préparation PureGraft™ de Cytori. Cette photo a été prise après la centrifugation finale à 400 g a séparé les greffes préparées en quatre composants : culot cellulaire (au fond), liquide aqueux, tissu adipeux et lipide libre (en haut).



3. Ces images ont en outre confirmé l'apparence que nous avons observée de la greffe. De minuscules gouttelettes de graisse et de cellules sanguines ont été observées dans les greffes préparées par le système PureGraft™, alors que des quantités visibles de petites particules lipidiques et d'hématies ont été constatées dans celles préparées selon les autres méthodes.

TAUX DE LIQUIDE AQUEUX:

Le taux de liquide aqueux des greffes préparées selon les différentes méthodes peuvent être observés pour un échantillon représentatif dans l'**illustration 2**. Les données chiffrées de tous les échantillons sont présentées sous forme de pourcentage moyen de la greffe entière dans le **tableau 1**. Par rapport aux échantillons de contrôle bruts ($33,21 \pm 1,8 \%$), et aux échantillons préparés par séparation par gravité ($24,5 \pm 1,4 \%$), les tissus de greffe préparés par centrifugation et PureGraft™ contenaient significativement moins de liquide ($p < 0,001$ pour toutes les comparaisons). Le taux moyen de liquide contenu dans le tissu préparé à l'aide de PureGraft™ était de $8,1 \pm 0,9 \%$, ce qui est comparable à celui du tissu de greffe préparé par centrifugation ($5,2 \pm 0,5 \%$). En outre, le taux de liquide des greffes préparées par le système PureGraft™ peut être ajusté sur une plage plus large (de 2,67 % à 20 %) selon le temps et les techniques de drainage utilisées (active ou passive). Le médecin peut ainsi contrôler la viscosité de la greffe et sa consistance souhaitée.

TAUX DE LIPIDE LIBRE:

La quantité de lipide libre présent dans le tissu de greffe indique directement que la destruction de la cellule grasseuse s'est produite pendant

le prélèvement et le traitement du tissu, et reflète indirectement la santé globale du tissu traité. Le tissu de greffe préparé avec le système PureGraft™ de Cytori contenait considérablement moins de lipide libre que les greffes préparées selon d'autres méthodes (Illustration 4). Le taux de lipide libre résiduel dans les échantillons PureGraft™ a atteint en moyenne $0,8 \pm 0,3 \%$, ce qui est significativement inférieur au tissu de contrôle (brut) ($10,5 \pm 1,7 \%$, $p < 0,001$), au tissu préparé par séparation par gravité ($8,7 \pm 1,7 \%$, $p < 0,001$) ou au tissu centrifugé ($10,2 \pm 1,5 \%$, $p < 0,001$).

TAUX DE CELLULES SANGUINES:

Les données présentées dans les **illustrations 1 et 2** laissent penser que les greffes préparées à l'aide de PureGraft™ sont moins contaminées par des cellules sanguines que celles préparées selon les autres méthodes. Ce paramètre a été analysé de manière plus approfondie en prélevant les culots cellulaires, en les remettant en suspension dans un tampon, puis en réalisant une numération cellulaire à l'aide d'un analyseur d'hématologie. Les données confirment que la greffe préparée avec PureGraft™ contenait considérablement moins d'hématies et de leucocytes que celles préparées selon les autres méthodes (**Tableau 2**). Bien que la séparation par gravité et la centrifugation éliminent environ 50 % des hématies et 60-70 % des leucocytes, la préparation par PureGraft™ a éliminé plus de 95 % des leucocytes et des hématies.

RENDEMENT DE LA GREFFE:

Les médecins sont également préoccupés par l'effet de la méthode de préparation sur le rendement de la greffe. Le tissu de contrôle comportait du liquide tumescent et du lipide libre ; le tissu réel

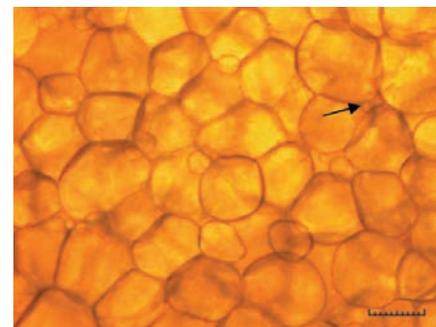
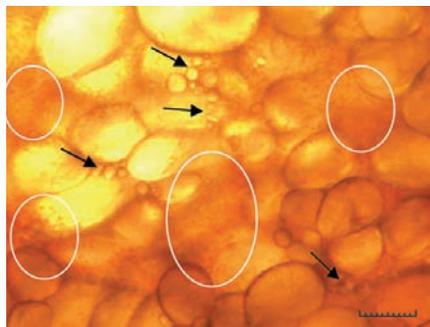
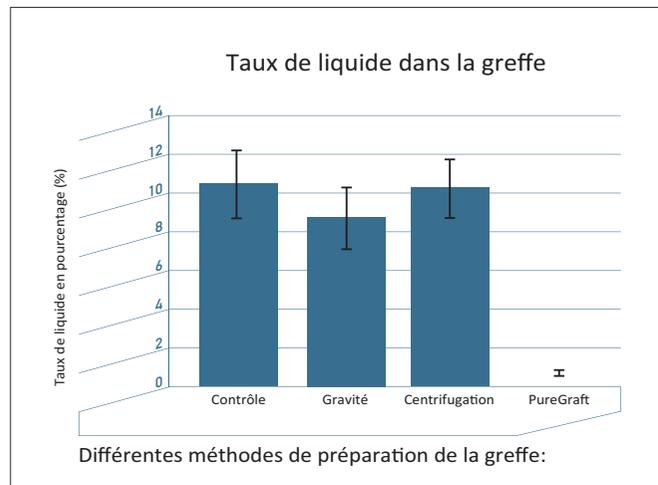


Illustration 3. Tissu de greffe préparé selon différentes méthodes. Cette illustration présente des exemples de greffes préparées par (de gauche à droite) : séparation par gravité, centrifugation et préparation PureGraft™ de Cytori. Les cercles mettent en évidence les amas d'hématies alors que les flèches indiquent le lipide libre. Les échelles graphiques sur chaque image représentent 100 µM.

Tableau 1: Taux de liquide dans les greffes

Différentes méthodes de préparation de la greffe	Taux de liquide en pourcentage (plage)	Contrôle du taux de liquide par l'utilisateur
Contrôle	23,3 -45,8 %	Non
Gravité	18,3 - 36,7%	Non
Centrifugation	2,0 - 7,7%	Non
PureGraft	2,7 - 20% selon le contrôle effectué par l'utilisateur	Oui

**Illustration 4.** Taux de lipide libre dans la greffe après préparation selon les quatre méthodes (N=14). Les greffes préparées par PureGraft™ contenaient significativement moins de lipide libre que celles préparées selon les trois autres méthodes (p<0,001).

représentait $63,96 \pm 2,96$ % du lipoaspirat prélevé. Suite à la préparation, la centrifugation a conservé $51,71 \pm 4,91$ % du tissu et PureGraft™, $51,95 \pm 5,95$ % (illustration 5). Par conséquent, PureGraft™ a produit des rendements de tissu de greffe réels comparables à ceux obtenus par centrifugation classique.

Tableau 2: Taux d'hématies dans le tissu de greffe

Préparation de la greffe	Hématies (N=12)	Leucocytes (N=8)	Valeur p / PureGraft™
PureGraft	$1,93 \pm 0,3\%$	$2,87 \pm 0,61\%$	-----
Gravité	$53,52 \pm 5,2\%$	$41,3 \pm 10,5\%$	Hématies, leucocytes <0.001
Centrifugation	$47,6 \pm 5,1\%$	$32,4 \pm 4,6\%$	Hématies, leucocytes <0.001

* Les valeurs sont réduites aux échantillons de contrôle négatif moyens pour le tissu de chaque donneur. Les résultats démontrent que les greffes préparées à l'aide de PureGraft™ comportent significativement moins de sang que celles préparées selon d'autres méthodes.

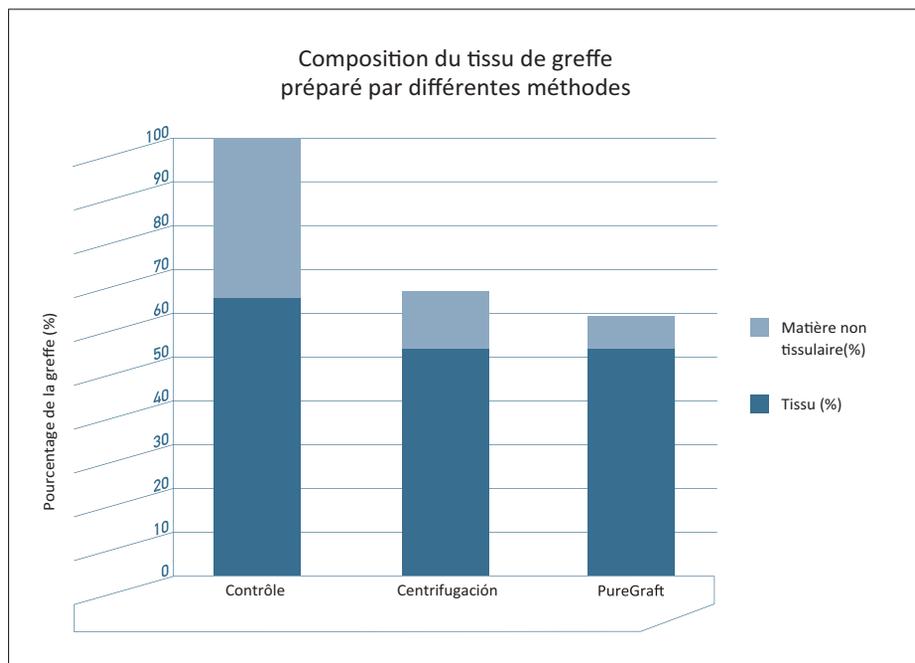


Illustration 5. Rendement de tissu de greffe préparé selon différentes méthodes (N=5). Les contrôles ont été échantillonnés avant d'être traités. Le pourcentage de tissu de greffe restant après le traitement par centrifugation et selon la méthode PureGraft™ a été réduit à celui du tissu de contrôle.

CONCLUSION:

Pour tous les paramètres testés, le système PureGraft™ de Cytori a obtenu des résultats équivalents, voire supérieurs, à ceux obtenus avec les méthodes de préparation courantes. La performance relative des méthodes de préparation a été cohérente parmi les 14 échantillons.

Le volume de rendement de tissu de greffe récupéré par centrifugation ou PureGraft™ est comparable, comme indiqué dans l'illustration 5. Le système PureGraft™ génère également du tissu de greffe dont le taux de liquide est comparable à celui de la centrifugation classique. Mais contrairement à cette dernière, le système PureGraft™ permet aux cliniciens de contrôler le taux de liquide dans le tissu de greffe, comme indiqué dans le tableau 1. Les médecins peuvent également contrôler l'hydratation du tissu de

greffe et donc, sa consistance, en ajustant le temps et les technique de drainage.

Comme indiqué dans les **illustrations 1 et 2**, le tissu traité par PureGraft™ est globalement plus propre, avec une preuve de présence considérablement inférieure de lipide libre et d'hématies que les greffes préparées par centrifugation ou séparation par gravité. Il est important de noter que le taux de lipide libre des greffes préparées par centrifugation a été mesuré après élimination du lipide libre observé pendant la préparation réelle de la greffe. Ceci étant, le lipide libre, évident dans **l'illustration 2** et quantifié dans **l'illustration 4** (9,6 % du volume de la greffe en moyenne), venait d'être libéré. Cela indique que la matière de la greffe contenait des adipocytes endommagés qui ont libéré leur lipide pendant la seconde

centrifugation visant à séparer la greffe en quatre composants. Le fait que les greffes préparées dans PureGraft™ aient contenu considérablement moins de lipide libre suite à la même centrifugation laisse penser que les échantillons PureGraft™ contiennent moins d'adipocytes endommagés.

Les greffes adipocytaires préparées à l'aide du système PureGraft™ de Cytori semblent moins endommagées et moins cruentées que celles préparées par séparation par gravité ou centrifugation. Enfin, PureGraft est un système fermé, qui reste sur le champ stérile et offre un moyen rapide (-15 minutes) de préparer le lipoaspirat en vue d'une greffe adipocytaire autologue.

BIBLIOGRAPHIE

1. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J.* 2009;**29**:360-376.
2. Kaufman MR, Miller TA, Huang C *et al.* Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plast Reconstr Surg.* 2007;**119**:2287-2296.
3. Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R *et al.* Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. *Int J Urol.* 2009.
4. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B *et al.* Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg.* 2007;**119**:323-331.