

# De l'usage des concentrés plaquettaires autologues en application topique

S. Dohan, A. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, A. Simonpieri, M.-O. Girard, D. Dohan

*La recherche de protocoles favorisant l'hémostase et la cicatrisation est un problème récurrent dans toutes les disciplines chirurgicales. Les concentrés plaquettaires, en tant que colles biologiques enrichies en cytokines, offrent de nouvelles voies de recherche innovantes. La première génération de ces adjuvants chirurgicaux, généralement dénommés concentrated platelet-rich plasma (cPRP), est issue des technologies des colles de fibrine autologues. Les différentes sortes de cPRP furent testées dans de nombreuses situations cliniques, en particulier en chirurgie orale et maxillofaciale. Mais c'est la seconde génération de concentrés plaquettaires, le platelet-rich fibrin (PRF), qui offre les applications cliniques les plus performantes. En effet, le PRF induit la cicatrisation accélérée des tissus grâce au développement d'une néovascularisation efficace, à une fermeture accélérée des plaies avec remodelage rapide du tissu cicatriciel et à une absence quasi totale de suites infectieuses. Les concentrés plaquettaires à usage topique, en particulier le PRF, représentent ainsi de nouveaux adjuvants thérapeutiques complémentaires, à condition d'être capables d'en évaluer de manière impartiale et rigoureuse les effets réels.*

© 2005 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Colle de fibrine ; Concentré plaquettaire ; Facteurs de croissance plaquettaires ; Gel de fibrine ; Gel de plaquettes ; PRF (platelet-rich fibrin) ; PRP (platelet-rich plasma)

## Plan

■ Introduction	1
■ Protocoles et technologies	1
Définitions	2
Colles de fibrine, ancêtres des concentrés plaquettaires	3
cPRP, les premiers concentrés plaquettaires à usage topique	3
Technologie du PRF	8
■ Biologie associée	8
Fibrine : molécule clé des concentrés plaquettaires	8
Cytokines plaquettaires : que peut-on attendre d'elles ?	13
Cytokines immunitaires et PRF	15
cPRP et PRF : une même famille d'adjuvants chirurgicaux, mais deux biologies très différentes	16
Fibrine, concentrés plaquettaires et processus tumoraux	19
■ Applications cliniques	20
Applications cliniques des cPRP	20
Comprendre le PRF : de la biologie des fibrines au biomatériau de cicatrisation	22
PRF et greffes osseuses	24
Quel champ d'application pour le PRF ?	25
■ Conclusion	25

## ■ Introduction

La mise au point d'adjuvants chirurgicaux bioactifs capables de réguler l'inflammation et de potentialiser la cicatrisation fait partie des grands défis de la recherche clinique. En effet, toutes

les disciplines médicochirurgicales, en faisant appel aux capacités d'autoréparation des tissus, doivent faire face à des phénomènes de remodelage tissulaire difficilement contrôlables et dont les conséquences à l'échelle de l'individu peuvent être dramatiques.

Parmi les nombreux protocoles développés, l'utilisation de colles de fibrine est déjà bien documentée. Mais leurs applications restèrent pendant longtemps limitées en raison de la complexité de leur mode de production et des risques de contamination de pathologies infectieuses. L'essor de technologies sœurs, celles des concentrés plaquettaires, a permis la mise au point de modes de production simplifiés et optimisés de ces colles de fibrine. L'une d'entre elle va même jusqu'à mimer une matrice cicatricielle ad integrum : le *platelet-rich fibrin* (PRF).

## ■ Protocoles et technologies

Jusqu'en 1997, les concentrés plaquettaires appartenaient de façon quasi exclusive aux domaines d'investigation de l'hématologie, principalement dans le cadre de recherches visant à améliorer les transfusions sanguines dans certaines situations chirurgicales extrêmes, telles que les greffes cardiaques ou les pontages coronariens. Depuis lors, <sup>[1]</sup> ces technologies ont inspiré des travaux toujours plus nombreux, d'une qualité très hétérogène, sur la capacité réelle ou prétendue des cytokines relarguées par les plaquettes à promouvoir des cicatrisations plus rapides et mieux coordonnées, tant au plan cutanéomuqueux qu'au sein des sites osseux.

À l'origine, ces techniques devaient servir à obtenir une colle biologique à base de fibrine autologue, <sup>[2]</sup> mais le rôle présumé des cytokines plaquettaires a masqué cet aspect pourtant crucial. D'une colle biologique « intelligente », nombre de cliniciens ont dérivé vers le rôle espéré des plaquettes piégées dans un gel de fibrine et massivement activées au moment opportuniste.

## Définitions

### Qu'est-ce qu'un concentré plaquettaire ?

À l'origine, les concentrés plaquettaires pouvaient être définis comme des produits sanguins faisant fonction de médicament dans certaines pathologies graves. En effet, les transfusions plaquettaires sont essentiellement indiquées, en milieu spécialisé, pour la prévention et le traitement des hémorragies dues à des thrombopénies graves, inférieures à  $20 \times 10^9$  plaquettes/l, d'origine centrale : aplasie médullaire, leucémie aiguë. Elles demeurent donc d'un usage très limité.

Au plan strictement hématologique, le concentré plaquettaire standard est défini comme le surnageant enrichi en plaquettes, obtenu après centrifugation de sang total prélevé sous anticoagulant. C'est ce qui est dénommé plasma riche en plaquettes ou *platelet-rich plasma* (PRP). Chaque unité contient  $0,5 \times 10^{11}$  plaquettes, associées à des leucocytes et à une petite quantité résiduelle d'hématies. Il faut de six à huit unités en moyenne pour traiter un adulte, ce qui signifie qu'un patient reçoit un mélange d'unités provenant de six à huit patients. Dans de telles circonstances, le risque de transmission de pathologies infectieuses est donc sérieusement accru.

Il existe deux autres protocoles pour améliorer les concentrations de plaquettes à visée transfusionnelle. Ces deux protocoles ont fait l'objet de toutes les attentions lorsque ces technologies ont trouvé des applications hors transfusion.

Le concentré unitaire de plaquettes est obtenu à partir d'un seul donneur dont les plaquettes sont concentrées à l'aide d'appareils « séparateurs de cellules », opérant par soustraction des plaquettes par centrifugation différentielle et réinjection continue des hématies et du plasma durant de 1 heure 30 à 3 heures. Le concentré unitaire contient entre 2 et  $6 \times 10^{11}$  plaquettes viables, soit de quatre à douze unités standards. Il permet ainsi de limiter le risque infectieux d'une transfusion plaquettaire.

Le concentré plaquettaire de plasmaphérèse est également obtenu à partir d'un seul donneur à l'aide d'un séparateur de cellules. La grande différence réside dans le fait que le patient n'est pas branché sur la machine : on lui prélève du sang sous anticoagulant, puis ce sang est traité de telle sorte que l'on récupère du plasma acellulaire d'une part, un concentré plaquettaire et un culot d'hématies d'autre part. Les hématies et le plasma peuvent être réinjectés. L'inconvénient de cette méthode, c'est qu'elle ne permet pas d'extraire autant de plaquettes que la précédente, puisque le patient ne reste pas branché sur la machine. Le concentré obtenu ne contient que l'équivalent de quatre à six concentrés plaquettaires standards. Cependant, ce protocole a l'avantage d'être moins contraignant pour le donneur.

Les concentrés plaquettaires ainsi préparés ne peuvent être conservés que 5 jours, entre 20 et 24 °C et en agitation.

### Petite histoire naturelle des colles biologiques

La recherche de protocoles favorisant l'hémostase et permettant le scellement des berges de plaies est un problème récurrent dans toutes les disciplines chirurgicales. Et l'on est encore bien loin de posséder la colle miracle qui permettrait de sceller sans provoquer de nécroses, tout en prévenant les suites opératoires douloureuses (drains, hématomes et autres tiraillements de plaies) et en potentialisant une cicatrisation saine et coordonnée. Il y eut cependant quelques avancées significatives, les plus intéressantes étant issues de l'utilisation de produits dérivés du sang.

Les colles de fibrine ont été décrites pour la première fois en 1970.<sup>[3]</sup> Elles sont composées de fibrinogène polymérisant sous l'action de thrombine et de calcium. À l'origine, elles étaient préparées à partir de plasma collecté par des banques de sang ; cependant, à cause des faibles concentrations de fibrinogène collecté dans le plasma, la stabilité et la qualité de ces colles étaient bien modestes... L'utilisation de colles de fibrine à base de cryoprécipités apporta de bien meilleurs résultats. Mais son utilisation se retrouva limitée en raison des risques de transmission de pathologies infectieuses.<sup>[4-6]</sup> Plus récemment, des produits de scellement à base de fibrine, tels que le Tisseel®

(Baxter Healthcare Corp.), ont été mis sur le marché. Ces produits sont thermotraités, ce qui réduit énormément, mais pas totalement, le risque de transmission de maladies infectieuses.<sup>[7]</sup>

Quant aux colles de fibrine autologues, bien qu'elles fussent reconnues comme d'excellents agents hémostatiques, leur utilisation fut limitée par la complexité des protocoles disponibles (qui nécessitaient des prises de sang préopératoires) et des coûts de production élevés.<sup>[8]</sup> Lorsque Tayapongsak décrit son *autologous fibrin adhesive* (AFA) en 1994,<sup>[2]</sup> colle de fibrine autologue lui servant à maintenir les fragments des greffes osseuses dans une masse cohérente (afin d'éviter les séquestres osseux postopératoires), il utilise un sang prélevé 1 à 3 semaines avant l'intervention et nécessitant 2 jours de manipulations avant d'être prêt à l'emploi ! Mais on reconnaît déjà dans cette méthode (similaire aux protocoles utilisés pour fabriquer les colles de fibrine issues de banques de sang) les prémices des concentrés plaquettaires, même si à l'époque on cherchait surtout à concentrer le fibrinogène. Mais curieusement, en cherchant un plasma riche en fibrinogène, Tayapongsak fut le premier à obtenir, mais il l'ignorait alors, un plasma que l'on décrira plus tard comme riche en plaquettes...

Le développement des protocoles simplifiés a rapidement fait évoluer la situation. C'est l'avènement des PRP, les mal nommés. En effet, ce qu'on désigne sous le nom de PRP, ce sont des concentrés plaquettaires standards de l'hématologie transfusionnelle. Or, les protocoles décrits utilisent en général une double centrifugation, afin de concentrer davantage les plaquettes à recueillir. Pour reprendre cette erreur de vocabulaire, bien des noms ont été proposés : cPRP (*concentrated PRP*),<sup>[9]</sup> PRGF (*plasma rich growth factors*),<sup>[10]</sup> etc. Il semble cependant que le terme de cPRP soit le plus simple et le plus adéquat.

Ces protocoles sont fondés sur une idée simple : la prise de sang se fait juste avant l'intervention, et le prélèvement est immédiatement transformé en concentré plaquettaire à l'aide d'un séparateur de cellules tout droit sorti du laboratoire d'hématologie (les premières années) puis à l'aide de machines de plus en plus spécifiques, simples et automatisées (dont l'exemple le plus étonnant est la Harvest SmartPreP®). Le concentré plaquettaire est ensuite combiné avec de la thrombine et du chlorure de calcium afin de provoquer une gélification de la préparation.

En France, privés du droit accordé aux praticiens américains et du reste de l'Europe de manipuler des produits sanguins (ajout d'anticoagulants, de thrombine), il fallut réinventer le concept de concentrés plaquettaires dans le cadre de la loi. C'est ainsi que fut créé le PRF, dont le protocole reste le plus simple pour obtenir des colles de fibrine autologues.

### Centrifugation

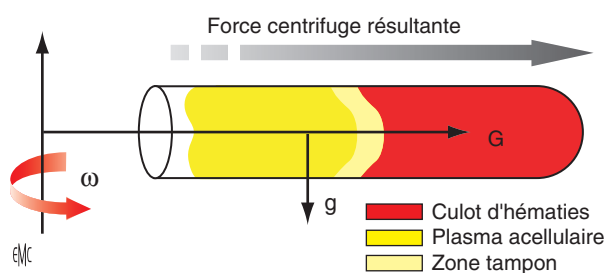
La centrifugeuse est un appareil qui permet de décanter les différentes particules suspendues dans une solution liquide. Ces particules de nature, de taille et de masse différentes vont se déposer à des distances différentes du fond du tube et sont de ce fait séparées à la fin de l'opération. Pour ce faire, on communique à la solution contenue dans un tube (dans notre cas, le sang prélevé) une rotation très rapide de vitesse angulaire  $\omega$  autour d'un axe. La force centrifuge engendre alors un champ  $G$  intense et horizontal, très largement supérieur au champ d'attraction terrestre ( $g$ ), de sorte que le champ résultant est pratiquement confondu avec  $G$  (Fig. 1).

Bien souvent dans la littérature, les protocoles de centrifugation sont indiqués en tours par minute. Or, pour évaluer une force centrifuge appliquée, les valeurs en  $g$  seules ne peuvent avoir de signification. En effet, une vitesse de rotation seule ne reflète pas une force, car celle-ci dépend tout autant de la distance moyenne entre le tube et l'axe de rotation.

L'équation fonctionnelle ainsi :

Si  $V$  est la vitesse de rotation en tours par seconde et  $L$  la distance moyenne (en mètres) entre le tube et l'axe de rotation, alors :  $\omega = \text{vitesse angulaire} = 2\pi V$  radians/s, et  $G = \omega^2 L$  ms<sup>-2</sup>.

Par exemple, pour 3 000 tours/min avec  $L = 4$  cm (centrifugeuse de PRF) :  $\omega = 2\pi \times 3\,000/60 = 100\pi$  et  $G = \omega^2 \times L = 4\,000$  ms<sup>-2</sup>.



**Figure 1.** Les constituants du sang sont décantés selon leur masse et leur taille. Les plus gros et lourds se déposent au fond du tube (hématies) tandis que les éléments les plus légers restent proches de l'axe de rotation (fibrinogène, fibronectine et autres molécules plasmatiques...).

Or,  $g$  (gravitation terrestre) =  $10 \text{ ms}^{-2}$ , donc  $G = 400 g$ .

La conséquence théorique d'une telle équation est évidente : la force centrifuge exercée n'est pas la même d'un bout à l'autre du tube. Et plus on s'éloigne de l'axe de rotation, plus elle est importante. Il faut donc raisonner en termes de force moyenne.

## Colles de fibrine, ancêtres des concentrés plaquettaires

Malgré le développement de techniques chirurgicales antihémorragiques efficaces, la recherche d'agents hémostatiques est un problème récurrent. Il en existe une grande variété, qu'il s'agisse d'éponges de collagène, de cellulose oxydée ou de colles cyanoacrylates synthétiques. Au sein de notre arsenal thérapeutique, les colles de fibrine sont certainement les mieux documentées ; elles existent depuis plus de 30 ans [3] et ont fait l'objet d'essais thérapeutiques dans toutes les configurations chirurgicales. Leur principal atout provient de leur nature même. À base de fibrinogène, elles correspondent à un mécanisme biologique naturel amplifié de manière artificielle : la polymérisation de la fibrine au cours de l'hémostase.

Mais pendant longtemps, elles présentaient l'inconvénient d'être des produits dérivés du sang : produites par l'industrie pharmaceutique (par exemple, le Tisseel® de Baxter Healthcare Corp.), elles présentaient un risque de contamination virale, minime mais pas nul. Et les outils simplifiés nécessaires à la fabrication de colles de fibrine autologues ne furent développés qu'avec l'essor de technologies sœurs, celles des concentrés plaquettaires de type cPRP.

## Modus operandi

Le mode de fonctionnement des colles de fibrine reproduit les dernières étapes des cascades enzymatiques de la coagulation, au cours desquelles le fibrinogène est converti en fibrine en présence de thrombine, de facteur XIII, de fibronectine et d'ions calcium. [7]

Le kit commercialisé par Baxter Healthcare Corp. (Tisseel®) en est le parfait exemple. Il se compose :

- d'un concentré de fibrinogène lyophilisé, associé à de la fibronectine et à du facteur XIII ;
- d'une solution d'aprotinine (inhibiteur des protéases) d'origine bovine, à l'activité antifibrinolytique permettant d'accroître la durée de vie du scellement de fibrine ;
- d'un concentré de thrombine bovine ;
- d'une solution de chlorure de calcium.

Dans un premier temps, le fibrinogène est mélangé à la solution d'aprotinine, et la solution A ainsi constituée est réchauffée à  $37 \text{ °C}$ . Puis, la thrombine bovine est mélangée à la solution de chlorure de calcium : on obtient alors la solution B.

Les solutions A et B sont mélangées au moment de l'application de la colle grâce à un embout automélangeur monté sur une seringue à deux cartouches.

Il est important de noter que la rapidité de la prise de la colle est fonction des quantités de thrombine utilisées pour reconstituer la solution B. En général, on recherche une activité hémostatique, ce qui implique une prise rapide de la colle et un

taux de thrombine élevé. Cependant, il demeure possible de choisir une prise lente, même si l'on sacrifie alors une grande part de l'intérêt chirurgical de cet adjuvant.

Ce dernier point est important pour comprendre le devenir biologique de la colle.

## De nombreuses applications cliniques

Malgré de considérables variations entre tous les protocoles décrits dans la littérature, la plupart des études démontrent l'efficacité des colles de fibrine pour contrôler des foyers de saignements lents et diffus, ainsi que les exsudats lymphatiques, les collections séreuses et de manière générale tous les saignements diffus des parenchymes. Cependant, ces colles ne permettent pas le contrôle d'hémorragies artérielles ou veineuses importantes, et ne remplacent en aucun cas la maîtrise d'une technique chirurgicale de contrôle des hémorragies en amont. [7]

Les colles de fibrine trouvèrent de nombreuses applications en chirurgie cardiothoracique et vasculaire. Par exemple, en chirurgie cardiaque, ces colles ont été utilisées avec succès pour le scellement des foyers de saignements microvasculaires diffus par application en *spray*.

Mais les colles de fibrine sont avant tout connues pour leurs applications idéales dans le scellement des berges de plaies et la réapplication des revêtements cutanés en chirurgie plastique et générale. Les chirurgiens utilisent alors tant les propriétés mécaniques de la colle que les propriétés biologiques cicatricielles de la fibrine.

Ces colles furent également particulièrement bien décrites en chirurgie orale et maxillofaciale. Le scellement par colle de fibrine est classiquement décrit pour réduire le risque d'hématome postopératoire et accélérer la cicatrisation. [6]

Au final, de nombreuses disciplines chirurgicales tentèrent l'application de ces colles dans la plupart des sites opératoires, d'abord chez l'animal puis parfois chez l'homme. Les résultats sont assez hétérogènes et même parfois controversés : c'est en particulier le cas en orthopédie ou en neurochirurgie, où le scellement de dure-mère ou de nerfs en chirurgie réparatrice traumatique ou tumorale demeure peu documenté.

Au final, ces adjuvants demeurent avant tout des colles dont les principales activités biologiques sont l'adhérence aux tissus et la biodégradabilité.

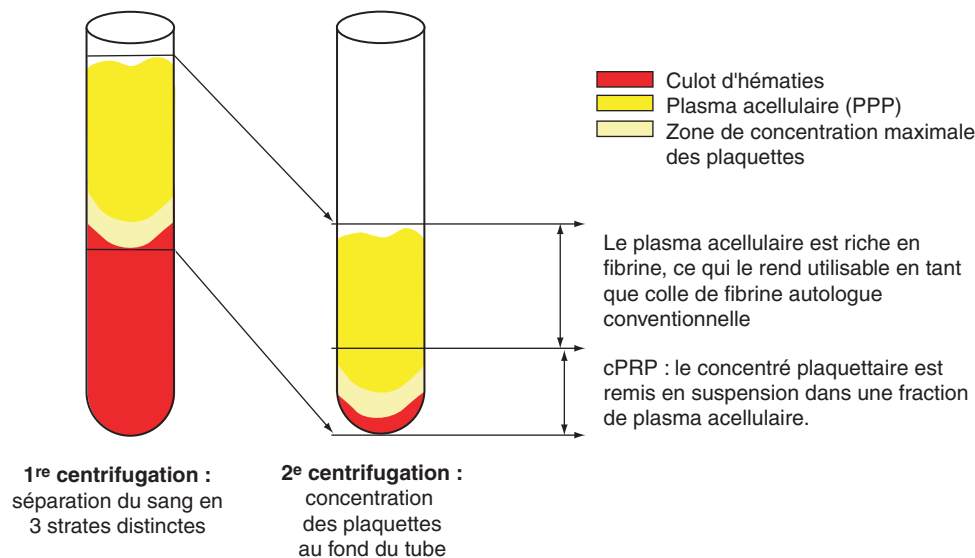
## cPRP, les premiers concentrés plaquettaires à usage topique

### Des colles de fibrine aux concentrés plaquettaires

Face au risque de transmission des hépatites, les colles de fibrine commercialisées furent interdites aux États-Unis dès 1978. Dès lors, les tentatives de mise au point de colles de fibrine autologues devinrent de plus en plus nombreuses, mais avec des succès mitigés. En effet, il était difficile d'obtenir par une technique « artisanale » des taux de fibrinogène aussi élevés que dans un produit industriel de type Tisseel®. Et lorsque la technologie permettait la production d'une colle autologue acceptable, le praticien se heurtait à des protocoles extrêmement longs et complexes. [2]

Ces efforts auraient pu rester vains, mais l'apparition d'un nouveau concept thérapeutique permit le brutal essor de ces technologies si longtemps quiescentes : les concentrés plaquettaires, en surfant sur l'engouement des cliniciens pour le concept de thérapie cellulaire par facteurs de croissance, ont relancé la recherche technologique sur les colles de fibrine autologues. En effet, si ces nouvelles technologies cherchent désormais à récolter les plaquettes présentes dans un prélèvement sanguin, elles reposent toujours sur l'extraction et la polymérisation de la fibrine. [11]

Les premiers concentrés plaquettaires utilisés comme adjuvants chirurgicaux ont été arbitrairement dénommés PRP, comme les concentrés plaquettaires standards de l'hématologie transfusionnelle. Or, les protocoles décrits utilisent en général une double centrifugation, afin de concentrer davantage les



**Figure 2.** Concept technologique de production de *concentrated platelet-rich plasma*.

plaquettes à recueillir. Parmi les différents noms proposés pour reprendre cette erreur de vocabulaire, le terme de cPRP demeure le plus simple et le plus adéquat.

## Différentes technologies du cPRP

### Concept

Il existe de nombreux protocoles différents pour mettre en application le concept de cPRP. Mais on peut schématiquement les diviser en deux familles : les techniques lourdes utilisant des séparateurs de cellules d'hématologie et les techniques simplifiées, commercialisées sous forme de kits, qui utilisent une centrifugation en deux temps pour récupérer un culot de concentré plaquettaire. Ces derniers systèmes sont de plus en plus automatisés, ce qui a permis le développement exponentiel de leur mise en œuvre clinique.

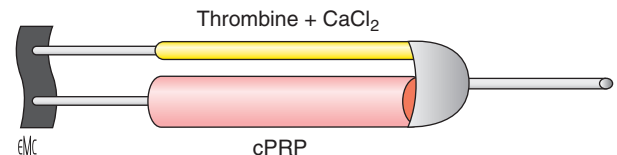
Dans un premier temps, il faut envisager le concept général de production des cPRP plus qu'un système particulier.

Le sang veineux est prélevé sous anticoagulant CPDA (citrate, phosphate, dextrose, adénosine) ou ACD-A (citrate-dextrose-adénosine acide). L'utilisation d'EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*) est à éviter car cet anticoagulant fragmente les plaquettes.<sup>[12]</sup> Le prélèvement sous anticoagulant permet d'éviter l'activation et la dégranulation plaquettaires.

Une première centrifugation (*soft spin*) permet la séparation du sang en trois strates distinctes (Fig. 2) :

- au fond du tube, un culot d'hématies et de leucocytes, qui occupe 55 % du volume total ;
- en surface, un plasma acellulaire, principalement constitué de molécules plasmiques circulantes (en particulier le fibrinogène) et pauvre en plaquettes, dénommé *platelet-poor plasma* (PPP) ou plasma pauvre en plaquettes ; il occupe 40 % du volume total ;
- entre les deux, une strate où les concentrations en plaquettes (et en fibrinogène) sont largement accrues ; elle ne fait que 5 % du volume total et son aspect blanchâtre caractéristique l'a fait appeler *buffy coat* (manteau blanchâtre) ; c'est elle qui composera la majeure partie du futur cPRP mais à ce stade, elle est encore difficilement séparable de façon scientifique des autres strates, bien que quelques auteurs se soient attelés à prouver le contraire<sup>[13]</sup> en allant la recueillir « à vue d'œil », à l'aide d'une seringue ; Anitua<sup>[10]</sup> a ainsi réussi à décrire et à nommer quatre strates distinctes au sein de la fraction plasmatisque obtenue après cette première centrifugation ; mais une telle manœuvre demeure très empirique.

À l'aide d'une seringue stérile, on aspire le PPP, le PRP et un peu d'hématies (attirées de manière malencontreuse et systématique au cours de la manœuvre). Puis l'ensemble est transféré dans un autre tube, sans anticoagulant.



**Figure 3.** Seringue d'application de gel de concentré plaquettaire. Le *concentrated platelet-rich plasma* est mélangé à la thrombine dans l'embout mélangeur, ce qui permet le dépôt d'un gel hémostatique et adhésif à base de fibrine en cours de polymérisation.

Ce second tube subit à son tour une centrifugation, décrite comme devant être plus longue et plus rapide que la précédente (*hard spin*). Elle permet de faire sédimenter les plaquettes au fond du tube, de manière à obtenir à nouveau trois strates distinctes (Fig. 2) :

- quelques hématies résiduelles piégées au fond du tube ;
  - une masse de plasma acellulaire (PPP) occupant 80 % du volume total ;
  - entre les deux, une couche blanchâtre, le cPRP.
- À ce stade, il devient aisé de recueillir le cPRP. Avec une seringue, on se débarrasse de la majeure partie du PPP, de manière à n'en laisser que le strict nécessaire à la remise en suspension des plaquettes concentrées. Puis on agite l'ensemble et l'on obtient un cPRP en suspension prêt à l'emploi.

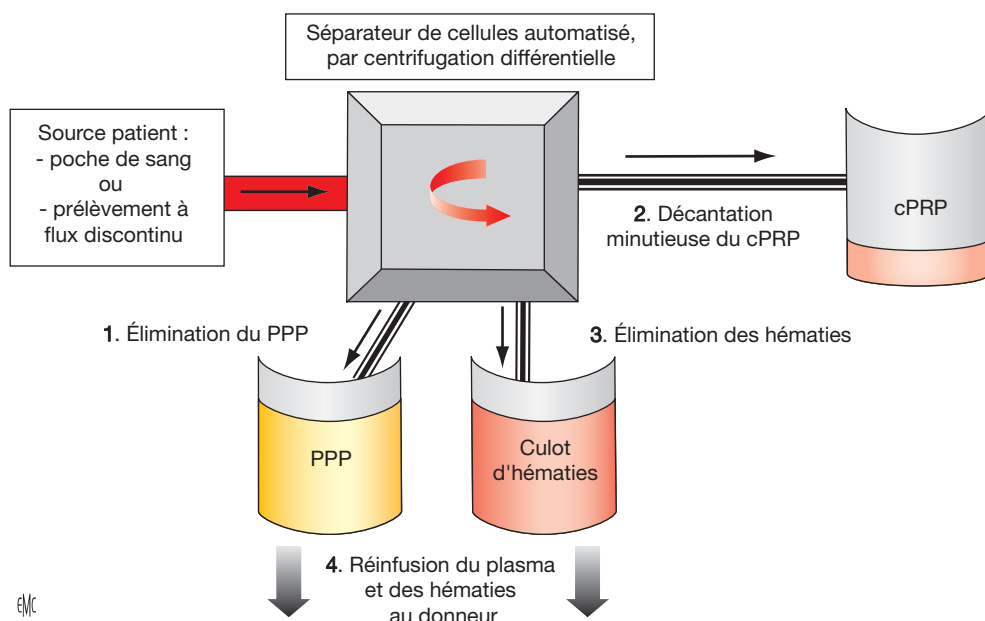
À noter que les hématies piégées au fond du tube sont, elles aussi, remises en suspension par cette dernière manœuvre, ce qui explique l'aspect rosé du cPRP final.

Il ne reste plus qu'à mélanger le cPRP avec de la thrombine bovine et du chlorure de calcium au moment de l'application grâce à une seringue d'automélange (Fig. 3). Cette dernière étape permet la gélification du concentré plaquettaire par la polymérisation du fibrinogène (concentré également au cours de la préparation du cPRP) qui constitue une trame de fibrine aux propriétés hémostatiques et adhésives particulièrement intéressantes dans le cadre de nombreuses chirurgies. À noter que la thrombine peut être remplacée par l'ITA, un agent gélifiant synthétique.<sup>[12]</sup>

De plus, l'application du cPRP peut se faire en gel ou en *spray* (selon l'embout choisi pour la seringue). Dans les deux cas, la polymérisation de la fibrine se fait en quelques minutes. À noter que pour obtenir un gel plus dense, voire une membrane à base de cPRP, il est possible de rajouter du Tisseel® à notre mixture.<sup>[14]</sup>

### Plasmaphérèse

Ce fut la première méthode développée pour obtenir des concentrés plaquettaires.<sup>[15]</sup> Qu'elle soit faite à flux discontinu



**Figure 4.** La plasmaphérese utilise un séparateur de cellules automatisé.

(c'est-à-dire que le patient reste connecté à la machine qui lui filtre le sang jusqu'à obtenir le nombre de plaquettes souhaité) ou à partir d'une poche de 500 ml de sang prélevé sous anticoagulant, le concept reste le même. Cependant, ce protocole issu des techniques transfusionnelles est lourd et compliqué à mettre en œuvre (Fig. 4). De ce fait, même si de nombreuses études y font encore référence, [16, 17] il n'est que très rarement utilisé en clinique.

Une ultracentrifugation différentielle (3 000 g en général) sépare dans un premier temps le plasma acellulaire (PPP) des éléments figurés du sang et l'évacue, soit vers une poche qui peut être réinfusée plus tard, soit directement vers le patient (si celui-ci est encore connecté à la machine).

Puis, un lecteur optique constate que la centrifugation commence à séparer un sérum beaucoup plus blanchâtre (le *buffy coat*) correspondant à un concentré plaquettaire (cPRP), et fait basculer automatiquement le liquide décanté vers une poche différente, tout en ralentissant la vitesse de centrifugation (pour permettre un clivage précis entre cPRP et culot d'hématies).

Enfin, dès que le lecteur optique détecte les premiers éléments rouges, il sait qu'il s'agit du culot d'hématies et le transfère soit vers une troisième poche qui peut être réinfusée plus tard, soit directement vers le patient (si celui-ci est encore connecté à la machine).

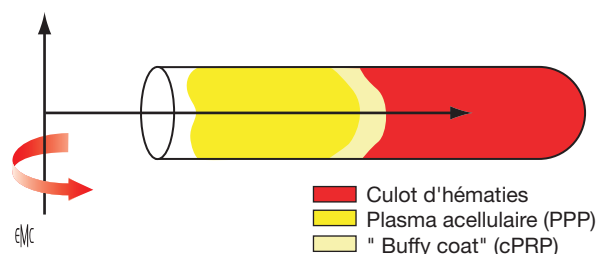
Cette méthode permet d'obtenir 30 à 40 ml de cPRP à partir de 450 ml de sang total. À flux discontinu, on peut même récolter jusqu'à 300 ml de cPRP.

À noter que l'on retrouve toujours une petite quantité d'hématies dans notre poche de concentré plaquettaire, liée aux difficultés techniques d'une séparation parfaite des différentes strates de sédimentation obtenue par centrifugation. C'est ce qui explique que, une fois remis en suspension (dans du PPP résiduel, par exemple), le concentré plaquettaire prenne un aspect rosé.

### Protocoles Curasan et Friadent-Schutze : une application basique du concept

Ils utilisent tous les deux des centrifugeuses de laboratoire standards et leur jeu de tubes de 10 ml remplis de sang citraté (anticoagulant CPDA). Les ressemblances entre les deux systèmes sont criantes ; elles vont jusqu'aux temps et aux vitesses de centrifugation : [18, 19]

- une première centrifugation de 10 minutes à 2 400 tours/min (soit environ 400 g selon nos calculs), permettant de séparer le sang total en PPP, PRP et culot d'hématies (Fig. 5) ;



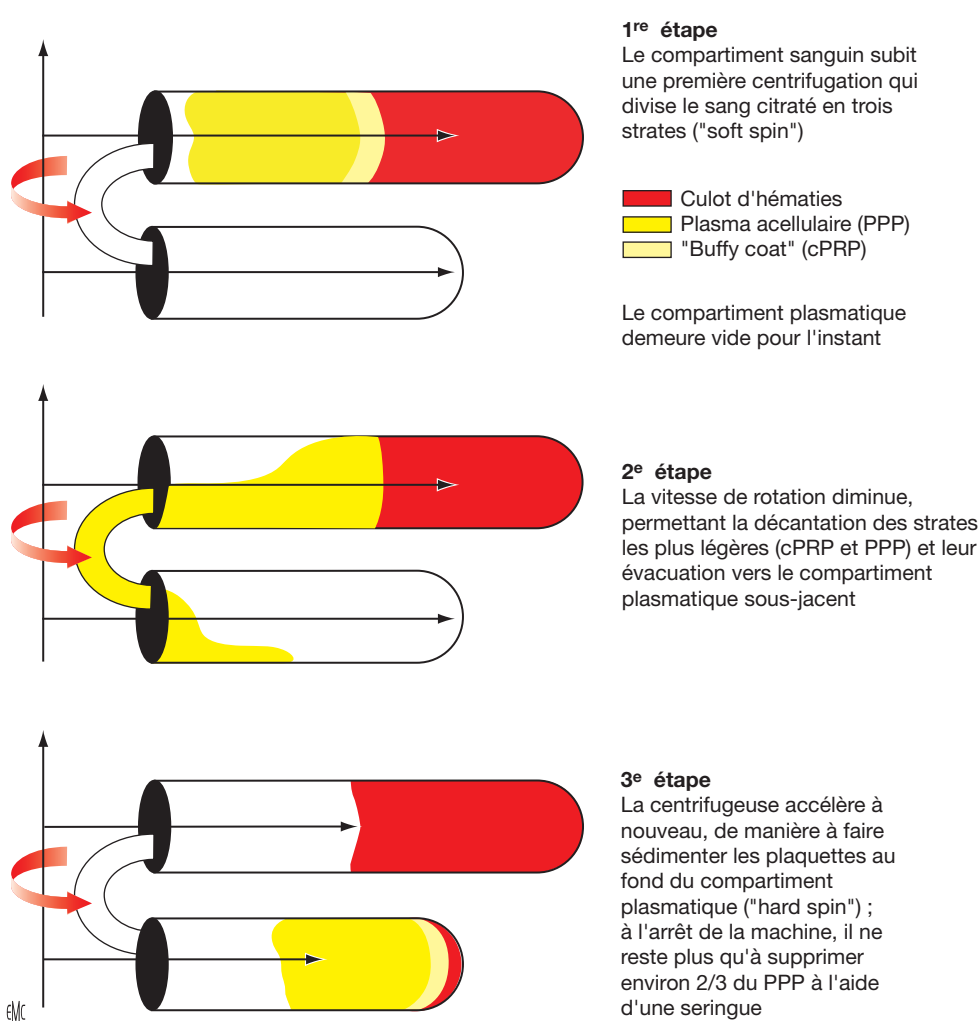
**Figure 5.** Une première centrifugation permet la séparation du sang en trois strates distinctes.



**Figure 6.** Une seconde centrifugation permet de concentrer les précieuses plaquettes au fond du tube, ce qui facilitera de surcroît leur prélèvement.

- à l'aide d'une seringue, on aspire le PPP, le PRP et un peu d'hématies ; puis l'ensemble est transféré dans un autre tube, sans anticoagulant ;
- une deuxième centrifugation de 15 minutes à 3 600 tours/min (soit environ 600 g selon nos calculs) permet de faire la séparation entre PPP et cPRP (Fig. 6) ; à noter que les quelques hématies résiduelles aspirées au cours du transfert se déposent au fond du tube.

Il ne reste plus qu'à retirer la majeure partie du PPP. Une quantité résiduelle de PPP est utilisée pour remettre les plaquettes en suspension : en théorie, 0,4 ml (Curasan) ou 0,8 ml (Friadent). Seulement, il faut noter que ce volume est très variable d'un auteur à l'autre et que, de surcroît, il se mesure toujours « à vue d'œil »... Pourtant, en fonction du volume utilisé pour remettre le cPRP en suspension, les concentrations de plaquettes mesurées varient énormément, ce qui en dit long sur la fiabilité des mesures, qu'il s'agisse de comptage de plaquettes ou d'évaluation de concentrations en cytokines plaquettaire, réalisées au cours des nombreuses études sur le sujet.



**Figure 7.** L'ingénieuse SmartPREP® est entièrement automatisée. À partir d'un prélèvement de 60 ml de sang citraté, elle permet d'obtenir, après resuspension dans le *platelet-poor plasma* résiduel, environ 8 ml de *concentrated platelet-rich plasma* prêt à l'emploi. À noter que le programme standard de préparation (en trois étapes à trois vitesses différentes) utilisé par cette machine ne dure que 12 minutes et qu'il est impossible d'en modifier les paramètres (temps ou vitesse).

Il ne reste plus qu'à placer le cPRP dans une seringue d'automélange couplée à de la thrombine bovine (et du chlorure de calcium), pour obtenir un gel utilisable cliniquement.

#### « Platelet concentrate collection system » (PCCS)® de 3I : vers des machines plus spécifiques

Le PCCS® reprend les mêmes principes, si ce n'est qu'il apporte un début d'automatisation du protocole. [20] C'est une centrifugeuse classique aménagée pour recevoir un dispositif adapté à la production de cPRP : deux poches plastiques solidarisées par un anneau (qui permet leur mise en place dans la centrifugeuse) et reliées par une tubule clampée.

Soixante millilitres de sang citraté sont transférés dans la première poche et le dispositif est centrifugé à 3 000 tours/min (soit près de 800 g selon nos évaluations) durant 3 minutes 45 secondes, afin d'obtenir la première séparation en trois strates du sang total.

Le praticien retire le clamp de la tubule et, à l'aide d'une seringue, il insuffle de l'air par une valve dans la première poche, ce qui a pour effet de chasser le liquide le plus superficiel (cPRP et PPP) vers la seconde poche via la tubule ouverte. La manœuvre est accomplie lorsque les premières hématies pénètrent dans la seconde poche.

La tubule est à nouveau clampée et on lance une deuxième centrifugation à 3 000 tours/min durant 13 minutes, afin d'obtenir la sédimentation des plaquettes au fond de la seconde poche.

Le clamp est à nouveau retiré, de l'air est insufflé par une valve dans la deuxième poche et le PPP est évacué en sens inverse vers la première poche.

Il ne reste plus alors, dans la deuxième poche, que le cPRP, quelques hématies résiduelles, et suffisamment de PPP pour remettre l'ensemble en suspension. Le concentré plaquettaire est alors prêt à être placé dans une seringue à embout automélangeur aux côtés de la thrombine et du chlorure de calcium.

Cette technique correspond au premier pas de l'industrie médicoscientifique pour fournir aux professionnels de santé des machines et des protocoles simplifiés parfaitement adaptés aux conditions de l'exercice chirurgical. Cependant, ce protocole demande encore plusieurs interventions humaines délicates, ce qui disparaît avec la SmartPREP®.

#### Harvest SmartPREP® ou la machine à faire du cPRP

C'est la méthode la plus évoluée pour produire du cPRP. Au point que cette machine ne peut servir qu'à ça. Automatisée et facile d'utilisation, cette centrifugeuse fait figure de leader dans le domaine de la production de concentrés plaquettaires à visée chirurgicale. [16]

Son fonctionnement repose sur une idée astucieuse : un dispositif constitué d'une double chambre de centrifugation, l'une pour le sang et l'autre pour le plasma, permettant une décantation et une séparation automatique des différentes strates du sang centrifugé (Fig. 7).

#### Comment produire des membranes de cPRP ?

La technique décrite par Sonnleitner [14] consiste à mélanger la fraction de concentré plaquettaire au fibrinogène composant la colle biologique Tisseel®, selon un rapport de 1/1. Le gel activé de cPRP peut alors être transformé en membrane biorésorbable en 5 à 7 minutes. Pour cela, il suffit de placer 2 à 3 ml de gel sur une surface lisse. Après 5 à 7 minutes, ce gel peut être récupéré sous la forme d'une membrane de fibrine chargée en plaquettes.

Une autre technique consiste en l'utilisation de membranes synthétiques dont la texture permet l'absorption du gel de cPRP. Cela permet de rendre ces membranes bioactives par ajout de facteurs de croissance.

## De l'empirisme de ces technologies

### Limites de la centrifugation

Il faut avant tout bien comprendre que la centrifugation ne peut être considérée comme une méthode de séparation précise et fiable. Elle agit selon un gradient de sédimentation des différents éléments du sang, ce qui signifie que les plaquettes ne sont jamais concentrées massivement en un seul point du tube : leur nombre par microlitre est juste statistiquement plus élevé dans la zone intermédiaire, ou zone tampon, entre la masse des hématies (éléments les plus lourds et volumineux du sang) et le plasma acellulaire (chargé de molécules plasmiques telles que le fibrinogène, les facteurs de coagulation, les cytokines, la fibronectine...). Seulement, il faut être conscient que la majeure partie des plaquettes restent piégées au sein du culot d'hématies...<sup>[14]</sup>

Afin d'accroître cette concentration statistique en un point précis du tube, il faut pouvoir affiner la séparation des éléments figurés du sang (hématies, leucocytes, plaquettes). Pour cela, il n'existe qu'une seule possibilité : accroître la force de centrifugation appliquée au prélèvement sanguin. C'est ainsi que les séparateurs de cellules utilisés en hématologie fonctionnent : ils centrifugent en moyenne à 3 000 g... L'inconvénient d'une telle méthode, c'est qu'elle augmente considérablement l'activation des plaquettes, qui relarguent alors ces précieux facteurs de croissance que l'on cherche précisément à concentrer.<sup>[17]</sup> Or, évidemment, il faut s'attendre à en perdre la majeure partie dans le plasma acellulaire qui est presque totalement éliminé dans ces protocoles de plasmaphérèse (le plasma acellulaire est éliminé en premier).

C'est ainsi que tous les protocoles couramment utilisés pour obtenir du cPRP s'appliquent à maintenir des forces comprises entre 160 g et 800 g lors de la première centrifugation. À 400 g, le pourcentage d'activation des plaquettes est de l'ordre de 5 % seulement,<sup>[21]</sup> contre entre 40 et 70 % à 3 000 g.<sup>[17]</sup> Cependant, l'une des premières études sur les bénéfices du cPRP, qui démontrait alors les bienfaits présumés de ces gels de plaquettes pour la maturation des greffes osseuses,<sup>[15]</sup> fut réalisée avec des vitesses initiales atteignant, selon nos évaluations, plus de 1 200 g. Et pourtant, dès 1 650 g, le pourcentage d'activation atteint entre 20 et 40 %...<sup>[17]</sup>

De même, le temps de centrifugation devrait avoir un rôle prépondérant. Cependant, là encore, on découvre dans la littérature des temps allant de 3 minutes 45 secondes<sup>[20, 22]</sup> à 20 minutes<sup>[9]</sup> en première centrifugation. Quant aux associations vitesse et temps, elles ont presque toutes été testées : 6 minutes à 160 g,<sup>[13]</sup> 10 minutes à 160 g,<sup>[21]</sup> 20 minutes à 205 g,<sup>[9]</sup> 3 minutes 45 secondes à 800 g...<sup>[20]</sup>

Il est en réalité strictement impossible de fonder la moindre corrélation précise et sérieuse entre critères de centrifugation et qualité du cPRP (cf. infra), ceci étant dû aux grandes variations interindividuelles de constitution du sang et au manque de définition des technologies de centrifugation, puisqu'on leur cherche une fonction qui n'est pas la leur. Il n'en demeure pas moins que, tant que l'on reste dans des forces modestes (en moyenne 400 g), on peut espérer ne pas trop stresser les plaquettes. De même, les temps de centrifugation se doivent d'être suffisants pour permettre la séparation des éléments sanguins et il semble couramment admis que l'on obtient des séparations nettes en une dizaine de minutes.

À noter que le problème est légèrement différent en cas de deuxième centrifugation : en effet, on n'a alors plus qu'à séparer tous les éléments figurés résiduels (les plaquettes, mais aussi quelques hématies et leucocytes) de la masse du plasma acellulaire. Tout en maintenant des forces modestes pour ne pas endommager les plaquettes, une simple centrifugation permet d'obtenir de bons résultats. Elle est en général décrite comme devant être nécessairement plus longue et plus rapide que la première, mais en réalité, et la comparaison des différents protocoles le démontre (certains préconisant des paramètres que l'on retrouve souvent en première centrifugation), on peut conserver la même force et le même temps.

Tout ceci met en évidence un point crucial : la centrifugation, malgré une base physique parfaitement scientifique (loi d'hydrodynamique de Stoke), s'est vu affublée, de par la complexité des liquides biologiques, de fonctions partiellement empiriques, tout autant fondées sur l'expérience que sur la physique des fluides. Il est donc très présomptueux de vouloir lui attribuer la capacité de concentrer avec discernement des plaquettes viables et leur précieux contenu ad integrum.

### Quelle concentration de plaquettes doit-on chercher à obtenir ?

Cette question fut l'objet d'un très grand nombre d'études. Sur ce sujet, toutes les machines et tous les protocoles ont été comparés, et il est totalement inutile d'en faire une liste exhaustive. Cela pour une simple raison : dans un sang humain total sain, les concentrations plaquettaires par microlitres peuvent osciller de 150 000 à 450 000, ce qui a pour conséquence de faire varier les concentrations plaquettaires au sein des cPRP de 50 000 à plus de 2 000 000. Autrement dit, il n'existe aucune corrélation entre les concentrations plaquettaires mesurées dans le sang total et celles obtenues dans le cPRP issu de ce même sang.<sup>[23]</sup>

Même en utilisant un séparateur de cellules à flux discontinu emprunté aux hématologues (méthode nettement plus précise que les systèmes simplifiés), on a des variations interindividuelles allant de 600 000 à 2 500 000 plaquettes/ $\mu$ l au sein du cPRP ainsi produit. Et aucune corrélation fiable avec l'âge et le sexe du donneur n'a pu être mise en évidence.<sup>[23]</sup> Certains ont donc défini le cPRP comme un concentré à plus d'un million de plaquettes/ $\mu$ l, dans la mesure où ils considèrent avoir eu des résultats cliniques significatifs à des concentrations de cet ordre.<sup>[24]</sup>

Les chiffres cités précédemment ne servent qu'à donner des ordres d'idée. Et cela nous amène à évoquer ce redoutable écueil : en cherchant à compter minutieusement des plaquettes et à comparer des protocoles très proches, on finit par trouver des écarts significatifs qui n'ont aucun sens. C'est là tout le problème de la signification que l'on peut accorder aux résultats chiffrés et la part de l'interprétation humaine dans le raisonnement scientifique.

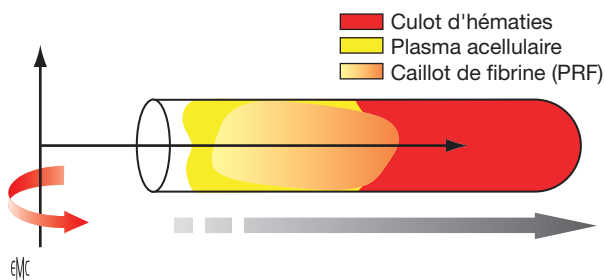
Au final, presque tout le monde a oublié l'origine de ces technologies : les colles biologiques. Et personne n'est en mesure de dire si l'effet positif des concentrés plaquettaires, s'il y en a, est dû aux plaquettes ou à la colle de fibrine autologue produite simultanément.

### Quelles corrélations avec les précieuses cytokines plaquettaires ?

Si l'on cherche à concentrer des plaquettes, c'est pour les cytokines qu'on espère les voir relarguer. Là encore, de nombreuses études ont tenté d'en évaluer les concentrations. Cependant, quel intérêt de mesurer des concentrations en cytokines plaquettaires si l'on ignore le pourcentage de plaquettes activées au cours de la préparation du concentré ? En effet, si les cytokines comptabilisées viennent des plaquettes, plus l'activation est importante, plus la quantité de cytokines mesurée est élevée. Mais comment connaître avec précision le niveau d'activation plaquettaire ?

Pour cela, il existe un marqueur très fiable : l'antigène CD 62. Bien peu de publications y font référence<sup>[17, 21]</sup> et pourtant il démontre que, en fonction de la vitesse de centrifugation, on a un pourcentage d'activation plaquettaire qui évolue énormément : de 5 % à 400 g à plus de 60 % à 3 000 g.

Dans de telles circonstances, quel crédit donner à des mesures de concentration de cytokines si d'une méthode à l'autre, de par les nuances de protocoles, on obtient des activations plaquettaires très variables. Ces concentrations n'ont donc aucun sens au plan technologique. Si l'on rajoute à cela des variations interindividuelles au moins aussi criantes que pour le nombre de plaquettes, on imagine bien le flou complet qui règne dans ce domaine.



**Figure 8.** La centrifugation de sang total, immédiatement après le prélèvement, permet la constitution d'un caillot de fibrine structuré et résistant au cœur du plasma acellulaire et s'étendant jusque dans les premières strates du culot d'hématies.

La conséquence de toutes ces remarques se découvre dans la littérature : aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre concentrations en cytokines du cPRP et concentrations plaquettaires du sang total ou même du cPRP. [22, 25] Aucune corrélation également entre concentrations de cytokines du cPRP et l'âge ou le sexe du donneur. [25]

Au final, la seule certitude concernant les cytokines plaquettaires, c'est qu'elles sont toutes massivement relarguées au moment de la gélification, lorsque thrombine et chlorure de calcium provoquent l'activation massive de toutes les plaquettes du cPRP (ce qui est confirmé par la recherche de l'antigène CD 62). [21] Malheureusement, à ce moment-là, la formation du gel rend impossible les dosages de ces cytokines (la lecture optique des tests *enzym-linked immunosorbent assay* [ELISA] ne peut se faire que dans un liquide de faible viscosité).

De plus, il faut bien comprendre que, quelle que soit la quantité de plaquettes ou de cytokines que l'on piège dans la colle de fibrine, personne n'est en mesure de démontrer que ces ajouts soient suffisants pour avoir les effets biologiques escomptés.

## Technologie du PRF

### Modus operandi

Le PRF a été mis au point en France par Choukroun et al. [26] Cette technique ne nécessite ni anticoagulant, ni thrombine bovine (ou tout autre agent gélifiant). Il ne s'agit que de sang centrifugé, sans aucun ajout, ce qui lui permet d'esquiver toutes les restrictions des lois françaises liées à la réimplantation de ce qui pourrait être considéré comme un dérivé de produit sanguin.

Le protocole est très simple : un prélèvement de sang total est réalisé dans des tubes de 10 ml sans anticoagulant qui sont immédiatement centrifugés à 3 000 tours/min (soit environ 400 g selon nos calculs) durant 10 minutes.

L'absence d'anticoagulant induit l'activation, en quelques minutes, d'une grande partie des plaquettes contenues dans le prélèvement au contact des parois du tube, et le déclenchement des cascades de réaction de la coagulation. Le fibrinogène est dans un premier temps concentré dans la partie haute du tube, avant que la thrombine circulante ne fasse son effet et ne le transforme en fibrine. On obtient ainsi un caillot de fibrine en plein cœur de la masse de plasma acellulaire (Fig. 8), avec un maximum de plaquettes piégées au sein des mailles de fibrine.

La réussite de cette technique repose entièrement sur la rapidité du prélèvement et du transfert vers la centrifugeuse : en effet, sans anticoagulant, le sang prélevé commence à coaguler dès qu'il entre en contact avec le verre du tube. Or, il faut au moins quelques minutes de centrifugation pour concentrer le fibrinogène dans la zone médiane et supérieure du tube, seule solution pour obtenir un caillot de fibrine chargé de sérum et de plaquettes utilisable cliniquement. Si le temps mis pour prélever le sang et lancer la centrifugation est trop important, c'est l'échec, et la fibrine polymérise de façon diffuse dans le tube. On n'obtient qu'un amas flasque et sans consistance de sang vaguement centrifugé.

Au final, le protocole PRF permet donc de recueillir un caillot de fibrine chargé de sérum plasmatique et enrichi en plaquettes.

Et en chassant les fluides piégés dans cette trame de fibrine, on obtient une membrane très résistante à base de fibrine pontée (Fig. 9).

La grande particularité de cette méthode provient de l'absence d'anticoagulant : elle déclenche donc inexorablement l'activation massive d'une grande partie des plaquettes, et ainsi le relargage de toutes les cytokines qu'elles contiennent. Et les études les plus récentes (par dosage comparatif) semblent mettre en évidence que ces molécules solubles sont massivement piégées dans les mailles de fibrine du PRF. [27-29]

### Plaquettes et PRF

Des études hématologiques préliminaires nous ont démontré qu'il ne subsistait aucune plaquette ni dans le surnageant acellulaire (PPP), ni dans le culot d'hématies. Quelques analyses histologiques suffirent à déterminer le positionnement des plaquettes au sein des différentes strates du tube : elles s'accumulent dans la partie basse du caillot de fibrine, principalement à la jonction entre la portion contaminée par les hématies (thrombus rouge) et le caillot de fibrine PRF à proprement parler (Fig. 10,11). Cette dernière observation renforce l'idée que la portion rouge à l'extrémité basse du PRF serait non seulement utilisable, mais même certainement plus efficace encore que la partie haute (Fig. 12).

Enfin, il est très intéressant de noter que le gel de fibrine PRF est imbibé de glycosaminoglycanes circulants et plaquettaires (héparine, acide hyaluronique...). Leur aspect en histologie au bleu alcyan (Fig. 13) suit l'architecture fibrillaire de la fibrine, ce qui laisse présager que ces chaînons glycaniques sont incorporés au sein même des polymères de fibrine. Les glycosaminoglycanes ont une forte affinité pour les petits peptides circulants (tels que les cytokines plaquettaires...) et présentent une grande capacité à guider les migrations cellulaires et l'ensemble des phénomènes de cicatrisation.

## “ Conclusion

La recherche de colles biologiques performantes a donc amené au développement de technologies parallèles dont l'engouement semble intarissable. Et si beaucoup de succès cliniques sont mis en avant, il n'en demeure pas moins une kyrielle de modes de préparation de concentrés plaquettaires.

Pour comprendre leur mode d'action, il est nécessaire de se plonger plus avant dans les mécanismes fondamentaux qui les régissent et essayer d'éclaircir la biologie qui leur est associée.

## ■ Biologie associée

L'engouement brutal pour les préparations à base de concentrés plaquettaires fait souvent appel aux données fondamentales de la recherche en biologie cellulaire pour se justifier. Cependant, si l'on étudie en détail les idées fondatrices de ces technologies, il est intéressant de constater l'importance des flous, les omissions, voire des contradictions.

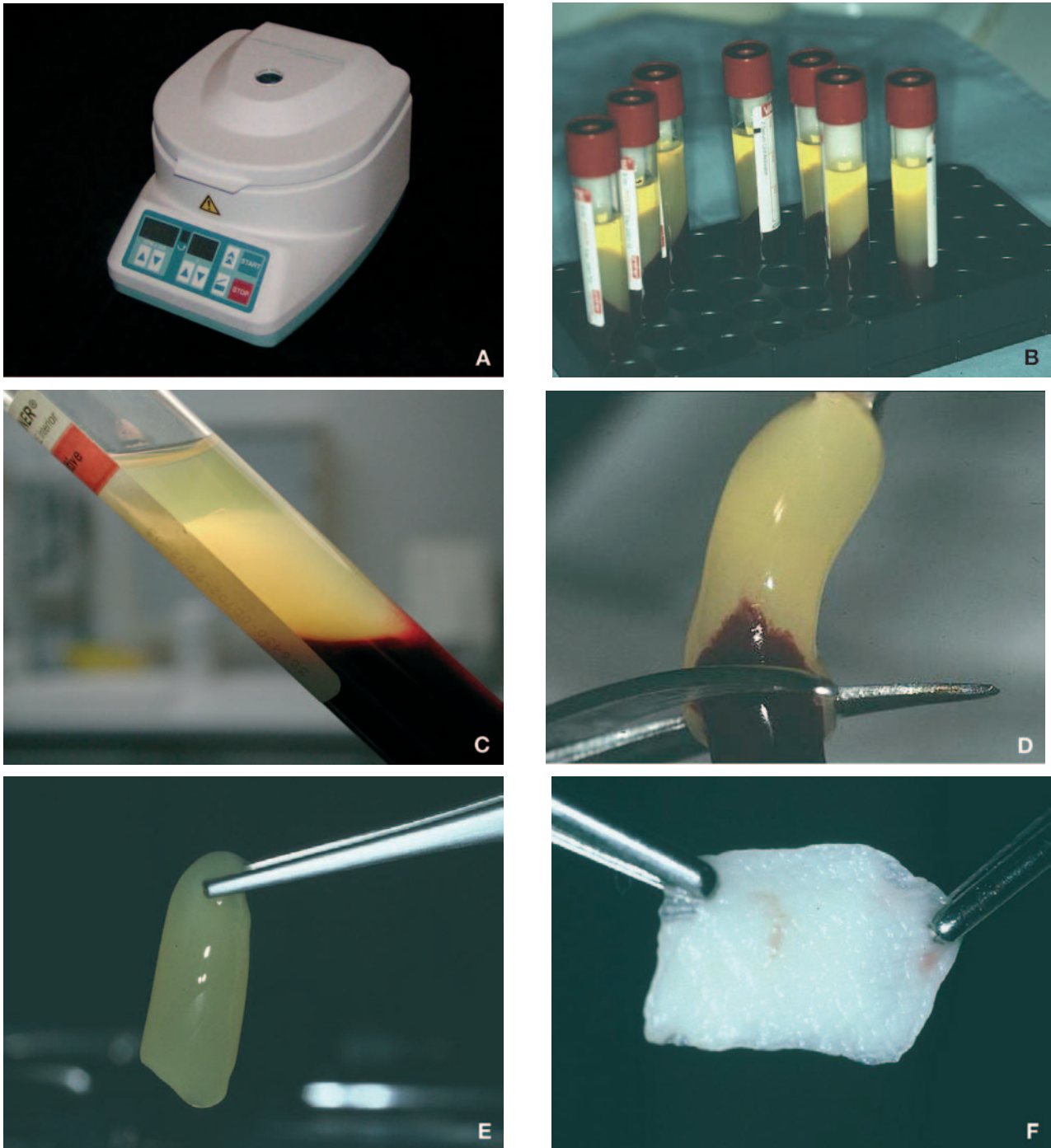
Avant d'entrer en détail dans les biologies que l'on peut associer aux différents types de préparation (cPRP ou PRF), il semble nécessaire de rappeler quelques notions élémentaires. [30]

### Fibrine : molécule clé des concentrés plaquettaires

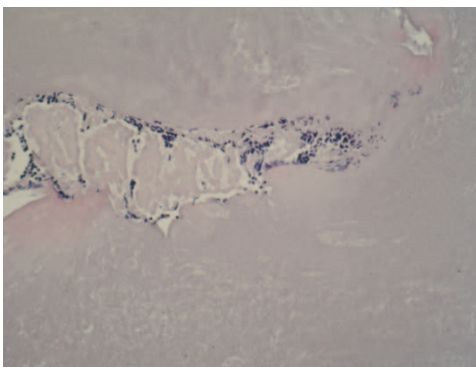
#### Biologie moléculaire et mécanismes élémentaires

##### Qu'est-ce que la fibrine ?

La fibrine est la forme activée d'une molécule plasmatique dénommée fibrinogène. Cette molécule fibrillaire soluble circule



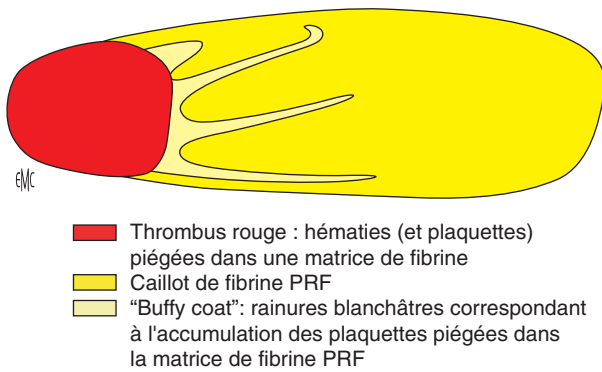
**Figure 9.** La centrifugeuse PC02® de Process (A) permet la production simultanée de huit caillots de fibrine *platelet-rich fibrin* (PRF) (B). Le PRF correspond à la strate solide intermédiaire entre le culot d'hématies (rouge) et le plasma acellulaire surnageant (C). Pour récolter le PRF, il suffit de le sortir du tube, de le séparer avec un ciseau des hématies adhérentes (D, E). Une fois comprimé, le caillot PRF devient une membrane souple et solide prête à l'emploi (F).



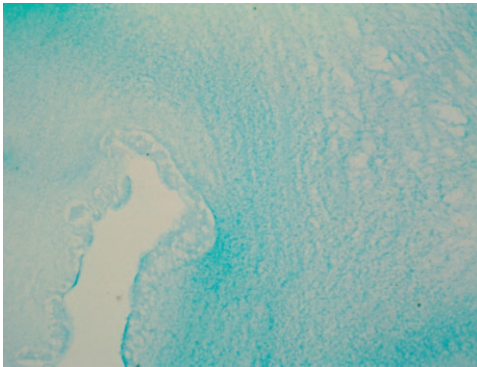
**Figure 10.** La partie inférieure du gel de fibrine *platelet-rich fibrin* est occupée par des rainures blanchâtres qui apparaissent comme des agrégats de fragments cellulaires : ce sont nos plaquettes qui s'accumulent et constituent un *buffy coat* (coloration hémalum-éosine, G = 52 ×).



**Figure 11.** La partie supérieure du gel de fibrine *platelet-rich fibrin* est totalement vierge de structures cellulaires (coloration hémalum-éosine, G = 52 ×).



**Figure 12.** Le caillot de fibrine obtenu selon le protocole PROCESS peut se décomposer en trois parties : un thrombus rouge au contact du culot d'hématies, un gel de fibrine acellulaire et un réseau de colonnes blanchâtres qui correspondent à l'accumulation des plaquettes.



**Figure 13.** Distribution des structures glycaniques au sein du caillot *platelet-rich fibrin* (coloration bleu alcyan pH 1, G = 52 x).

dans le plasma sanguin à une concentration de 2 à 4,5 g/l. C'est une molécule de 46 nm de long dont la masse moléculaire est de 340 kDa. Elle est faite de six chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes  $\alpha A$ , deux chaînes  $\beta B$  et deux chaînes  $\gamma$ . Les chaînes identiques se lient par leur extrémité N-terminale au centre de la molécule au niveau du domaine globulaire E. Les deux extrémités de la molécule contenant les extrémités C-terminales sont des domaines globulaires, appelés domaines D. Le domaine E est lié aux domaines D par des segments où les trois chaînes sont spiralées (Fig. 14).<sup>[31]</sup>

Le fibrinogène est massivement présent à la fois dans le plasma et les granules  $\alpha$  des plaquettes car il joue un rôle déterminant dans l'agrégation des plaquettes entre elles au cours de l'hémostase : il se transforme en une véritable colle capable de consolider l'amas plaquettaire dans un premier temps, puis de former un véritable mur de protection le long d'une brèche

vasculaire au cours de la coagulation. En fait, le fibrinogène est le substrat final de toutes les réactions de coagulation : protéine soluble, il est transformé en fibrine insoluble par la thrombine. Le gel ainsi formé constitue la première matrice cicatricielle du site lésé.

### Fibrine et hémostase

L'hémostase pourrait presque se résumer au colmatage d'une brèche vasculaire à l'aide d'un lit de fibrine, matrice initiale de tout processus de cicatrisation.

La coagulation plasmatique est la succession des réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation du réseau de fibrine qui enserre l'amas de plaquettes fixées sur une brèche vasculaire. Elle fonctionne comme une cascade des réactions d'activation des douze facteurs de coagulation entre eux jusqu'à constituer de la thrombine.

Deux voies d'activation de la coagulation sont classiquement décrites : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque qui se rejoignent au niveau de l'activation du facteur X. Dans les deux cas, la voie finale commune correspond à l'activation du facteur X. Ce facteur, une fois activé, s'intègre dans un complexe appelé prothrombinase qui comprend également le facteur V activé, des phospholipides de la surface cellulaire et du calcium. Ce complexe protéolyse la prothrombine en thrombine. Et la thrombine clive alors le fibrinogène soluble en monomère de fibrine permettant l'initiation de la polymérisation du gel de fibrine.

La thrombine devient alors le nœud de régulation de la coagulation :

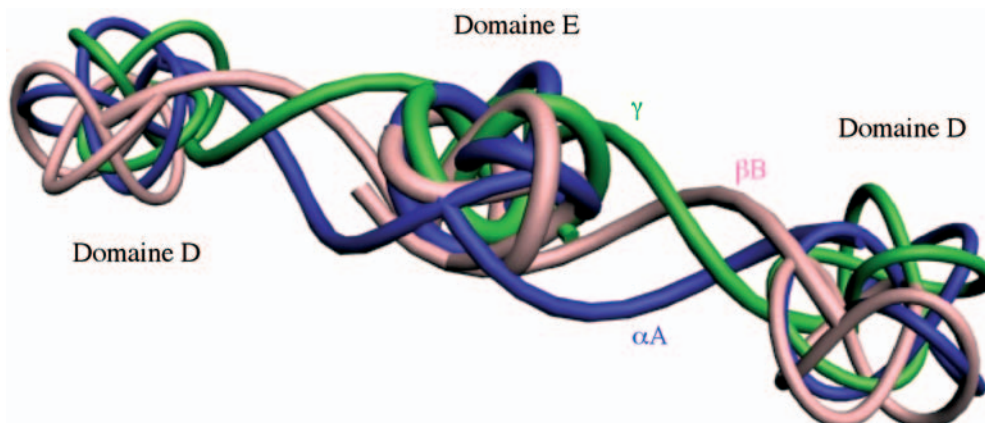
- elle amplifie immédiatement sa propre formation en recrutant et activant les plaquettes passant à proximité, et en amplifiant les réactions qui mènent à sa propre production ;
- elle peut aussi activer d'autres types cellulaires, en particulier les leucocytes et les cellules endothéliales ; en fait, c'est elle qui déclenche les premières étapes de l'inflammation, du remodelage et de la cicatrisation.

Cette dernière remarque pourrait être considérée comme particulièrement troublante : en effet, on ajoute un important volume de thrombine pour faire gélifier le cPRP. Seulement personne n'est en mesure de dire si ces molécules n'ont pas autant d'effets que le concentré plaquettaire lui-même.

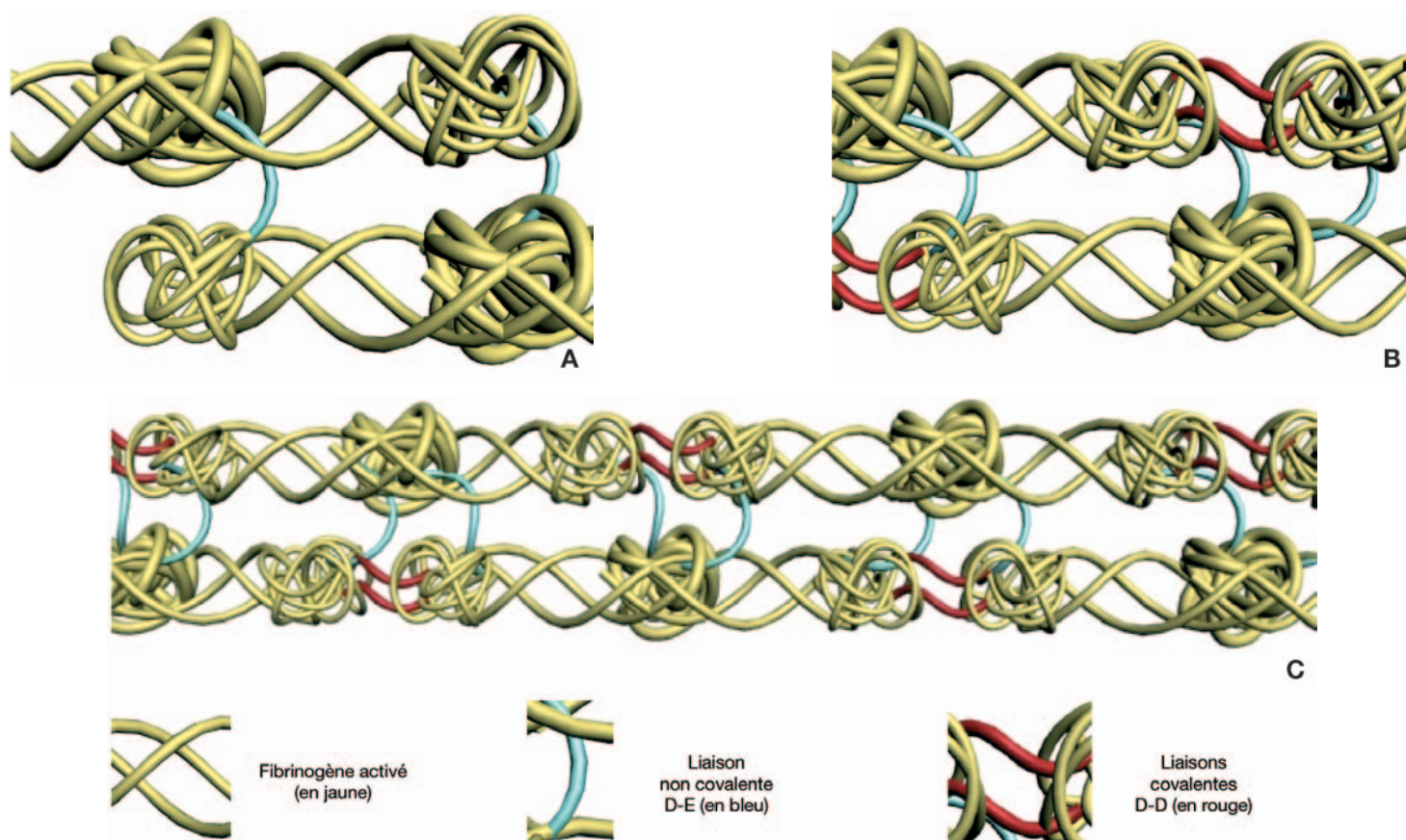
Lorsque la concentration de thrombine formée atteint un certain seuil, la thrombine convertit le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Cette fibrine forme alors une solide enveloppe autour de l'agrégat de plaquettes pour réaliser le caillot.

Une molécule de thrombine peut permettre la polymérisation de 1 000 fois son poids de fibrinogène. Enfin, il est important de noter le rôle fondamental du calcium en tant que cofacteur au cours des cascades de réactions enzymatiques menant à la constitution du gel de fibrine.

La fibrinolyse est la dernière étape de la coagulation, lorsqu'une résorption graduelle du mur de fibrine permet un retour du site lésé à une normalité physiologique. Cette destruction du maillage de fibrine est régulée par l'avancée des travaux cellulaires : le remodelage et la cicatrisation.



**Figure 14.** Modélisation simplifiée en images de synthèse d'une molécule de fibrinogène (D-TEP©v1.3).



**Figure 15.** Modélisation théorique en images de synthèse de la constitution d'une fibrille de fibrine. Dans un premier temps, des liaisons non covalentes permettent l'alignement des molécules de fibrinogène activé (A), puis l'action du facteur XIII permet l'établissement de liaisons covalentes qui stabilisent la molécule de fibrine (B) et permettent l'assemblage d'un long polymère stabilisé (C) (D-TEP©v1.3).

En effet, la dissolution progressive de la fibrine se fait sous l'action de la plasmine, une sérine-protéase issue de l'activation du plasminogène plasmatique. Or, ces mécanismes sont soumis à des inhibiteurs extrêmement puissants qui maintiennent un équilibre fibrinolytique très poussé, de telle sorte que la fibrinolyse n'agisse que là où elle est nécessaire.

### Mécanismes biochimiques de la constitution du gel de fibrine

La thrombine clive d'abord l'extrémité N-terminale des chaînes  $\alpha$ A du fibrinogène. Cela démasque alors les premiers sites de polymérisation du domaine E, qui se lient de façon non covalente aux domaines D de monomères adjacents. Ce même phénomène se déroule dans des chaînes  $\beta$ B du fibrinogène.

L'établissement progressif de ces liaisons (liaisons D-E) non covalentes entre monomères permet la constitution d'une fibrille de fibrine, puis de protofibrilles double-brin et enfin d'un réseau tridimensionnel qui gélifie la solution. [31]

Cependant, ce premier polymère de fibrine est instable, soluble dans l'urée. Il va être stabilisé par un dernier facteur de la coagulation, le facteur XIII (facteur stabilisant la fibrine [FSF]) qui est activé par la thrombine. Ce facteur XIIIa permet aux monomères de se lier entre eux de façon covalente par leurs domaines D (liaison D-D), l'alignement des monomères réalisé par les liaisons non covalentes (liaisons D-E) ayant permis le rapprochement de ces domaines D (Fig. 15).

Le réseau tridimensionnel de fibrine est alors insoluble et emprisonne les globules rouges : le thrombus rouge définitif est ainsi formé.

### Fibrine et cicatrisation

Suite à une lésion tissulaire, le caillot de fibrine va être rapidement colonisé par des cellules inflammatoires, des fibroblastes, des cellules endothéliales qui vont le remodeler en un tissu de granulation puis en tissu conjonctif mature. [32]

En effet, si la matrice de fibrine constituée lors de la coagulation permet d'obturer la brèche vasculaire, elle constitue également un guide essentiel pour orchestrer cette cicatrisation. Par sa configuration spatiale, par l'exposition de ses résidus se liant aux intégrines et par les facteurs de croissance qu'elle renferme, cette matrice de fibrine va permettre le recrutement, la migration, l'adhésion, et orienter la différenciation des différents types cellulaires nécessaires à la reconstruction tissulaire.

De plus, l'association de cette matrice provisoire de fibrine avec la fibronectine stimule l'afflux des monocytes, [33] des fibroblastes [34] et des cellules endothéliales. En fait, il a même été montré qu'une matrice de fibrine ou de fibronectine pouvait moduler la réponse des fibroblastes à certaines cytokines et moduler l'expression des intégrines à la surface des cellules endothéliales. [35]

L'effet capital de cette matrice transitoire sur les différents types cellulaires peut être également évalué lorsqu'elle persiste dans le tissu suite à un défaut de la fibrinolyse. En effet, quand cette matrice ne peut être dégradée, elle semble induire une fibrose du site. Ainsi, des dépôts de fibrine associés à une suppression de la fibrinolyse ont été détectés chez les patients atteints de fibroses pulmonaires. De même, des souris transgéniques surexprimant l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène accumulent plus de collagène suite à une blessure et celles n'exprimant pas le plasminogène ont une cicatrisation cutanée sérieusement retardée. [32]

Enfin, au plan immunitaire, les fibrinopeptides issus de la dégradation de la fibrine par la plasmine [36] sont de puissants chémoattractants pour les neutrophiles et les monocytes.

### Fibrine et angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir des cellules endothéliales des vaisseaux résiduelles. C'est une étape fondamentale pour tout phénomène de cicatrisation.

La rupture de la membrane basale provoque la première stimulation « matricielle » des cellules endothéliales, puis c'est la matrice transitoire constituée de fibrine, de glycoprotéines circulantes (fibronectine, vitronectine...) et de cytokines associées qui orchestre l'angiogenèse. Ces molécules vont en particulier orienter la prolifération de ces cellules ainsi que leur expression de protéases remodelant la matrice.

Pour comprendre les mécanismes qui génèrent la formation des tubes et l'invasion de la matrice de fibrine par les cellules endothéliales, il existe un modèle : des cellules endothéliales de microvaisseaux humains sont incorporées dans une matrice tridimensionnelle de fibrine et forment des structures tubulaires de type capillaire. [37]

Dans ce modèle, pour que l'angiogenèse s'initie, il faut que les cellules soient exposées simultanément à un facteur angiogénique (*vascular endothelial growth factor* [VEGF], *fibroblast growth factor* [FGF] a, b, *hepatocyte growth factor* et angiopoïétine) et à du *tumor necrosis factor* [TNF]  $\alpha$ . [37] Les structures tubulaires sont visibles dès le deuxième ou le troisième jour, puis s'étendent dans le gel de fibrine en un réseau complexe en 5 à 10 jours.

L'étude en microscope électronique de ces gels révèle une dégradation importante de la fibrine adjacente aux cellules envahissantes. Ce qui suggère que de nombreux processus de protéolyse sont menés par les cellules endothéliales. À ce titre, les activités de la plasmine et du PA-u membranaire (activateur du plasminogène) jouent un rôle majeur dans l'invasion de la fibrine par les cellules endothéliales, comme l'ont montré les différentes expérimentations visant à inhiber ces deux protéases. [37, 38] Ceci pourrait expliquer l'importance du TNF- $\alpha$  dans l'angiogenèse. En effet, il induit à la fois l'expression du PA-u et de nombreuses métalloprotéases matricielles (MMP) par les cellules endothéliales. [39]

S'ils permettent d'étudier l'effet des différentes cytokines, les modèles d'angiogenèse permettent également de démontrer à quel point les propriétés structurales de la matrice de fibrine dictent l'angiogenèse. Ainsi, une étude [40] s'est attachée à comparer le comportement des cellules endothéliales dans des gels de fibrine différents au plan structural de par leur pH de polymérisation. Ceux polymérisés à pH 7 sont malléables et opaques, constitués de fibres épaisses. En revanche, polymérisés à pH 7,8, les gels sont rigides, translucides, faits de fibres fines et moins sensibles à la plasmine. Ceux polymérisés à pH 7,4 ont des propriétés intermédiaires. Les cellules endothéliales sont déposées à la surface de ces différents gels. Suite à une induction de type FGFb/TNF- $\alpha$  ou de type VEGF/TNF- $\alpha$ , la croissance des capillaires est beaucoup plus importante dans les gels souples. Cependant, plus le gel est rigide, plus ces structures naissantes sont stables. En effet, les gels pH 7 rapidement lysés perdent prématurément leur fonction de charpente matricielle.

Cette importance de la stabilisation de la matrice de fibrine est connue, en particulier celle permise par le facteur XIIIa ou par la transglutaminase tissulaire. On sait, en effet, que l'administration in vivo de transglutaminase tissulaire et les liaisons covalentes stabilisatrices de la fibrine qui s'ensuivent améliorent la cicatrisation. [41]

D'autres auteurs [42] ont modifié la structure des gels de fibrine en incorporant des héparinoïdes. On aboutit alors à des gels plus rigides, mais également à une croissance plus réduite des structures vasculaires. De même, l'expression d'une fibrine mutée sur un site cible de la transglutaminase tissulaire (stabilisation) modifie l'angiogenèse. L'adhérence des cellules endothéliales n'est pas modifiée, mais la formation des structures tubulaires est remarquablement ralentie [43] en raison de cette différence structurale de la fibrine.

La structure spatiale de la fibrine est donc un élément déterminant de la progression de l'angiogenèse in vitro, tout d'abord parce qu'elle détermine la sensibilité de la fibrine à la protéolyse, et ensuite parce qu'elle module la croissance des cellules endothéliales. De plus, l'incorporation de vitronectine et d'autres protéines plasmatiques améliorerait la colonisation du gel par les différents types cellulaires.

Ainsi, toutes ces études permettent de montrer que la vitesse et la qualité de l'angiogenèse sont modulées par la structure de la matrice de fibrine, les molécules qui y sont associées, mais aussi les protéases que synthétisent les cellules endothéliales et les autres cellules colonisant le caillot.

### Fibrine des concentrés plaquettaires : une matrice idéale

Si la fibrine permet la formation d'un clou plaquettaire dense et résistant au cours de l'hémostase, elle n'a pas qu'une simple fonction de collage. Grâce à son mode de polymérisation qui lui confère une structure pontée capable former un maillage dense, elle est avant tout une matrice très cohérente. Ce qui signifie que la colonisation du caillot de fibrine se fait aisément par les divers types cellulaires participant à la cicatrisation d'un site lésé.

### Cellules et gels de culture

La prolifération cellulaire est stimulée par la présence d'une matrice vierge à conquérir. C'est ce qu'on appelle parfois, en culture cellulaire, un « appel à confluence », un peu comme l'on provoque un appel d'air. Les cellules colonisent et se multiplient. Quel que soit le modèle de culture organotypique, les cellules cherchent toujours à occuper l'espace libre, quitte à se différencier d'un phénotype ostéoblastique jusqu'à un type myofibroblastique, si le milieu dans lequel elles évoluent le nécessite pour leur survie et leur expansion. Et elles ne perdent cette dynamique que lorsque leur matrice (avec laquelle elles entretiennent une relation intime et vitale par le jeu de puissants rétrocontrôles) leur convient et que le jeu des messagers intercellulaires leur donne un « signal tissulaire » : c'est l'information selon laquelle elles ne sont plus seules et doivent réguler leur physiologie en fonction des autres, pour le bien et la survie de la communauté cellulaire organisée à laquelle désormais elles appartiennent. C'est à partir du moment où les signaux reçus par la cellule convergent vers cette sensation d'appartenance tissulaire que le remodelage de l'ensemble du milieu peut se réaliser de façon globalement cohérente.

C'est ce qui est observé au sein des cultures organotypiques et cela explique l'importance d'une matrice organisée, facilement colonisable et modelable, pour potentialiser une cicatrisation, qu'elle soit muqueuse ou osseuse.

### Fibrine et cellules épithéliomésenchymateuses

Pour les fibroblastes et les cellules endothéliales, cette trame de fibrine permet une colonisation rapide, et organisée selon les grands axes du réseau de fibrine, du site lésé. [44] Une fois cette première étape d'expansion réalisée, ces cellules peuvent alors passer au remodelage de leur matrice extracellulaire et remplacer peu à peu la fibrine par des éléments matriciels plus classiques (collagène I, glycosaminoglycane, protéoglycane, glycoprotéines de structure). [45] Parallèlement, le réseau endothélial va se reconstituer afin d'irriguer le site d'un flux vasculaire chargé en plasmine qui finit de dégrader les restes du caillot de fibrine.

Ces mécanismes expliquent l'accélération de la cicatrisation observée sur les tissus mous restaurés à l'aide des différents types de colles de fibrine. Si les facteurs de croissance plaquettaires entrent en jeu, cela ne peut l'être que de façon anecdotique, car pour reconstituer une matrice aussi structurée qu'une gencive, rien ne sert d'accroître massivement le nombre de cellules : il faut seulement rationaliser et faciliter leur travail. C'est à cela que sert une matrice biologique. C'est à cela que servent les colles biologiques à base de fibrine. C'est à cela que servent les concentrés plaquettaires.

### Fibrine et cellules osseuses

Pour les sites intraosseux, les phénomènes sont différents. Si la matrice de fibrine permet la colonisation du site par les ostéoblastes du greffon et les cellules endothéliales des rameaux vasculaires adjacents, elle induit également une réponse ostéogénique très cohérente. [46] Les mécanismes de cette réponse ont

été explorés *in vitro*, et il semblerait que la fibrine puisse diriger la conversion des cellules souches mésenchymateuses en cellules ostéogéniques.

En effet, Gurevich et al. [47] ont démontré en 2002 que le contact prolongé de cellules souches mésenchymateuses médullaires avec des lattis de fibrine induisait la constitution de phénotypes ostéogéniques extrêmement puissants. À ce stade de différenciation, on ne peut même plus parler d'ostéoblastes : les cellules récupérées après un passage sur un lattis de fibrine produisent et organisent spontanément des structures osseuses *in vitro* et surtout *in vivo*, et cela dans un site de greffe aussi isolé qu'une capsule rénale.

Il faut rappeler que ces cellules souches mésenchymateuses sont connues pour leur capacité de différenciation *in situ* en une vaste gamme de types cellulaires, ce qui leur permet de s'intégrer sans difficulté à des tissus aussi variés que la peau, l'intestin, l'estomac, les poumons, le cœur, le muscle squelettique, l'os, le cartilage, le tendon, le tissu adipeux ou encore le tissu nerveux : elles peuvent donc, en fonction du site, acquérir des phénotypes extrêmement variés.

Ces cellules ne sont pas habituées à rester au contact de la fibrine de façon prolongée, sauf dans une seule circonstance : en cas de fracture osseuse avec brèche vasculaire. En effet, dans tous les autres cas de lésions nécessitant la constitution d'un caillot de fibrine, le flux vasculaire se charge d'amener sur site du plasminogène qui, devenu plasmine sous l'effet d'activateurs tissulaires (principalement issus des parois vasculaires), va peu à peu lyser notre fibrine. Seulement, en cas de lésion importante d'un site osseux, une partie du caillot de fibrine se retrouve piégée au milieu des éclats osseux, avec un accès très limité au flux vasculaire. La durée de vie de la fibrine et des rapports qu'elle entretient avec les cellules souches mésenchymateuses, et les cellules piégées sur site de façon plus générale, est donc très augmentée par rapport à la norme physiologiquement constatée. On peut donc envisager une fonction ostéogénique pour la fibrine, même si ce phénomène reste à approfondir.

## Plaquettes

### Plaquettes et fibrinogène

Formées dans la moelle osseuse à partir des mégacaryocytes, ce sont des structures discoïdes et anucléées. Leur durée de vie est de 8 à 10 jours. À l'intérieur de leur cytoplasme se trouvent de nombreux granules dont le contenu est secrété au moment de l'activation.

Les granules  $\alpha$  contiennent de nombreuses protéines spécifiques de la plaquette (facteur 4 plaquettaire,  $\beta$ -thromboglobuline) ou non (fibronectine, thrombospondine, fibrinogène et autres facteurs de coagulation, facteur Willebrand, facteurs de croissance, inhibiteurs de la fibrinolyse, immunoglobulines). Les granules denses contiennent de l'acide adénosine diphosphorique (ADP), du calcium et de la sérotonine... À noter également que la membrane plaquettaire est formée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont insérés des récepteurs pour un certain nombre de molécules (ADP, collagène, thrombine...).

Le fibrinogène est massivement présent à la fois dans le plasma et les granules  $\alpha$  des plaquettes. Il joue un rôle déterminant dans l'agrégation des plaquettes entre elles au cours de l'hémostase primaire et il se transforme en une véritable colle capable de consolider l'amas plaquettaire dans un premier temps, puis de former un véritable mur de protection le long d'une brèche vasculaire au cours de la coagulation.

En fait, le fibrinogène est le substrat final de toutes les réactions de coagulation : protéine soluble, il est transformé en fibrine insoluble par la thrombine.

### Mécanismes d'action des plaquettes

Leur fonctionnement est indissociable des cascades de réaction de l'hémostase primaire. L'adhésion des plaquettes à une surface lésée (telle que le sous-endothélium, grâce à l'action

déterminante du facteur Willebrand) déclenche des signaux intracytoplasmiques qui aboutissent à une série de réponses :

- les plaquettes deviennent sphériques et forment des pseudopodes ; les granules se regroupent et fusionnent avec la membrane plaquettaire ;
- la sécrétion du contenu des granules est brutale ; nombre des molécules libérées ont pour fonction d'amplifier l'agrégation plaquettaire (ADP, sérotonine...), d'autres de la consolider (fibrinogène...).

À ce stade, l'activation des premières plaquettes induit un recrutement en chaîne de toutes les plaquettes passant à proximité, grâce aux actions conjuguées des molécules sécrétées et de celles produites par la plaquette activée (la voie du thromboxane  $A_2$ ). Il s'ensuit la formation d'un clou plaquettaire dense et prêt à supporter le développement de la coagulation.

À noter que l'antigène CD 62 permettant de déterminer le degré d'activation plaquettaire au sein de nos préparations [17] n'est autre que la P-sélectine, une molécule exprimée sur les faces internes des membranes des granules  $\alpha$  et mise à jour au cours de la fusion des granules avec la membrane cytoplasmique, au moment de l'activation plaquettaire.

## Cytokines plaquettaires : que peut-on attendre d'elles ?

### Cytokines et cellules

S'il est toujours question, dans les publications associées aux concentrés plaquettaires, de facteurs de croissance, il convient d'en éclaircir la définition et les fonctions.

Les cytokines sont de petites molécules protéiques dont la fonction primordiale est la communication entre les cellules. Leur mode d'action est donc principalement autocrine (c'est-à-dire qu'elles agissent directement sur le type cellulaire qui les sécrète) ou paracrine (c'est-à-dire qu'elles agissent sur des types cellulaires différents situés à proximité), rarement endocrine (c'est-à-dire action lointaine après transport par voie sanguine, ce qui est le mode d'action des hormones). Et elles sont produites en grande quantité par tous les types cellulaires. Elles sont ce qui se rapproche le plus d'un langage biochimique grâce auquel les cellules prennent connaissance de la présence de leurs voisins et de leur appartenance à un tissu.

Chaque réaction cellulaire dépend d'un grand nombre de facteurs : l'état de la cellule, son degré de différenciation, et son environnement matriciel et cellulaire. Au milieu de tous ces signaux rarement concordants, il appartient à la cellule de faire la synthèse des informations pour en tirer le comportement que la logique biologique codée dans son acide désoxyribonucléique lui impose.

Ainsi, l'association coordonnée dans l'espace et le temps de plusieurs de ces facteurs peut engendrer des réponses très diverses. Et un ajout massif de cytokines plaquettaires au milieu de mécanismes de régulation aussi sensibles pourrait paraître plus que hasardeux.

Il faut donc bien comprendre cette notion : lorsqu'une cytokine stimule une cellule, elle peut l'orienter vers la mitose aussi facilement que vers le suicide programmé (apoptose). Les cytokines ne sont que les mots du langage cellulaire. Sans coordination, ils peuvent dire tout et son contraire. Dans une telle situation, les informations matricielles demeurent un référentiel incontournable. Autrement dit, lorsque les cytokines sont incohérentes, la cellule prend ses ordres dans la matrice qui la soutient.

À noter que certaines cytokines à spectre large ont été surnommées facteurs de croissance (*growth factors*). Si cela ne change rien à leur mode de fonctionnement, les principales cytokines relarguées par les plaquettes activées en font partie : *transforming growth factor* (TGF)  $\beta$ -1, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factors* (IGF) et *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD-ECGF).

## Principales cytokines plaquettaires

### « Transforming growth factor- $\beta$ 1 » : l'agent fibrosant

Les TGF- $\beta$  sont une vaste superfamille de plus de 30 membres, parmi lesquels on retrouve certaines *bone morphogenetic proteins* (BMP). La molécule à laquelle on fait souvent référence en parlant « du » TGF- $\beta$  est en réalité le TGF- $\beta$ -1. C'est l'isoforme la plus souvent rencontrée et le plus massivement produite, non seulement dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, mais de manière plus générale au cours du dialogue intercellulaire. [48]

In vitro, ses effets sont extrêmement variés en fonction de la dose appliquée, de l'environnement matriciel et du type cellulaire. Par exemple, il a été démontré qu'il pouvait stimuler la prolifération des ostéoblastes tout aussi facilement qu'il pouvait l'inhiber. [49]

Si ses effets en termes de prolifération sont très variables, il n'en reste pas moins, pour la plupart des types cellulaires, l'agent fibrosant le plus puissant de toutes les cytokines. [50] Autrement dit, il induit la synthèse massive de molécules matricielles telles que le collagène I et la fibronectine, que ce soit par les ostéoblastes ou les fibroblastes.

Ainsi, bien que ses mécanismes de régulation soient particulièrement complexes, le TGF- $\beta$  peut être considéré un modérateur de l'inflammation, par sa capacité à induire une cicatrisation fibreuse.

### « Platelet-derived growth factor » : le stimulant des lignées mésenchymateuses

Les PDGF sont des régulateurs essentiels de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules de la lignée mésenchymateuse. [51] En fonction de la répartition de leurs différents récepteurs, ils peuvent induire tout aussi facilement une stimulation qu'une inhibition du développement de ces cellules. [52]

Cette position de nœud de régulation joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire et de tous les mécanismes de remodelage tissulaire. À ce titre, les PDGF jouent un rôle critique dans les mécanismes de cicatrisation physiologique et sur la pathogénie de l'athérosclérose et de nombreuses maladies fibroprolifératives (néoplasies, fibroses pulmonaires et rénales...). [53]

### Axe « insulin-like growth factor » : l'agent protecteur des cellules

Les IGF I et II sont des régulateurs positifs de la prolifération et la différenciation cellulaire. De mode d'action autocrine/paracrine mais aussi endocrine, leur pouvoir est considéré comme positif sur la majeure partie des types cellulaires, [54] ce qui inclut malheureusement les cellules cancéreuses (qui détournent le système IGF pour accroître leur capacité de survie). [55] Car, si ces cytokines servent de médiateur de croissance cellulaire, elles constituent avant tout l'axe majeur de régulation de la mort cellulaire programmée (apoptose), en induisant des signaux de survie qui protègent les cellules de nombreux stimuli apoptotiques présents dans le milieu. [56]

### « Epithelial growth factor » et « platelet-derived endothelial cell growth factor » : les stimulants endothéliaux

De découverte récente, le PD-ECGF est une cytokine plaquettaire qui n'agit que sur les cellules endothéliales.

L'*epithelial growth factor* est une cytokine de croissance et de différenciation pour les cellules de lignée ectodermique, ce qui lui permet de stimuler la cicatrisation épidermique et l'angiogénèse.

### Un ensemble cohérent de signaux

Il est intéressant de constater que les catégories de cytokines contenues dans les plaquettes ont principalement pour objectif de stimuler la colonisation et le remodelage du site lésé par les deux types cellulaires essentiels aux premiers temps de toute réparation tissulaire :

- les cellules endothéliales pour remettre en place une vascularisation ;

- les cellules peu différenciées de lignée mésenchymateuse (qui prennent rapidement des allures morphométriques de fibroblastes) pour coloniser et réorganiser la trame matricielle cicatricielle ; [57, 58] or, aux premiers temps de la cicatrisation, cette trame est constituée quasi exclusivement de fibrine.

## Cytokines plaquettaires et cPRP : des signaux positifs mais brutaux et ponctuels

S'il est impossible d'évaluer précisément les quantités de cytokines pouvant induire un effet positif sur la cicatrisation cutanéomuqueuse ou le remodelage osseux, ni même les quantités de cytokines réellement contenues dans les gels de plaquettes (étant donné l'importance des variations interindividuelles), il est cependant possible d'établir des ordres de grandeur permettant de développer un premier raisonnement.

En culture, un prélèvement de tissu gingival produit quelques centaines de picogrammes par millilitre (par milligramme de tissu en culture) des différentes cytokines qui nous intéressent : TGF- $\beta$ -1, PDGF, IGF. En revanche, une simple extrapolation (à partir des résultats d'une étude ayant évalué le pourcentage d'activation plaquettaire avant la mesure du taux de cytokines) [17] permet de dire que les quantités des différentes cytokines potentiellement relarguées par un cPRP à 1 million de plaquettes par microlitre (concentration moyenne espérée dans un cPRP) sont de l'ordre de quelques centaines de nanogrammes par millilitre, soit environ 1 000 fois plus que ce que peuvent produire des cellules en culture. On doit donc considérer que la concentration en cytokines plaquettaires de notre colle de fibrine est importante.

Cependant, l'étape de gélification impliquant forcément l'activation plaquettaire, toutes les cytokines sont relarguées dans la préparation au moment de sa mise en place sur le site opératoire. Or, les cytokines libérées sont instables et n'ont qu'une durée de vie très limitée dans le plasma de façon très générale, [17] et dans un tissu en remodelage en particulier (elles sont endocytosées et souvent détruites après utilisation).

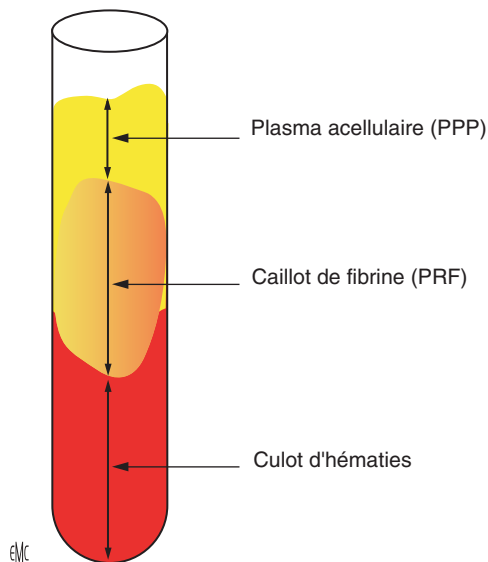
Notons que, in vivo, tout phénomène tissulaire ne peut être obtenu sans une étroite coordination spatiotemporelle des signaux biologiques. Et un apport massif et brutal de cytokines ne peut engendrer qu'un repli des cellules ainsi traitées sur des informations plus fiables telles que leur environnement matriciel : la fibrine.

Ceci est d'autant plus vrai chez les cellules différenciées : dans ce domaine, les études in vitro démontrent que ces cytokines (pourtant considérées comme stimulantes) engendrent des réactions cellulaires qui pourraient paraître contradictoires. [59]

Cette notion évolue lorsqu'il s'agit de types cellulaires indifférenciés : l'ajout de cytokines (extraites de concentrés plaquettaires) sur des cellules souches mésenchymateuses médullaires (indifférenciées donc sensibles aux signaux de stimulation) en culture augmente leur prolifération. Mais seul un support à base de gel de fibrine permet leur différenciation en un phénotype ostéoblastique puissant. [60, 61] Ainsi, dans le cadre de cet article, il semblerait que si les cytokines sont suffisantes pour obtenir des effets locaux temporaires sur les types cellulaires les plus primitifs, les cytokines plaquettaires libérées ne pourraient avoir d'effets à long terme à l'échelle du remodelage d'un tissu.

## Cytokines plaquettaires et PRF

L'usage du PRF est récent et les études biochimiques le concernant sont encore peu nombreuses. Cependant, de premiers résultats publiés ont permis d'établir d'importantes hypothèses de travail concernant la biologie du PRF. En effet, en comparant les valeurs obtenues par dosage ELISA dans le plasma acellulaire et dans l'exsudat du caillot de fibrine PRF avec celles obtenues par d'autres auteurs avec du cPRP, et cela selon une vaste gamme de protocoles différents, il est possible d'affirmer que les cytokines plaquettaires restent majoritairement piégées au sein des mailles de fibrine du PRF, et même vraisemblablement au sein des polymères de fibrine. [27]



**Figure 16.** Les dosages de cytokines par test ELISA ont été réalisés dans le plasma acellulaire (*platelet-poor plasma*), ainsi que dans l'exsudat du caillot de fibrine *platelet-rich fibrin* (PRF). La comparaison de ces dosages avec ceux issus des travaux sur les *concentrated platelet-rich plasma* semble mettre en évidence que les cytokines plaquettaires demeurent piégées au sein des mailles de fibrine du PRF.

En effet, il faut tout d'abord rappeler que, au cours du protocole PRF, l'absence d'anticoagulant dans le tube de prélèvement induit nécessairement une activation massive des plaquettes, renforcée par la présence d'une phase minérale sur les parois du tube sec (poudre de verre résiduelle). Ces cytokines sont de petites molécules que la centrifugation devrait tout naturellement concentrer dans la partie haute du tube, c'est-à-dire dans le surnageant. Or, ce n'est absolument pas le cas. En fait, on ne retrouve la majorité de ces cytokines ni dans le surnageant, ni dans l'exsudat. Elles sont donc restées piégées dans le PRF, au point de ne même plus pouvoir être exsudées, ce qui implique nécessairement une incorporation intime de ces molécules au sein même des polymères de fibrine (Fig. 16).

L'IGF-1 n'y fait pas exception. Seulement, l'IGF-1 est une molécule principalement circulante : dès les premières étapes de la centrifugation, cette cytokine se retrouve concentrée dans la partie haute du tube, ce qui explique l'importance des concentrations qui y sont mesurées. En revanche, l'IGF-1 issu de la dégranulation des plaquettes subira très certainement le même phénomène d'incorporation matricielle que le TGF- $\beta$ -1 et le PDGF-BB plaquettaires.

## Cytokines immunitaires et PRF

La centrifugation de sang total implique nécessairement une activation des leucocytes présents dans le prélèvement. Cependant, seule une étude sur le PRF s'est intéressée à cette problématique, grâce à des dosages comparatifs de cinq cytokines inflammatoires et cicatricielles. [29]

En effet, le PRF présente de nombreux paramètres de développement et de consolidation associés aux gels de culture organotypiques, ce qui a permis de l'assimiler à un « milieu de culture in vivo ». Et les données cliniques semblent démontrer qu'il se comporte comme une matrice propice au développement d'une cicatrisation cohérente sans excès inflammatoire. Cette dernière idée nous a tout naturellement amenés à rechercher, au sein de ce caillot de fibrine, des éléments de régulation et de maintien de l'homéostasie cellulaire et moléculaire suffisamment puissants pour contre-balancer les excès d'une inflammation postchirurgicale. Car, si l'on peut prédire un rôle important aux sécrétions plaquettaires, il ne faut pas oublier

que le sang est un tissu à part entière, ce qui implique une multitude de paramètres pouvant intervenir dans le contrôle des réactions inflammatoires.

## Qu'est-ce que l'inflammation ?

L'inflammation se définit par l'ensemble des phénomènes réactionnels déclenchés par l'organisme en réponse à une agression. Le processus inflammatoire se déroule en trois phases successives : une phase vasculaire, une phase cellulaire et une phase de cicatrisation.

La phase vasculaire se caractérise par l'ensemble des phénomènes permettant le développement de l'hémostase (c'est-à-dire la constitution d'une matrice de cicatrisation à base de fibrine) et facilitant la mise en place d'un nœud leucocytaire (c'est-à-dire l'arrivée sur le site de la lésion de cellules inflammatoires capables de coordonner toutes les forces cellulaires en présence pour les mener à la couverture anti-infectieuse du site et à la protection du développement de la cicatrisation initiale). Au final, il s'agit des processus hémostatiques menant à une coagulation le long de la brèche vasculaire et à la formation d'un lit de fibrine.

Les phénomènes vasoexsudatifs initiaux permettent l'arrivée des leucocytes dans le foyer inflammatoire. Les premiers en place sont les polynucléaires, puis ils sont remplacés par les cellules mononucléées ; parmi celles-ci, les macrophages, qui participent à cette phase grâce à leur plus grande capacité de phagocytose. S'y associent des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène.

Toutes les cellules présentes sur le site inflammatoire sont activées et sécrètent de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance. Les médiateurs de l'inflammation participent au recrutement des fibroblastes, induisent leur prolifération et stimulent leur activité biosynthétique, conduisant à la sécrétion de protéases (métalloprotéases matricielles et plasmine entre autres) et à la néosynthèse des macromolécules du tissu conjonctif. Les médiateurs de l'inflammation mettent en jeu des phénomènes de production en cascade, des synergies d'effet et des boucles d'amplification par le biais notamment du système du complément.

Le processus inflammatoire est donc inhérent à l'acte chirurgical lui-même. Mais l'on constate que l'adjonction de PRF en diminue certains effets néfastes, principalement en corrigeant les excès des processus destructeurs et délétères difficilement contrôlables dans le processus de remodelage rapide mis en œuvre lors d'une agression.

## Cytokines de l'inflammation

Le nombre de médiateurs impliqués dans les poussées inflammatoires est très important. Nous nous sommes donc spécifiquement intéressés à trois des principales cytokines associées à l'inflammation, l'interleukine (IL) 1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Noter que, au cours d'un phénomène inflammatoire, les pics de sécrétion de ces trois cytokines sont synchronisés dans l'espace et le temps. En fait, ces trois molécules constituent à elles toutes seules un chaînon clé de l'inflammation.

### Interleukine 1 $\beta$

L'IL-1 est produite par les macrophages activés, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules de Langerhans... C'est l'un des médiateurs clés du contrôle de l'inflammation.

Elle existe sous deux formes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui correspondent à deux gènes différents mais conservent 27 % d'homologie au niveau protéique. L'IL-1 $\beta$  demeure la forme prédominante.

La synthèse de l'IL-1 est médiée par le TNF- $\alpha$ , les interférons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et les endotoxines bactériennes. Sa principale activité est la stimulation des lymphocytes T *helper*.

À noter que, en combinaison avec le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 apparaît être impliquée dans les lyses osseuses : en effet, il active les ostéoclastes et inhibe la formation d'os.

## Interleukine 6

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire associée au circuit de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ .<sup>[62]</sup> Ses sources principales in vivo sont les monocytes stimulés, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les macrophages, les lymphocytes T et B, les granulocytes, les mastocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes produisent aussi de l'IL-6 après stimulation.

Physiologiquement, l'IL-6 est stimulée par l'IL-1, les endotoxines bactériennes, le TNF- $\alpha$ , le PDGF... L'IL-6 peut aussi stimuler ou inhiber sa propre synthèse.

L'IL-6 est un facteur de différenciation des lymphocytes B in vivo comme in vitro et un activateur des lymphocytes T. En présence d'IL-2, elle induit la différenciation des lymphocytes T matures et immatures en lymphocytes T cytotoxiques.

L'IL-6 est capable d'induire la maturation finale des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines, à condition que ceux-ci aient été préalablement préactivés par l'IL-4. Au sein des populations de lymphocytes B, l'IL-6 stimule violemment la sécrétion d'anticorps : ce taux peut augmenter de 120 à 400 fois.

Enfin, il faut noter que l'IL-6 et l'IL-3 agissent de façon synergique in vitro pour promouvoir la prolifération de cellules souches hématopoïétiques.

L'IL-6 constitue donc avant tout une voie d'amplification majeure des signaux transmis aux cellules de l'immunité. Ainsi, IL-6 favorise le déroulement des cascades de réaction qui mènent à l'inflammation, avec tous les phénomènes de destruction ou de remodelage qui s'y associent.

### « Tumor necrosis factor $\alpha$ »

Le TNF- $\alpha$  est l'une des premières cytokines de la cascade inflammatoire mise en œuvre en réponse aux endotoxines bactériennes. Après stimulation par les lipopolysaccharides bactériens, le TNF- $\alpha$  est sécrété par les macrophages, les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes T. Sa production est sous-régulée par l'IL-6 et le TGF- $\beta$ .

Le TNF- $\alpha$  active les monocytes et stimule le pouvoir de remodelage des fibroblastes. De plus, il augmente la phagocytose et la cytotoxicité des neutrophiles, et module l'expression de médiateurs clés tels que l'IL-1 et l'IL-6.

## Cytokines de cicatrisation

Un pouvoir cicatriciel peut être défini selon deux aspects :

- soit il inhibe les voies inflammatoires, et sous-régule leur amplification et son lot de destructions tissulaires : c'est le cas de l'IL-4 ;
- soit il favorise la mise en place des structures initiales fondamentales pour le développement d'une cicatrisation saine et coordonnée : c'est le cas du VEGF.

## Interleukine 4

L'IL-4 est produite principalement par une sous-population de cellules T activées (TH2, CD4<sup>+</sup>) qui sécrètent aussi l'IL-6. Elle favorise la prolifération et la différenciation des cellules B activées. Mais ses effets plus généraux sont totalement dépendants de son environnement en cytokines.

Au cours des phénomènes inflammatoires, sa fonction principale semble être de favoriser la cicatrisation en modérant l'inflammation et son cortège de destructions. Par exemple, elle augmente la synthèse de collagène fibrillaire par le fibroblaste<sup>[63]</sup> et inhibe la stimulation de mmP-1 et mmP-3 par l'IL-1 $\beta$ . En fait, elle supprime les voies de transduction des signaux médiés par IL-1 $\beta$ , tels que la stimulation de la synthèse de PGE<sub>2</sub>.<sup>[64]</sup>

Ce rôle de modérateur de l'inflammation est donc très prononcé. Au point que le prétraitement des macrophages par l'IL-4 prévient la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de prostaglandines en réponse à l'activation des cellules par les endotoxines bactériennes ou l'IFN- $\gamma$ .

### « Vascular endothelial growth factor »

Le VEGF est le plus puissant et le plus ubiquitaire des facteurs de croissance vasculaires connus. Il joue un rôle directeur dans le contrôle de nombreux aspects du comportement des cellules

endothéliales, qu'il s'agisse de prolifération, de migration, de spécialisation ou tout simplement de survie. En fait, la simple présence de cette cytokine suffit à déclencher l'angiogenèse, et c'est la combinaison de ses différentes isoformes qui permet de diriger et d'affiner le schéma de croissance du réseau vasculaire.

## PRF : un nœud immunitaire ?

Avec les cinq cytokines précédemment décrites, nous pouvons visualiser une part importante des chaînons inflammatoires, tant dans leur aspects immunitaires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) que cicatriciels (IL-4, VEGF...). Il était donc intéressant de rechercher leur présence au sein du caillot PRF, dont le pouvoir de stimulation de l'immunité et de contrôle des destructions inflammatoires est cliniquement établi.

Pour cela, il fallait étudier, par dosage ELISA, le profil de sécrétion de ces cytokines par les éléments figurés du sang en mesure de le faire (c'est-à-dire principalement les leucocytes) au cours de la réalisation de la matrice PRF.<sup>[29]</sup> Ces dosages permettent d'évaluer leurs effets potentiels sur des matrices en cours de cicatrisation, qu'elles soient minéralisées (os, cartilage) ou non (gencives, peau).

Les résultats publiés semblent mettre en évidence une sécrétion accrue de toutes les interleukines testées, qu'elles soient inflammatoires ou cicatricielles. Leur origine ne peut être que leucocytaire, ce qui signifierait que le mode d'activation lente du sang suffirait à induire une dégranulation accrue des populations de leucocytes. En effet, les comparaisons avec des sangs totaux non activés (plasma) ou activés (sérums) indiquent très clairement qu'un phénomène d'activation se produit au cours de la centrifugation de production de PRF.

De plus, lorsque l'on observe les résultats obtenus sur les cytokines plaquettaires, on peut imaginer que les cytokines que nous avons testées seraient elles aussi piégées au fur et à mesure dans le gel de fibrine en cours de polymérisation : comme pour les molécules plaquettaires, ces cytokines leucocytaires sont relarguées peu à peu dans le milieu et bénéficient certainement d'un piégeage dans les mailles de fibrine.

Seul le VEGF présente des concentrations sérologiques significativement plus élevées que toutes les autres valeurs : il est vraisemblable qu'une partie du VEGF dosé soit issue des plaquettes, ce qui explique l'importance des concentrations sur sang activé. La sécrétion leucocytaire de VEGF peut donc être considérée comme négligeable. Mais les différences constatées entre sang activé et surnageant PPP (ou exsudat PRF) nous rappellent encore une fois l'importance du piégeage des cytokines dans la matrice de fibrine PRF.

Avec une telle teneur en cytokines clés de l'immunité (pro-ou anti-inflammatoires) et de l'angiogenèse, le caillot de fibrine PRF peut tenir lieu de nœud immunitaire. Ses capacités de défense face aux infections ne seraient pas négligeables, tant par le pouvoir chimiotactique de ces cytokines que par leur capacité à faciliter l'accès au site agressé (néovascularisation). Enfin, il est très intéressant de constater la présence de cytokines de rétrocontrôle de l'inflammation, en particulier l'IL-4.

## cPRP et PRF : une même famille d'ajuvants chirurgicaux, mais deux biologies très différentes

### Fibrine : une matrice solide et éprouvée pour le développement cellulaire et tissulaire

Au sein de tous les protocoles de culture cellulaire ou tissulaire, la fibrine est considérée comme un support de culture supérieur en termes d'attachement et de colonisation cellulaire.<sup>[47, 65]</sup> De plus, les protocoles de préparation des concentrés plaquettaires utilisant des prélèvements sanguins, cela implique que le gel de fibrine sera associé à d'autres molécules circulantes, en particulier la fibronectine, qui est une des protéines clés de l'ancrage et de la motilité cellulaire au sein des matrices extracellulaires. La fibronectine circulante a d'ailleurs

## “ En résumé

L'homéostasie tissulaire dépend d'un équilibre fragile entre les activités anaboliques et cataboliques. Et les cytokines jouent un rôle important dans cet équilibre. Si les aspects plaquettaires des cPRP et PRF commencent à être bien connus, il n'en est pas de même des aspects inflammatoires. Les premiers résultats publiés ouvrent donc une nouvelle voie de recherche pour la compréhension de ces technologies, car ils démontrent que le PRF n'est pas seulement un concentré plaquettaire, mais également un concentré immunitaire capable de stimuler les mécanismes de défense de l'hôte au niveau d'un site lésé. Et il est même vraisemblable que la parfaite régulation de l'inflammation constatée sur les sites traités par PRF soit due au rétrocontrôle des cytokines piégées dans le réseau de fibrine et relarguées au cours du remodelage de cette matrice initiale.

déjà été décrite comme capable de potentialiser les effets mitogéniques des PDGF sur les cellules mésenchymateuses [66] et d'accroître ainsi le potentiel de cicatrisation des plaies conjonctives.

De plus, si de nombreuses expérimentations utilisent déjà diverses matrices comme support de diffusion de cytokines, la capacité de la matrice de fibrine à jouer ce rôle est l'une des plus prononcées. En effet, elle est en mesure de se charger de quantités importantes de cytokines (de l'ordre du microgramme) ; mais, *in vitro*, elle diffuse plus de 90 % de son contenu au cours des trois premiers jours de culture. [65] Ainsi, lorsque les cytokines sont ajoutées sur une matrice de fibrine déjà polymérisée, celle-ci ne semble pas en mesure de servir de diffuseur à long terme.

### cPRP : une biologie de colle

À l'aide de toutes les informations issues du raisonnement fondamental, on peut désormais commencer à envisager les effets biologiques de nos préparations.

Le cPRP utilise un sang citraté, c'est-à-dire dont le calcium (cofacteur clé de la coagulation) a été neutralisé par le citrate de sodium. Le fait de déclencher la coagulation plus tardivement à l'aide d'un rajout massif de chlorure de calcium et de l'amplifier artificiellement par de la thrombine bovine (dont le rôle est de provoquer la transformation du fibrinogène en fibrine et la constitution d'un gel malléable) implique deux conséquences :

- la texture de la préparation rend aisée l'imprégnation des surfaces d'un site opératoire par un gel souple de fibrine, contenant des cytokines ; la gélification prend quelques minutes et l'effet de collage n'en est que plus puissant ;
- le mode de polymérisation de la fibrine et d'activation des plaquettes est artificiel, brutal, voire totalement contraire à la physiologie de l'hémostase (cf. supra) ; la matrice de fibrine est donc nécessairement polymérisée de manière violente et désordonnée, ce qui induit une durée de vie relativement faible pour ce réseau de fibrine.

Ces quelques éléments permettent de considérer le cPRP comme une colle biologique dont les effets seraient positifs, mais limités aux temps opératoires (hémostase, ajustage de fragments osseux...) et postopératoires immédiats (fermeture facilitée des berges de plaies). Ce rôle de liant biologique est très positif, dans la mesure où il est mécaniquement capable de faciliter certains actes chirurgicaux et de limiter leurs conséquences immédiates : moins de *stress* biologique, un meilleur contrôle du site opératoire, moins de suites néfastes et donc, au final, une meilleure cicatrisation. Mais il ne semble pas que l'on puisse lui accorder une activité biologique à plus long terme.

### PRF : une biologie de milieu de culture

De nombreux systèmes de culture cellulaire ou tissulaire utilisent des gels à base de collagène ou de fibrine, dans un sérum de culture adapté. Or, on peut tout à fait considérer que le PRF n'est autre qu'un gel de fibrine enrichi en sérum, une matrice chargée en éléments nutritifs adaptée à une colonisation cellulaire efficace.

Utilisé en gel, le PRF peut donc être considéré comme un support de culture tissulaire *in vivo*. En tant que tel, il se doit d'être incorporé à des sites sujets à des remaniements importants, où sa trame de fibrine saurait diriger le développement et le remodelage. Malgré ces étonnantes propriétés biologiques, le PRF présente un inconvénient clinique : étant donné sa consistance massive de caillot, il ne peut pas être utilisé comme une colle, tout au plus comme un liant biologique.

Son utilisation en membrane, après expression de tout le sérum contenu dans le caillot, permet de protéger les sites opératoires et de favoriser les cicatrisations en plans superposés, c'est-à-dire principalement la cicatrisation des tissus mous. Elle agit à la manière d'un lattis de culture en monocouche et facilite la fermeture des plaies cutanéomuqueuses ou gingivales.

L'autre particularité du PRF vient de son mode de polymérisation. L'absence de manipulation du sang (pas d'ajout d'anticoagulants, de thrombine, etc.) signifie que le caillot de fibrine se sera formé de manière naturelle et que la polymérisation de la fibrine aura été parfaitement physiologique. Cela laisse nécessairement entrevoir des différences biologiques importantes entre cPRP et PRF, en particulier au sein des processus de remodelage tissulaire.

### Influence du mode de gélification sur l'architecture moléculaire des polymères de fibrine

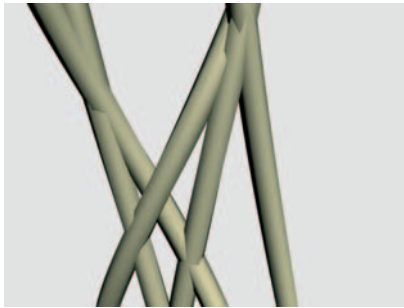
L'une des principales différences entre les colles de fibrine, les cPRP et le PRF provient de leur mode de gélification. En effet, colles de fibrine et cPRP utilisent une association de thrombine bovine et de chlorure de calcium pour déclencher les dernières étapes de la coagulation et la polymérisation brutale de la fibrine. La rapidité de cette réaction est dictée par le mode d'utilisation de ces adjuvants chirurgicaux, et leur fonction hémostatique implique une prise quasi immédiate et donc des quantités de thrombine importantes. Un tel mode de polymérisation influe considérablement sur les propriétés mécaniques et biologiques de la trame de fibrine ainsi constituée. [31]

Le PRF, quant à lui, a la particularité de polymériser naturellement et lentement au cours de la centrifugation. Et les concentrations de thrombine agissant sur le fibrinogène du prélèvement sont quasiment physiologiques, puisqu'il n'y a aucun rajout de thrombine bovine.

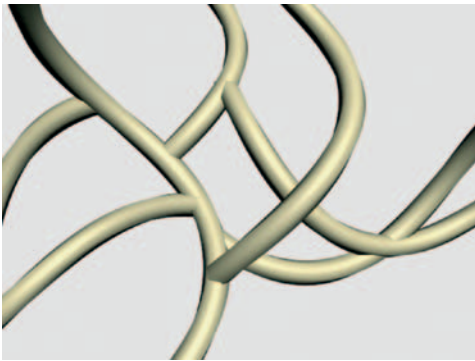
Cet aspect est crucial pour déterminer l'organisation tridimensionnelle d'un réseau de fibrine. En effet, lors de leur gélification, les fibrilles de fibrine peuvent s'assembler entre elles selon deux architectures biochimiques différentes : jonctions condensées tétramoléculaires ou bilatérales, et jonctions branchées trimoléculaires ou équilatérales. [31] Les jonctions bilatérales se constituent à de fortes concentrations de thrombine et permettent l'épaississement des polymères de fibrine : cela mène à la constitution d'un réseau rigide, peu propice à la migration cellulaire et au piégeage des cytokines (Fig. 17). Cependant, de par sa grande résistance, un tel gel convient totalement pour sceller solidement des tissus : on a donc une colle de fibrine, et par extension un cPRP.

À l'inverse, à de faibles concentrations de thrombine, on obtient un très fort pourcentage de jonctions équilatérales. Ces jonctions branchées permettent l'établissement d'un réseau de fibrine en forme de filet à fine maille, favorisant la migration cellulaire et le piégeage des cytokines (Fig. 18). De plus, cette organisation tridimensionnelle donne une grande élasticité au gel de fibrine : c'est ce que l'on observe au sein d'une membrane PRF, solide mais souple et élastique.

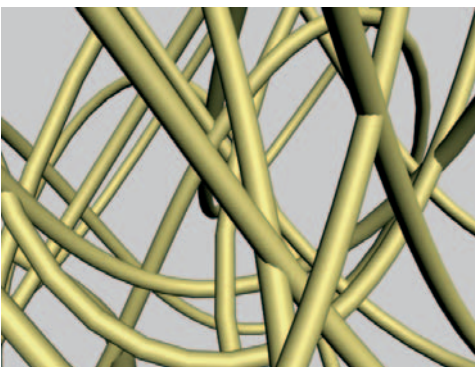
Les différentes technologies des fibrines ont donc des modes de polymérisation différents qui impliquent des mécanismes d'intégration biologique très différents.



**Figure 17.** Modélisation théorique en images de synthèse de jonctions condensées tétramoléculaires ou bilatérales. Noter la rigidité de cette architecture (D-TEP©v1.3).



**Figure 18.** Modélisation théorique en images de synthèse de jonctions branchées trimoléculaires ou équilatérales. Noter la souplesse de cette architecture en filet (D-TEP©v1.3).

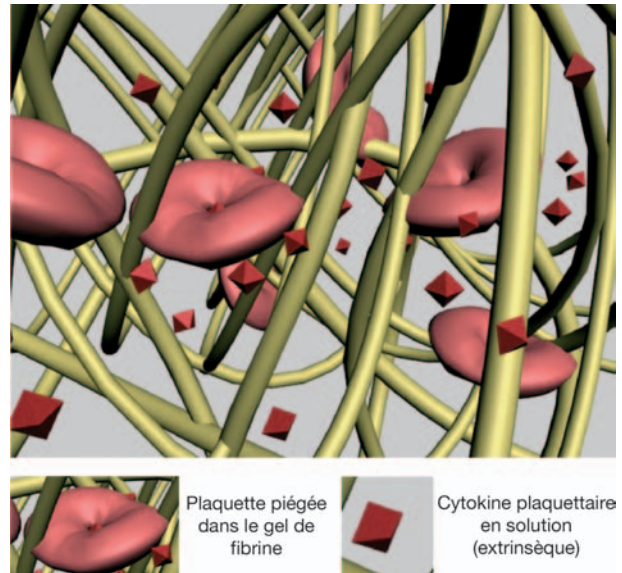


**Figure 19.** Modélisation théorique en images de synthèse d'un réseau de fibrine issu de la polymérisation d'une colle de fibrine. Noter que dans cet exemple on n'a pas représenté de fibronectine piégée dans les mailles du gel, ce qui est pourtant le cas pour une colle telle que le Tisseel® (D-TEP©v1.3).

### PRF et cPRP : polymérisations différentes, biologies différentes

À la différence des matrices de fibrine obtenues dans les protocoles de colles tissulaires, qu'il s'agisse de colles de fibrine simples (Fig. 19) ou de concentrés plaquettaires de type cPRP (Fig. 20), le PRF est issu d'une polymérisation naturelle et progressive au cours de la centrifugation. Le réseau de fibrine ainsi formé présente une organisation tridimensionnelle particulièrement homogène, plus encore que celle des caillots de fibrine obtenus *in vivo*. C'est ce qu'on observe sur les colorations au bleu alcyon : les chaînes glycaniques suivent scrupuleusement l'architecture fibrillaire de la trame de fibrine, ce qui laisse présager des résultats équivalents pour des glycoprotéines de structure aussi importantes pour la prolifération cellulaire que la fibronectine (Fig. 21,22).

De plus, un mode de polymérisation progressif implique une incorporation accrue des cytokines circulantes au sein des mailles de polymérisation (cytokines intrinsèques). Une telle configuration implique une durée de vie accrue pour ces cytokines, puisqu'elles ne sont libérées et utilisées qu'au moment du remodelage de la matrice cicatricielle initiale, lors



**Figure 20.** Modélisation théorique en images de synthèse d'un réseau de fibrine issu de la polymérisation d'un *concentrated platelet-rich plasma*. Les plaquettes activées sont piégées dans la trame de fibrine et dégranulent, libérant ainsi dans le milieu une importante quantité de cytokines qui restent piégées en solution de manière extrinsèque aux fibrilles de fibrine (échelles non respectées) (D-TEP©v1.3).

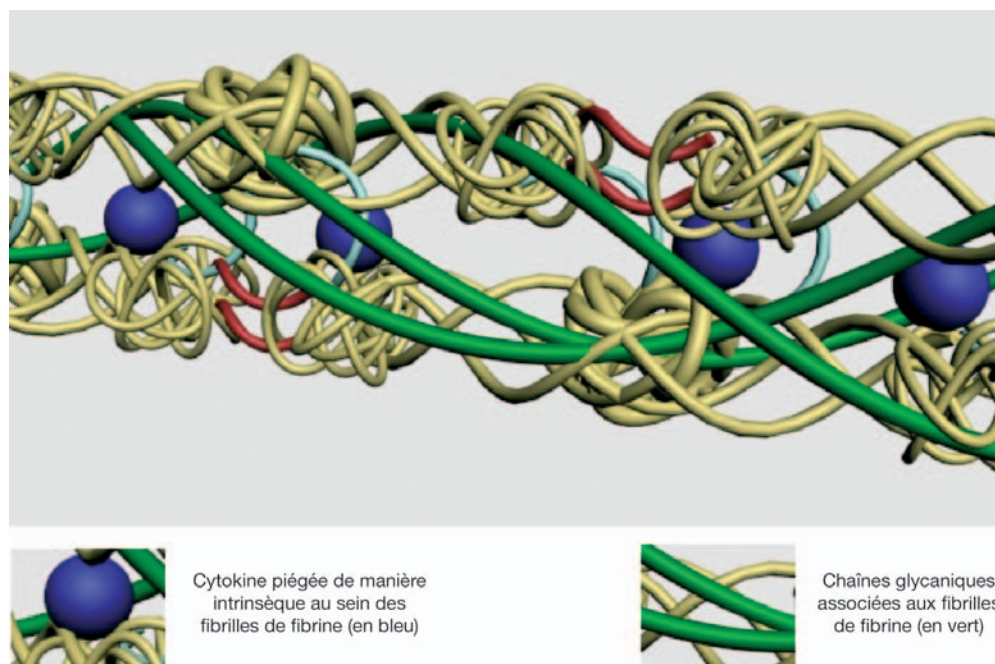
de la dénudation du brin de fibrine (effet à plus long terme). Cela implique également un effet stimulant pour la cicatrisation puisque ces facteurs de croissance n'atteindront leur cible qu'au moment où les cellules seront exactement sur le site de cicatrisation. Les cytokines se maintiennent et sont donc disponibles *in situ* au moment opportun, lorsque les cellules entament la réduction des matrices cicatricielles du site lésé, c'est-à-dire lorsqu'elles doivent être stimulées pour préparer la reconstruction du site.

Enfin, une polymérisation lente à concentrations de thrombine physiologiques implique une architecture matricielle très élastique (jonctions branchées équilatérales entre fibrilles de fibrine) particulièrement propice à la migration cellulaire et à la rétention des molécules en solution (pontage moléculaire en filet).

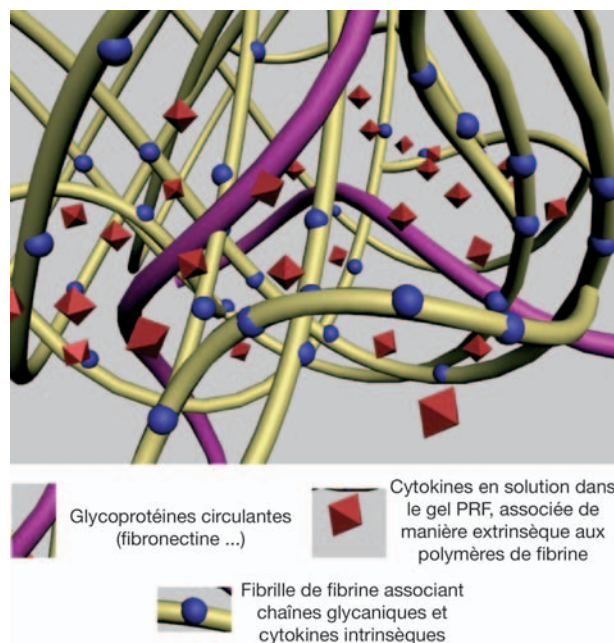
À l'inverse, le mode de polymérisation brutal des cPRP (et des colles de fibrine) nuit à l'incorporation intime des cytokines au sein de la matrice de fibrine. En raison des taux de thrombine élevés nécessaires à la prise rapide de la colle, cette fibrine est pontée de manière rigide (jonctions condensées bilatérales), ce qui rend d'autant plus difficile le piégeage des petites molécules en solution : les cytokines relarguées par les plaquettes sont donc extrinsèques, c'est-à-dire piégées dans la suspension colloïdale entre les mailles du réseau de fibrine au cours de la gélification (Fig. 19,20). Leur élimination physiologique est donc nécessairement rapide, et l'on perd alors une grande part des synergies cytokines/fibrine, ou plus généralement cytokines/matrice, que l'on doit observer au sein du PRF.

L'ensemble de ces paramètres comparatifs permet de considérer le PRF comme un biomatériau de potentialisation de la cicatrisation, et non comme une « simple » colle biologique à base fibrine.

Cette première analyse biochimique des différents strates du PRF semble indiquer que ce biomatériau serait constitué d'un assemblage intime de cytokines, de chaînes glycaniques et de glycoprotéines de structure entremêlées au sein d'un réseau de fibrine lentement polymérisée. L'ensemble de ces composants biochimiques ont des effets synergiques avérés sur la cicatrisation : c'est par exemple le cas de la fibronectine et du PDGF-BB. En effet, en tant que rail à la prolifération et à la migration cellulaire, la fibronectine potentialise les effets stimulants obtenus par le PDGF-BB. Ces données préliminaires mènent donc à penser que le PRF serait un concentré de cicatrisation particulièrement efficace.



**Figure 21.** Modélisation théorique en images de synthèse d'une fibrille de fibrine constituée selon une technique *platelet-rich fibrin* (PRF). Noter que ce mode de polymérisation lent permettrait l'incorporation de glycosaminoglycanes et de cytokines au sein même du polymère de fibrine, ce qui rapproche la structure de notre gel PRF des thrombus de fibrine naturels (échelles non respectées) (D-TEP©v1.3).



**Figure 22.** Modélisation théorique en images de synthèse d'un caillot de fibrine *platelet-rich fibrin*. Noter la présence de glycoprotéines de structure piégées dans la trame de fibrine, ainsi que de cytokines extrinsèques (en solution) et surtout intrinsèques, c'est-à-dire piégées dans les fibrilles de fibrine au cours de leur polymérisation (échelles non respectées) (D-TEP©v1.3).

## Fibrine, concentrés plaquettaires et processus tumoraux

Il s'agit là d'une question récurrente, quelle que soit la technologie des fibrines utilisée.

De manière générale, la mise en place d'un matériau, même autogène, censé accélérer la cicatrisation se doit de prouver son innocuité. Ceci est d'autant plus important sur des sites de cicatrisation après exérèse tumorale, car les cellules mutées ont toujours des réactions prolifératives beaucoup plus rapides que les cellules normales. Et pourtant, ce sont souvent les patients atteints par ces pathologies qui présentent les plus gros troubles de la cicatrisation (chimiothérapies, radiothérapies, polymédications...) et qui auraient donc en théorie le plus besoin d'une

potentialisation de leur modeste potentiel d'autoréparation. Les données actuelles associant fibrine et processus tumoraux permettent de développer des raisonnements thérapeutiques au cas par cas, dans le respect le plus strict du principe de précaution.

Des dépôts de fibrine ou de fibrinogène sont observés dans le stroma de la majorité des types de tumeurs où ils contrôlèrent la croissance des cellules tumorales et la progression des métastases. Ils sont disposés selon des schémas très hétérogènes dans les différents types de tumeurs. [67] Cependant, on les trouve généralement à l'interface entre les cellules saines et les cellules tumorales, [68] ou entre les cellules tumorales et le stroma environnant. Un amas de fibrinogène est une caractéristique des mésothéliomes, des cancers du côlon et des lymphomes.

La matrice extracellulaire de fibrine peut contrôler la prolifération cellulaire de par sa configuration et ses motifs de liaison aux cellules, mais aussi de par sa capacité à séquestrer certains facteurs de croissance. On sait par exemple que le fibrinogène est capable de séquestrer le FGFb [69] et le VEGF. [70] Le VEGF étant très impliqué dans l'angiogenèse, cette séquestration modulerait la vascularisation de la tumeur nécessaire à sa croissance.

Cependant, il est important de rappeler que la fibrine des sites tumoraux est très différente de celle issue de la polymérisation de fibrinogène circulant.

En effet, l'étude des cellules tumorales a permis de montrer que de nombreuses cellules autres que les hépatocytes pouvaient synthétiser le fibrinogène : c'est en particulier le cas des cellules de carcinomes intestinaux, utérins ou pulmonaires. [71, 72] Le fibrinogène sécrété par ces cellules tumorales est souvent incomplet, ne présentant seulement, par exemple, qu'une chaîne  $\beta$ B et une chaîne  $\gamma$ . [73] Cette observation est très rare pour le fibrinogène des hépatocytes sains : en effet, les trois chaînes sont assemblées avant sécrétion et de façon généralement complète. Il est vraisemblable que ces fibrinogènes anormalement constitués, sécrétés par les cellules tumorales, doivent ensuite générer dans la matrice extracellulaire des signaux hérétiques, ce qui contribuerait à entretenir le processus tumoral.

En l'état actuel de nos connaissances, il est encore difficile de porter un jugement sur le risque potentiel de l'utilisation de biomatériaux à base de fibrine sur des sites anciennement tumoraux. Cependant, il faut bien se souvenir que tout site chirurgical se remplit de toute façon d'un caillot de fibrine très

proche du PRF, et cela de façon tout à fait physiologique : cela s'appelle tout simplement l'hémostase et la cicatrisation naturelle.

L'adjonction d'un gel de fibrine issu du fibrinogène circulant présente donc en soi un risque modéré en termes de prolifération tumorale, mais un intérêt très élevé en termes de protection du site chirurgical et de contrôle de la cicatrisation.

La question change de nature lorsque l'on parle de concentrés plaquettaires. En effet, l'ajout ponctuel d'une colle de fibrine enrichie en cytokines plaquettaires peut-il déclencher ou raviver la conversion tumorale d'une cellule ?

Les cytokines plaquettaires sont en quantité importante, mais leur durée de vie dans un tissu vivant en remaniement est très faible : elles sont absorbées et détruites par le tissu, avant même que le drainage vasculaire ne se soit complètement remis en place. Cependant, si leur action est limitée dans le temps, elle peut être suffisante pour raviver violemment la prolifération tumorale : les cellules immortalisées sont bien plus sensibles que les autres aux signaux de croissance. [53, 56]

Pour la fibrine, bien qu'elle ne puisse évidemment pas être considérée comme promotrice du développement des tumeurs, le problème est similaire : un lattis de fibrine pourrait servir de support idéal pour la prolifération initiale de cellules immortalisées par un processus tumoral. Le phénomène demeure peu probable, tant les verrous de sécurité antitumorales sont nombreux. Cependant, sur un site osseux en plein remaniement, la vascularisation, et son lot de lymphocytes antitumorales, macrophages et polynucléaires, prend un certain temps avant d'être totalement reconstituée de façon optimale et cohérente, et ce temps peut être suffisant pour permettre à un reste de cellules cancéreuses de proliférer avec une virulence amplifiée par la qualité de la matrice qu'on leur offre.

C'est pour cette raison que les colles de fibrine autologue, et par extension les différentes techniques de concentrés plaquettaires, doivent encore être manipulées avec intelligence et précaution, en particulier sur les sites d'exérèse tumorale.

## “ Conclusion

En analysant de façon critique l'ensemble des publications portant sur les concentrés plaquettaires de type cPRP, on ne peut que constater l'étendue des spéculations biologiques sur lesquelles sont fondés ces travaux. Cependant, tous reposent sur une idée simple : ces préparations sont au moins des colles ou des liants biologiques à base de fibrine autologue, mécaniquement capables d'améliorer les protocoles chirurgicaux.

Bien qu'appartenant à la grande famille des concentrés plaquettaires comme les cPRP, le PRF représente une biologie alternative, complexe et encore méconnue, qui fait de lui un biomatériau de cicatrisation autologue très différent des autres adjuvants à base de fibrine. Les premières données établies permettent au moins de le définir comme une matrice performante de fibrine, de glycosaminoglycane et de glycoprotéines ayant incorporé de manière intrinsèque une grande quantité de cytokines plaquettaires et immunitaires, le tout gorgé d'un sérum non immunogène car issu de l'individu receveur.

Ainsi, le PRF, bien plus qu'un clou de fibrine piégeant des plaquettes stressées, activées et vidées depuis fort longtemps de leur contenu, est un véritable milieu de culture utilisable in vitro et surtout in vivo. Ce biomatériau extrêmement complet offre un champ d'applications thérapeutiques vaste et encore largement inexploré.

## ■ Applications cliniques

Les récents développements des technologies de concentrés plaquettaires se sont accompagnés d'une multitude d'essais thérapeutiques visant à leur trouver un maximum d'applications cliniques. [74] Si le volume des publications sur le sujet est à la hauteur du violent engouement qu'il a suscité, il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus sont excessivement variables et rarement interprétables.

Ce flou en matière d'évaluation clinique des effets strictement plaquettaires de ces préparations ramène au doute que suscite leur identité biologique : sont-elles des gels aux effets biochimiques induits par les cytokines plaquettaires ou de simples colles biologiques à base de fibrine concentrée ?

Cette question doit guider notre analyse des résultats cliniques publiés.

### Applications cliniques des cPRP

#### Chirurgie ophtalmique : une application anecdotique mais hautement significative

Les concentrés plaquettaires de type cPRP ont été utilisés localement en ophtalmologie en tant qu'adjuvant au traitement chirurgical des déchirures de la macula. [75] L'idée était astucieuse, puisqu'elle reposait sur l'idée que pour combler une déchirure ou un trou il fallait utiliser un liant biologique capable de jouer le rôle de colle. Et si l'on rêvait d'une stimulation biochimique fibroproliférative, au moins espérait-on une meilleure cicatrisation mécanique.

Les résultats dans ce domaine sont intéressants, mais décevants. Si le taux de succès strictement anatomiques de ces interventions est significativement accru grâce aux concentrés plaquettaires, l'acuité visuelle restaurée demeure identique. [76] De plus, et c'est bien plus grave, l'utilisation de ces gels de plaquettes induit une augmentation significative du nombre de réouvertures des trous maculaires fermés chirurgicalement. [77]

Ces premiers résultats nous ramènent aux idées essentielles développées auparavant : les concentrés plaquettaires (les cPRP pour être exact) ne sont rien d'autre que des colles biologiques. En aucune façon elles n'induisent un remodelage structuré et cohérent au sein du tissu traité. Ce ne sont que des adjuvants chirurgicaux et il ne faut pas leur conférer de propriétés biologiques à moyen ou long terme.

Cette notion se retrouve dans tous les domaines où les cPRP furent appliqués.

#### Chirurgie plastique

La grande particularité des chirurgiens plasticiens vient de leur connaissance déjà très ancienne des colles biologiques à visée thérapeutique, [78] telles que le Tisseel®, qu'ils utilisaient déjà couramment afin de limiter le risque de formation de cicatrices chéloïdes, au rendu esthétique et aux qualités mécaniques très préjudiciables. Forts de cette longue expérience, ils détournent partiellement de leur rôle initial les protocoles de préparation développés pour obtenir des concentrés plaquettaires.

En effet, s'ils utilisent le cPRP, ils n'en gardent pas moins le PPP pour jouer les colles de fibrine autologue. [79] En mélangeant la thrombine (et le chlorure de calcium) au PPP, on obtient un gel qui ressemble à peu de choses près à celui de cPRP. Ce gel peut être appliqué sur les plaies cutanées après *lifting* de la face et du cou ou après incision thoracique pour pose de prothèses mammaires en silicone.

Noter qu'il ne s'agit là que d'interventions où les incisions sont minimales et le rendu esthétique essentiel. Il est bien évidemment possible d'appliquer ces gels dans une multitude d'autres sites, mais l'on comprendra aisément que le problème de la cicatrisation disgracieuse est moins crucial lorsque les plaies sont très importantes (comme par exemple après mammoplastie). [80] À cela se rajoute le problème de la quantité de cPRP que l'on peut aisément produire au cours de ces interventions.

C'est donc dans ce domaine d'application que l'on se pose le moins de questions : les colles à base de fibrine de type Tisseel® y sont utilisées depuis fort longtemps, et leur utilité n'est plus à démontrer.

### **cPRP et chirurgies parodontales et implantaire**

Ce champ d'application intervient sur deux types de tissus à la physiologie radicalement opposée : les surfaces mucogingivales (organisées en strates épithélioconjonctives capables d'un remodelage rapide) et l'os alvéolaire (au remodelage lent et complexe).

Utilisé comme une colle biologique, le cPRP sert de liant entre les différents éléments d'une greffe osseuse ou gingivale et de gel de protection du site opératoire, au même titre que les colles de fibrine utilisées antérieurement. [81, 82]

Pour les tissus mous, tous les résultats concordent, même s'ils ne sont jamais mesurés à l'aide de critères quantitatifs : on observe moins de douleurs postopératoires, moins de complications infectieuses ou mécaniques (décollement). La cicatrisation mucogingivale étant fondée sur une colonisation rapide du site et un remodelage linéaire, elle est logiquement stimulée par les synergies de signaux biologiques issus du gel de plaquettes : fibrine et cytokines très actives sur les lignées fibroblastiques et endothéliales. C'est ce qu'on retrouve dans les tentatives de potentialisation des greffes épithélioconjonctives par l'ajout d'un gel de cPRP pour coller et protéger : [83] si le résultat final est identique, les auteurs estiment que les patients souffrent moins et que le site est mieux protégé. De telles conclusions pourraient prêter à sourire, mais ce sont les seules actuellement disponibles.

On retrouve la même problématique dans le traitement des defects osseux alvéolaires. Il existe de nombreuses études sur les effets potentiels du cPRP en combinaison avec divers matériaux de substitution osseuse (os humain anorganique de banque d'os, [84, 85] os bovin anorganique Bio-Oss® [86, 87, 88]) pour combler des lésions alvéolaires angulaires interproximales, [87] interradiculaires [89] ou péri-implantaires. [85] Mais toutes souffrent de la même difficulté à analyser scientifiquement les résultats et à prouver que l'ajout de cPRP est bien responsable d'une réussite de l'acte, dans la mesure où les différents protocoles utilisés sont déjà référencés comme étant capables seuls de générer des résultats similaires. Par exemple, le cPRP associé à du Bio-Oss® et à une membrane de collagène (régénération tissulaire guidée) donne des résultats positifs dans le traitement des alvéolyses angulaires, [87] mais il en aurait été de même sans cPRP, voire avec uniquement du Bio-Oss® ou une membrane seule.

Ces études, basées sur une poignée de cas sans la moindre logique analytique, laissent derrière elles une impression de flou particulièrement gênante pour l'esprit scientifique.

Enfin, dans le domaine de la chirurgie implantaire, il a été mis en évidence que l'application de cPRP sur les parois alvéolaires avant la pose de l'implant induit une surface de contact os-implant accrue au cours des premiers temps de la cicatrisation (6 semaines). Cependant, à plus long terme (12 semaines), on ne retrouve plus aucune différence entre les sites traités par le cPRP et ceux qui ne le sont pas. [90]

Ainsi, l'incapacité systématique des auteurs à disséquer les phénomènes cliniques en données biologiques ne fait que renforcer le raisonnement fondamental. En effet, les données accumulées mènent à l'idée toute simple que, en tant que colle biologique, le cPRP est un atout chirurgical permettant un meilleur contrôle du site d'intervention et une meilleure cooptation des différents éléments tissulaires dans les premiers temps de la cicatrisation. Mais on ne peut lui attribuer un pouvoir biologique à long terme sur la maturation des tissus.

### **cPRP et greffes osseuses**

L'utilisation de colles de fibrine autologue pour solidariser les fragments composant les greffes osseuses est une idée connue et acceptée par tous, [2, 6] car elle permet de limiter les micromouvements, voire les déplacements, incontrôlables des greffons sous l'action des contraintes mécaniques. Or, ce sont ces

microtraumatismes répétés qui induisent inexorablement la formation de séquestres osseux, en empêchant le tissu greffé de se remodeler de façon cohérente au sein du site receveur.

De plus, l'implantation de fibrine dans des defects osseux maxillofaciaux est déjà connue pour stimuler la colonisation osseuse du site. [46]

Cependant, si la fibrine semble posséder ce potentiel ostéogénique très puissant, elle n'en demeure pas moins qu'un gel de support au développement cellulaire. En aucune façon elle ne peut servir seule de nœud d'organisation à un tissu osseux. Cette idée est très clairement illustrée par l'une des rares études véritablement scientifiques dans le domaine de l'évaluation des résultats de greffes osseuses associées au cPRP : [91] dans un crâne de lapin, quatre trous identiques sont faits, puis comblés différemment, le premier avec de l'os autogène de calvaria seul, le second avec de l'os de calvaria et du cPRP, le troisième avec du cPRP seul, et le quatrième est laissé sans rien. Les résultats histologiques sont clairs et précis : la présence d'os autogène permet un comblement parfait, ce qui n'est pas le cas sans ; l'absence ou la présence de cPRP ne change strictement rien aux résultats observés à 1, 2 ou 4 mois.

Face à des résultats aussi limpides, il faut donc rester très lucide quant à la capacité des préparations plaquettaires à avoir des effets spontanés. Ils n'en demeurent pas moins une excellente colle biologique apte à rendre de nombreux services au cours des temps chirurgicaux.

### **Le cas d'école : cPRP et comblement de sinus maxillaire**

Il s'agit là de la situation clinique la mieux documentée. En effet, au cours de la conférence de consensus sur les comblements sinusiens, l'excellent pronostic de la greffe endosinusienne a été établi.

Dans ce domaine, quasiment toutes les associations de matériaux ont été faites avec le cPRP : os bovin anorganique (Bio-Oss®), os humain anorganique (os de banque), os autogène iliaque, [15] temporal [92] ou mentonnier,  $\beta$ -tricalciumphosphate ( $\beta$ -TCP, Cerasorb®)... [93] Mais un grand nombre de ces études souffrent de biais importants, le premier d'entre eux provenant de l'incapacité à évaluer les résultats : la densitométrie osseuse par radiologie n'est pas fiable pour étudier une loge aussi complexe qu'un sinus maxillaire, et les analyses histologiques sont sujettes à l'interprétation du clinicien.

En effet, à la différence des études de greffes osseuses en chirurgie parodontale ou péri-implantaire, le comblement de sinus présente un gros avantage analytique : puisqu'il sert à ménager un volume osseux suffisant pour poser des implants, cela signifie que l'on interviendra à nouveau sur le site greffé quelques mois plus tard et que l'on pourra prélever un fragment du greffon avant de poser les implants. Cette particularité a permis à tous les auteurs qui se sont intéressés aux applications du cPRP au cours des greffes osseuses endosinusiennes de présenter des analyses histologiques de leurs greffons.

S'il s'agit là d'un premier pas vers une cohérence scientifique au sein des études menées sur les concentrés plaquettaires, la démarche souffre d'un gros handicap : l'histologie est délicate sur tissu minéralisé, et il faut savoir ce que l'on cherche à montrer. Or, jusqu'à présent, en l'absence de technologies fiables pour évaluer de manière quantitative ou semi-quantitative le degré de maturation des greffes, au mieux certains [15] se contentent-ils de localiser par immunodétection des récepteurs aux TGF- $\beta$  au sein de cellules du tissu osseux en remodelage : récepteurs quasi ubiquitaires...

Toutes ces remarques nous montrent à quel point il est délicat d'interpréter les résultats publiés dans ce champ d'application clinique. Ceux-ci sont d'ailleurs souvent contradictoires.

Certains trouvent leurs résultats positifs, selon des critères cruellement qualitatifs. On est donc contraint de leur faire confiance lorsqu'ils affirment que leur fragment de greffon est constitué d'un os viable. Seulement, n'aurait-on pas obtenu le

même résultat sans cPRP ? En effet, il s'agit d'études utilisant de l'os anorganique bovin (Bio-Oss®) [94] ou humain (os de banque), [84] ou encore de l'os autogène de calvaria. [92] Or, tous ces matériaux de comblement sont déjà connus pour leur fiabilité dans ce genre de greffes, sans l'aide du moindre adjuvant...

D'autres trouvent des résultats nettement plus inquiétants en poussant l'analyse histologique sur des critères plus pointus : à partir d'une vaste gamme de matériaux de comblement, ils sont tous arrivés à la conclusion que le cPRP favorisait la constitution de nœuds fibroprolifératifs au sein du greffon osseux. Qu'il s'agisse de  $\beta$ -TCP, [93] d'os anorganique bovin (Bio-Oss®) [95, 96] ou humain, [95] ou même de verres bioactifs, [95] tous ces matériaux semblaient évoluer dans un greffon osseux de viabilité réduite (peu d'ostéoblastes) et à la teneur élevée en matrice fibroconjonctive. Et si certains postulaient que la forte teneur en TGF- $\beta$  du cPRP était responsable d'une attraction accrue des fibroblastes sur le site de greffe, [93] personne n'a osé pousser plus loin la réflexion.

Noter que la pose d'implants dans un site de greffe associé au cPRP ne semble pas augmenter leur degré d'intégration à 7 mois. [96]

## Comprendre le PRF : de la biologie des fibrines au biomatériau de cicatrisation

Le PRF se définit comme un concentré plaquettaire et immunitaire permettant de rassembler en une seule membrane de fibrine l'ensemble des constituants favorables à la cicatrisation et à l'immunité présents dans un prélèvement sanguin. Si les cytokines plaquettaires et leucocytaires jouent certainement un rôle important dans la biologie de ce biomatériau, la matrice de fibrine qui leur sert de support demeure sans conteste l'élément déterminant à prendre en compte pour tenter d'évaluer le potentiel thérapeutique réel du PRF.

Afin de mettre en évidence les effets réels de cette matrice de fibrine, il est important d'isoler nos observations cliniques selon quatre aspects bien spécifiques de la cicatrisation : l'angiogenèse, le contrôle immunitaire, la captation des cellules souches circulantes et l'épithélialisation de couverture de la plaie.

### Angiogenèse, immunité et couverture épithéliale

Ce sont les trois éléments clés de la cicatrisation et de la maturation des tissus mous. Les membranes de PRF peuvent y jouer le rôle d'un pansement de fibrine, c'est-à-dire d'une matrice capable de supporter simultanément le développement de ces trois phénomènes.

#### Fibrine, guide naturel de l'angiogenèse

L'angiogenèse, qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux, requiert une matrice extracellulaire dans le lit de la plaie afin de permettre aux cellules endothéliales de migrer, de se diviser et de changer de phénotype.

Les principaux facteurs solubles impliqués dans l'angiogenèse sont le FGFb, le VEGF, l'angiopoïétine et le PDGF. Quant à la matrice de fibrine, il a été montré qu'elle est capable d'induire directement l'angiogenèse. [97] Cette propriété capitale peut s'expliquer par la structure tridimensionnelle du gel de fibrine, mais également par l'action conjuguée des cytokines qu'il enserme dans ses mailles. Certains auteurs [35, 69] indiquent en effet que le FGFb et le PDGF peuvent se lier à la fibrine avec une assez haute affinité. La liaison de nombreux facteurs de croissance différents à la matrice de fibrine pourrait expliquer cette induction directe de l'angiogenèse.

De plus, les modèles développés par Nehls et Herrmann [98] ont permis de montrer que la structure de cette matrice est également déterminante, puisque la rigidité de celle-ci influence considérablement la formation de tubes par les cellules endothéliales en réponse au FGFb ou au VEGF. Cet aspect a déjà été discuté précédemment, car il est crucial pour comprendre la différence de cinétique biologique entre colle de fibrine, cPRP et PRF.

Enfin, il est important de rappeler que l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  (qui permet aux cellules de se lier à la fibrine, à la fibronectine et à la vitronectine entre autres) par les cellules endothéliales est une étape importante de l'angiogenèse. Or, une fine régulation de l'expression de cette intégrine par les cellules endothéliales serait dirigée par la matrice de fibrine elle-même. En effet, en culture, la fibrine induit l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  à la surface des cellules endothéliales humaines, [35] induction dont n'est pas capable le collagène...

#### Fibrine, support naturel de l'immunité

Les produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène stimulent la migration des neutrophiles et augmentent l'expression à leur surface du récepteur CD11/CD18. Ce récepteur permet l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et leur transmigration, mais aussi l'adhésion des neutrophiles au fibrinogène. [99] De plus, ces éléments issus de la fibrine modulent la phagocytose et les processus de dégradation enzymatique menés par ces cellules. [100]

Les monocytes arrivent plus tard que les neutrophiles. Il a été montré que la colonisation de la plaie par les macrophages est contrôlée par la fibronectine, par les propriétés physicochimiques de la matrice tridimensionnelle de fibrine et par les agents chémoattractants qu'elle enserme dans ses mailles. [33] Par exemple, les dimères de fragments D de fibrine ajoutés au milieu de culture de promonocytes humains augmentent leur sécrétion d'IL-1 et de PA-u, [101] ce qui implique un rétrocontrôle positif de la fibrine sur les cascades inflammatoires.

#### Fibrine et recouvrement des plaies

La matrice de fibrine guide la cicatrisation de couverture des sites lésés en intervenant sur deux grands types cellulaires qui constituent les strates des tissus de recouvrement : cellules épithéliales et fibroblastes.

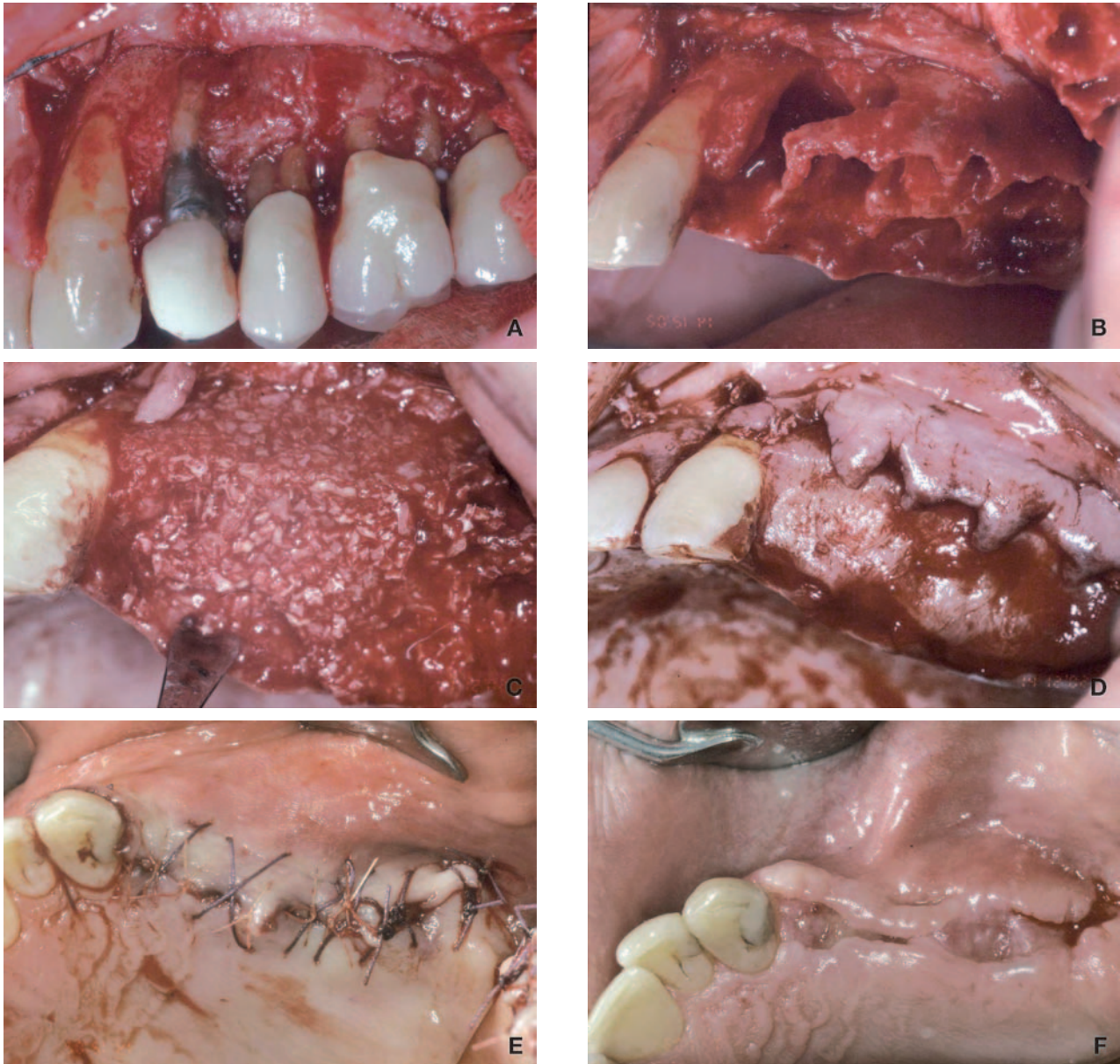
Sur les berges d'une plaie, les cellules épithéliales perdent leur polarité basoapicale pour émettre un prolongement du côté basolatéral libre. Les cellules migrent alors sur la matrice transitoire faite de fibrinogène, de fibronectine, de tenascine et de vitronectine. Cette migration consiste plus en une véritable digestion de cette matrice guide qu'en une simple translation.

La fibrine, la fibronectine, le PDGF et le TGF- $\beta$  sont autant d'agents essentiels pour la modulation de la prolifération, de l'expression des intégrines et de la migration des fibroblastes de la plaie. [102] Ceux-ci peuvent se lier directement avec la fibrine par différentes intégrines dont l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Et ils développent une importante activité protéolytique pour se déplacer au sein du caillot de fibrine (grâce à l'expression de deux activateurs du plasminogène). De plus, la migration de fibroblastes de rat dans des gels de fibrine (in vitro) est optimale lorsqu'il existe un maximum de liaisons croisées entre chaînes  $\alpha$ . [34] Cet aspect représente l'une des principales différences entre les polymérisations violentes des colles de fibrine (et par extension des cPRP) et la gélification lente du PRF (cf. supra).

Après la migration et la digestion de la fibrine, les fibroblastes s'orientent vers la synthèse collagénique comme le montre un modèle de cicatrisation in vitro fait de fibroblastes ensemencés dans des gels de fibrine. [103]

#### Implication clinique

Ces éléments de réflexion fondamentaux nous permettent d'envisager le PRF comme un pansement de fibrine perméable au développement d'une microvascularisation et capable de guider la migration des cellules épithéliales à sa surface. Les intérêts d'une telle membrane sont donc évidents : protéger les plaies ouvertes et accélérer leur fermeture. À cela se rajoute l'effet stimulant d'un maillage de fibrine sur la colonisation d'un site lésé par les cellules immunitaires, ce qui est d'autant plus important pour des plaies ouvertes soumises aux agressions bactériennes extérieures, ou au sein d'un site déjà infecté dont on aimerait faciliter la cicatrisation en contrôlant les phénomènes inflammatoires souvent violents qui s'y déroulent.



**Figure 23.** Les avulsions dentaires et le comblement osseux sur site alvéolaire de grande étendue en parodontite terminale (A) demeurent des interventions délicates en raison de l'impossibilité de refermer de manière non traumatique les berges de la plaie au-dessus des alvéoles et de contrôler totalement les séquelles infectieuses et kystiques au moment de leur débridement (B). Après comblement des alvéoles résiduelle à l'aide d'os allogénique Phœnix de TBF® (C), l'utilisation du *platelet-rich fibrin* comme membrane de couverture (D, E) permet une néoangiogenèse et une épithélialisation rapides du site tout en neutralisant les phénomènes infectieux, ou au moins inflammatoires, générés par l'infection entretenue de ce secteur alvéolaire. À 48 heures, la plaie est totalement refermée et les fils de suture peuvent être retirés (F).

L'exemple le plus simple demeure l'obturation d'une alvéole à l'aide d'un caillot PRF : on observe rapidement une néovascularisation se former à travers le caillot et le recouvrement rapide de la surface de PRF par des couches épithéliales de plus en plus épaisses. Enfin, malgré l'état inflammatoire et infectieux de certains sites alvéolaires atteints de parodontopathie, on observe une cicatrisation rapide du site sans douleur ni suites, sèches ou purulentes (alvéolites, etc.) (Fig. 23).

### Angiogenèse et captation des cellules souches

Au cours de tout phénomène d'hémostase et de cicatrisation, le caillot de fibrine piège les cellules souches circulantes amenées sur le site lésé grâce aux néovascularisations initiales. Enchâssées dans la matrice de fibrine, ces cellules convergent vers un phénotype sécrétoire permettant l'accélération de la fermeture des brèches vasculaires et tissulaires.

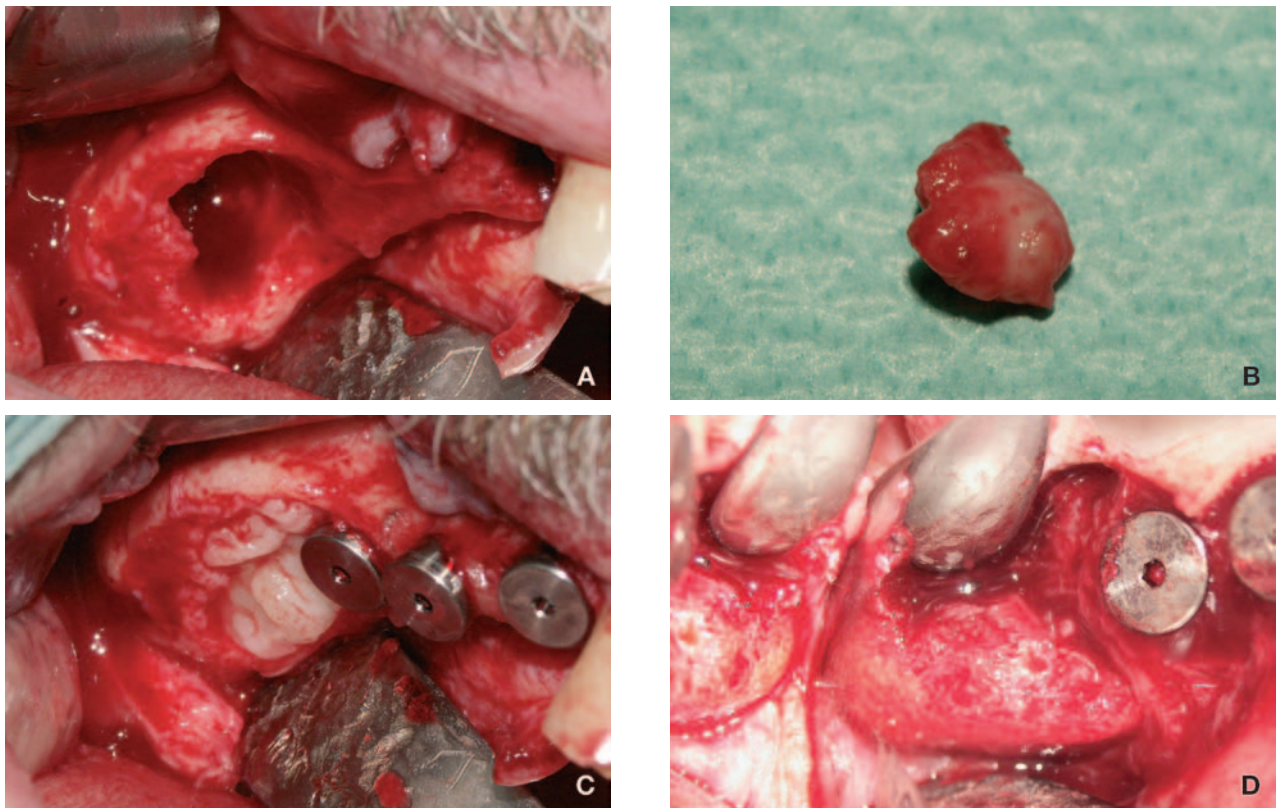
Le PRF, en tant que pansement de fibrine, peut servir de filet à cellules souches circulantes, en particulier lorsque une angiogenèse accélérée s'est étendue au sein de cette membrane de fibrine. Cet aspect est d'autant mieux évalué au sein de sites

osseux ayant subi de grands délabrements. En effet, de telles cicatrifications nécessitent l'accumulation de cellules souches médullaires sur site et leur conversion vers un phénotype ostéoblastique.

### Fibrine et cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse contribuent au renouvellement de l'ensemble des types cellulaires mésenchymateux de l'os, mais participent également à la cicatrisation de nombreux autres tissus. Ces cellules indifférenciées seraient recrutées à partir du sang de façon privilégiée vers les tissus conjonctifs lésés, [104, 105] où elles seraient alors capables de se différencier en de nombreux types cellulaires différents. Mais cette différenciation initiale se réalise nécessairement au sein d'une matrice transitoire cicatricielle constituée de fibrine et de fibronectine.

C'est pourquoi on utilise préférentiellement la fibrine comme support matriciel pour greffer ces cellules. Plusieurs auteurs ont ainsi démontré qu'une matrice de fibrine est un bon support pour greffer des cellules souches mésenchymateuses sur un site



**Figure 24.** Lors des exérèses kystiques volumineuses des maxillaires (A, B), la présence de parois résiduelles sur le site chirurgical suffit à permettre la reconstitution naturelle d'un tissu osseux au bout de 1 année : le thrombus constitué sur le site d'intervention suffit à piéger les cellules souches circulantes et à guider la cicatrisation. L'obturation de la cavité kystique avec du *platelet-rich fibrin* (C) permet d'accélérer ce phénomène naturel. En moins de 2 mois et demi, le site d'exérèse est complètement comblé par un tissu osseux dense et corticalisé (D).

osseux afin d'obtenir une régénération osseuse. [106-108] Ainsi, une matrice de fibrine constituée par 18 mg/ml de fibrinogène et 100 UI/ml d'activité de thrombine est un support optimal pour la prolifération et la migration de ces cellules souches. [106] Une telle matrice artificielle est à peine plus dense qu'un caillot de fibrine naturel de type PRF.

### Fibrine et os

Les interactions directes entre la fibrine et les cellules osseuses au cours des phénomènes de cicatrisation sont peu documentées. En revanche, il existe de nombreuses études chez l'animal évaluant l'effet de la fibrine sur la cicatrisation osseuse. Les résultats s'avèrent contradictoires, la cicatrisation osseuse étant soit améliorée, soit inchangée. Ces divergences seraient liées aux différences entre les modèles utilisés : le type d'animal, de défaut osseux et de gel de fibrine. [109]

Néanmoins, la fibrine est un support matriciel reconnu pour la greffe de BMP. Ainsi, une matrice de fibrine associée à des BMP a des propriétés angiogéniques, hémostatiques et ostéo-conductrices. [110] De l'os s'est même formé après que celle-ci ait été greffée en intramusculaire, ce qui implique une libération progressive des BMP contenus dans les mailles de fibrine. Ce mode de relargage progressif des cytokines fait partie de la biologie des caillots de fibrine *in vivo* et, vraisemblablement, de celle du PRF.

### Implication clinique

Le rappel de ces éléments fondamentaux se trouve illustré aisément lors de l'exérèse kystique au sein de maxillaire. On dispose alors de loge osseuse isolée. Normalement, si l'exérèse kystique complète est réalisée, la cavité kystique se remplit rapidement de sang et le caillot qui s'y forme n'est autre qu'une version « allégée », car physiologique, du PRF. La matrice de fibrine du thrombus sert de pièges aux cellules souches circulantes, et l'on observe toujours dans ces cas des comblements osseux naturels complets entre 6 mois et 1 an.

En ajoutant du PRF au caillot naturel, on accélère un phénomène strictement physiologique grâce à une matrice de fibrine mieux organisée, capable de diriger de manière plus efficace la captation des cellules souches et la cicatrisation matricielle. Un volume osseux kystique comblé à l'aide de PRF est totalement cicatrisé à 2 mois au lieu des 10 à 12 mois nécessaires naturellement (Fig. 24). Et l'on doit en grande partie cette accélération à un simple phénomène de guidage tissulaire et de contrôle cicatriciel exercé par une membrane PRF nécessairement plus structurée que le thrombus hémostatique naturel.

### PRF et greffes osseuses

L'utilisation de substituts osseux pour la réalisation de greffes de grande étendue demeure une démarche délicate en raison de la difficulté relative pour l'organisme receveur d'intégrer rapidement ce matériau à son architecture propre. Cependant, l'utilisation du PRF au cours de ces interventions permet de faciliter le contrôle opératoire du site chirurgical et d'accélérer l'intégration et le remodelage du biomatériau greffé. [111, 112]

Le PRF est constitué d'une matrice de fibrine autologue ayant incorporé de manière intrinsèque une grande quantité de cytokines plaquettaires et leucocytaires sécrétées au cours de sa préparation par centrifugation. [27-29] Ce mode de piégeage des cytokines implique un relargage progressif et prolongé dans le temps, tout au long de la dégradation de la trame de fibrine. À l'une de ses extrémités, le PRF concentre également l'ensemble des plaquettes et des leucocytes présents dans le tube de sang de 10 ml dont il est issu.

Les conséquences d'un tel concentré plaquettaire et immunitaire sur un site de greffe osseuse sont de quatre ordres.

En premier lieu, le caillot de fibrine joue un rôle mécanique important ; bien qu'il ne possède pas de propriétés adhésives très prononcées, la rigidité des membranes de PRF permet le maintien du biomatériau et sa protection contre certaines forces parasites modérées. De plus, mélangés au greffon, les fragments

de PRF servent de liant biologique entre les particules d'os, donnant ainsi au greffon une consistance biomécanique cruciale dans les premiers temps de la cicatrisation.

En second lieu, l'intégration de ce réseau de fibrine entre les fragments de greffon allogène favorise les migrations cellulaires, en particulier pour les cellules endothéliales à l'origine d'une néoangiogenèse fondamentale pour la vascularisation et la survie du greffon.

En troisième lieu, les cytokines plaquettaires, essentiellement des PDGF, TGF- $\beta$ -1 et des IGF, sont relarguées au fur et à mesure de la résorption de la matrice de fibrine, ce qui permet d'obtenir un phénomène cicatriciel entretenu. Ces mécanismes de relargage progressif sont classiquement utilisés par l'organisme pour guider les remodelages des tissus conjonctifs (tels que l'os) et la cicatrisation, mais un tel phénomène est très difficile à reproduire de manière synthétique.

Enfin, l'aspect immunitaire est fondamental, tant par la présence dans le caillot d'un volume important de leucocytes qui semblent activés au cours de la centrifugation, que par l'incorporation de cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires au sein du réseau de fibrine. Le relargage progressif de ces molécules semble jouer un rôle autorégulateur des phénomènes inflammatoires et infectieux au sein de la greffe.

Toutes ces qualités mécaniques et biologiques ne sont rien d'autres que les caractéristiques les plus évidentes d'un caillot de fibrine naturelle manipulé avec soin. Le PRF n'est en cela rien de plus qu'un concentré de cicatrisation : il est le concentré, en une seule membrane, à grande échelle et de manière parfaitement contrôlable par le praticien, de l'ensemble des phénomènes les plus élémentaires de l'hémostase et de la cicatrisation. Il offre ainsi une solution innovante pour accélérer certains phénomènes de cicatrisation et simplifier les protocoles chirurgicaux les plus complexes.

## Quel champ d'application pour le PRF ?

En première approche, il faut considérer le PRF comme un pansement de fibrine. Son architecture moléculaire à faible concentration de thrombine (favorisant les jonctions moléculaires équilatérales) rend cette membrane de fibrine particulièrement propice et perméable aux migrations cellulaires, tant fibroblastiques qu'endothéliales. Cela implique une angiogenèse rapide et un remodelage aisé de la matrice de fibrine en un tissu conjonctif plus résistant. Ainsi, cette membrane de PRF peut être utilisée dans toutes les cicatrisations superficielles, cutanées et muqueuses.

Mais le PRF n'est pas qu'une simple membrane de fibrine. C'est une matrice complète contenant l'ensemble des éléments cellulaires et moléculaires nécessaires à une cicatrisation optimale : en piégeant la majeure partie des constituants favorables à la cicatrisation et à l'immunité présents dans un prélèvement sanguin, le PRF peut être considéré comme un concentré de cicatrisation totalement physiologique, sans ajout ni manipulation.

Il y aurait donc de nombreuses applications extraorales à entrevoir, en particulier en chirurgie plastique, où la recherche de biomatériaux permettant d'améliorer le rendu esthétique des plaies cutanées est un problème récurrent. C'est d'ailleurs dans cette discipline que les colles de fibrine furent, et sont encore, les plus utilisées, en raison de leur capacité à accélérer et améliorer la cicatrisation et à diminuer le risque de constitutions de chéloïdes particulièrement disgracieuses.

Il existe cependant une limite importante à l'utilisation systématique du PRF dans de nombreuses situations chirurgicales : les volumes de PRF que l'on peut produire sont nécessairement limités. Ce biomatériau est totalement autologue : issu du sang du patient, on ne peut en obtenir qu'une quantité modeste. Et impossible d'utiliser une banque de PRF issus de donneurs : chaque PRF est profondément marqué par son organisme d'origine puisqu'on y trouve toutes les cellules immunitaires circulantes et une vaste gamme de molécules

plasmatisques hautement antigéniques. Ainsi, la trop grande qualité intrinsèque de cette matrice de fibrine naturelle la rend totalement spécifique à un individu et à un seul.

## “ En résumé

Le PRF peut désormais être considéré comme un biomatériau de cicatrisation synthétisant en une seule membrane l'ensemble des paramètres nécessaires à une cicatrisation optimale : une matrice de fibrine polymérisée en architecture tétramoléculaire, l'incorporation intrinsèque des cytokines plaquettaires et leucocytaires dans la maille de fibrine, des plaquettes, des leucocytes et également quelques cellules souches circulantes. Cependant, bien que les cytokines piégées dans le PRF et relarguées progressivement permettent l'accélération de tous les phénomènes cellulaires, la matrice de fibrine, cohérente et structurée, demeure nécessairement l'élément clé de toutes les cicatrisations potentialisées par le PRF.

Loin des controverses et des doutes associés aux cPRP, ce biomatériau totalement naturel semble effectivement accélérer les phénomènes de cicatrisation physiologiques. Cependant, il demeure important de ne pas espérer du PRF des vertus miraculeuses : c'est un adjuvant chirurgical et il ne saurait remplacer la juste maîtrise des thérapeutiques conventionnelles.

## ■ Conclusion

Les concentrés plaquettaires en usage topique sont des technologies encore récentes, mais leurs applications sont déjà nombreuses, particulièrement en chirurgie orale et maxillofaciale. Malheureusement, malgré l'engouement provoqué par ces adjuvants chirurgicaux, bien peu d'études s'y rapportant peuvent être considérées comme fiables. Dans le domaine des chirurgies parodontales, implantaires et des greffes osseuses en particulier, les lacunes analytiques des travaux présentés sur les cPRP mènent parfois à des contradictions et confortent nos doutes sur l'identité biologique de ces préparations : gel plaquettaire innovant ou simple colle de fibrine autologue ?

Pour le PRF, l'équation est différente. C'est un biomatériau de cicatrisation dont les vertus ont été parfaitement mises en évidence cliniquement. Il demeure cependant nécessaire de mener des études cliniques selon des protocoles rationalisés et reproductibles afin de progresser dans la compréhension de ce biomatériau, de valider ses utilisations les plus simples et d'entrevoir de nouveaux champs d'application toujours plus prometteurs.



## ■ Références

- [1] Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9.
- [2] Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:161-6.
- [3] Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol* 1970;67:338-59.
- [4] Matras H. Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43:605-11.
- [5] Vinazzer H. Fibrin sealing: physiologic and biochemical background. *Facial Plast Surg* 1985;2:291-5.

- [6] Matras H. Fibrin sealant in maxillofacial surgery. Development and indications. A review of the past 12 years. *Facial Plast Surg* 1985;**2**: 297-313.
- [7] Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;**30**:741-7.
- [8] Oz MC, Jeevanandam V, Smith CR, Williams MR, Kaynar AM, Frank RA, et al. Autologous fibrin glue from intraoperatively collected platelet-rich plasma. *Ann Thorac Surg* 1992;**53**:530-1.
- [9] Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;**31**:615-9.
- [10] Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001;**13**:487-93.
- [11] Dohan D, Donsimoni JM, Navarro G, Gaultier F. Platelet Concentrates. Part 1: technologies. *Implantodontie* 2003;**12**:5-16.
- [12] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;**58**:297-301.
- [13] Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;**14**:529-35.
- [14] Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;**15**:879-82.
- [15] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;**85**:638-46.
- [16] Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I—Background and processing techniques. *J Oral Implants* 2001;**27**: 38-42.
- [17] Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;**41**:1217-24.
- [18] Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res* 2003;**14**:357-62.
- [19] Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRP system versus the Friadent-Schulte platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res* 2003;**14**:233-9.
- [20] Appel TR, Potzsch B, Muller J, Von Lindern JJ, Berge SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res* 2002;**13**:522-8.
- [21] Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;**22**:547-57.
- [22] Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;**17**:184-90.
- [23] Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, Loos AH, Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;**16**:693-9.
- [24] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;**10**:225-8.
- [25] Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002;**30**:97-102.
- [26] Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie : le PRF. *Implantodontie* 2001;**41**:55-62.
- [27] Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, et al. Platelet rich fibrin (PRF): a new healing biomaterial. Part 2: platelets and cytokines. *Implantodontie* 2004;**13**:99-108.
- [28] Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, et al. Platelet rich fibrin (PRF): a new healing biomaterial. Part 1: biotechnologies and fibrin. *Implantodontie* 2004;**13**:87-97.
- [29] Dohan S, Choukroun J, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, et al. Platelet rich fibrin (PRF): a new healing biomaterial. Part 3: immune features. *Implantodontie* 2004;**13**:109-15.
- [30] Dohan D, Donsimoni JM, Navarro G, Gaultier F. Platelet Concentrates. Part 2: associated biology. *Implantodontie* 2003;**12**:17-25.
- [31] Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**936**:11-30.
- [32] Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**936**:355-67.
- [33] Lanir N, Ciano PS, Van de Water L, McDonagh J, Dvorak AM, Dvorak HF. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J Immunol* 1988;**140**:2340-9.
- [34] Brown LF, Lanir N, McDonagh J, Tognazzi K, Dvorak AM, Dvorak HF. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* 1993;**142**:273-83.
- [35] Feng X, Clark RA, Galanakis D, Tonnesen MG. Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alpha $\nu$ /beta3 mRNA by fibrin1. *J Invest Dermatol* 1999;**113**:913-9.
- [36] Gross TJ, Leavell KJ, Peterson MW. CD11b/CD18 mediates the neutrophil chemotactic activity of fibrin degradation product D domain. *Thromb Haemost* 1997;**77**:894-900.
- [37] Koolwijk P, Van Erck MG, De Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, et al. Cooperative effect of TNF $\alpha$ , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;**132**:1177-88.
- [38] Collen A, Koolwijk P, Kroon M, Van Hinsbergh VW. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998;**2**:153-65.
- [39] Van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, Van Muijen GN. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood* 1990;**75**:1991-8.
- [40] Van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**936**:426-37.
- [41] Haroun ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J* 1999;**13**:1787-95.
- [42] Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000;**60**: 6196-200.
- [43] Collen A, Maas A, Kooistra T, Lupu F, Grimbergen J, Haas FJ, et al. Aberrant fibrin formation and cross-linking of fibrinogen Nieuwegein, a variant with a shortened A $\alpha$ -chain, alters endothelial capillary tube formation. *Blood* 2001;**97**:973-80.
- [44] Lorimier S, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B, Gillery P, Maquart FX, et al. Morphometric studies of collagen and fibrin lattices contracted by human gingival fibroblasts; comparison with dermal fibroblasts. *J Dent Res* 1998;**77**:1717-29.
- [45] Lorimier S, Bouthors S, Droulle C, Maquin DL, Maquart FX, Gillery P, et al. The rate of fibrinolysis is increased by free retraction of human gingival fibroblast populated fibrin lattices. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;**29**:181-9.
- [46] Bonucci E, Marini E, Valdinucci F, Fortunato G. Osteogenic response to hydroxyapatite-fibrin implants in maxillofacial bone defects. *Eur J Oral Sci* 1997;**105**:557-61.
- [47] Gurevich O, Vexler A, Marx G, Prigozhina T, Leviansky L, Slavin S, et al. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue Eng* 2002;**8**: 661-72.
- [48] Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;**31**(5):469-84.
- [49] Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996;**19**(suppl1):23S-37S.
- [50] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;**331**:1286-92.
- [51] Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* 1999;**16**:201-16.
- [52] Heldin CH. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS Lett* 1997;**410**:17-21.
- [53] Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;**36**:49-59.
- [54] Zapf J, Donath MY, Schmid C. Spectrum of effectiveness of insulin-like growth factors (IGF). *Schweiz Med Wochenschr* 2000;**130**:190-5.
- [55] Winkler R, Pasleau F, Boussif N, Hodzic D. The IGF system: summary and recent data. *Rev Med Liege* 2000;**55**:725-39.
- [56] Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999;**77**:256-62.

- [57] Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989;**109**:429-40.
- [58] Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res* 1996;**31**:301-12.
- [59] Piche JE, Graves DT. Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. *Bone* 1989;**10**:131-8.
- [60] Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg* 2003;**14**:292-300.
- [61] Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;**13**:529-35.
- [62] Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau RA. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol* 1995;**23**:295-306.
- [63] Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol* 1995;**23**:307-17.
- [64] Hayashi Y, Kobayashi M, Kuwata H, Atsumi G, Deguchi K, Feng Wei X, et al. Interferon-gamma and interleukin 4 inhibit interleukin-1 beta-induced delayed prostaglandin E(2) generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. *Cytokine* 2000;**12**:603-12.
- [65] Santhosh Kumar TR, Krishnan LK. Endothelial cell growth factor (ECGF) enmeshed with fibrin matrix enhances proliferation of EC in vitro. *Biomaterials* 2001;**22**:2769-76.
- [66] Lariviere B, Rouleau M, Picard S, Beaulieu AD. Human plasma fibronectin potentiates the mitogenic activity of platelet-derived growth factor and complements its wound healing effects. *Wound Repair Regen* 2003;**11**:79-89.
- [67] Costantini V, Zacharski LR. Fibrin and cancer. *Thromb Haemost* 1993;**69**:406-14.
- [68] Brown LF, Van de Water L, Harvey VS, Dvorak HF. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. *Am J Pathol* 1988;**130**:455-65.
- [69] Sahni A, Odrliin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1998;**273**:7554-9.
- [70] Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 2000;**96**:3772-8.
- [71] Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**936**:406-25.
- [72] Lee SY, Lee KP, Lim JW. Identification and biosynthesis of fibrinogen in human uterine cervix carcinoma cells. *Thromb Haemost* 1996;**75**:466-70.
- [73] Parrott JA, Whaley PD, Skinner MK. Extrahepatic expression of fibrinogen by granulosa cells: potential role in ovulation. *Endocrinology* 1993;**133**:1645-9.
- [74] Gaultier F, Navarro G, Donsimoni JM, Dohan D. Platelet concentrates. Part 3: clinical applications. *Implantodontie* 2004;**13**:3-11.
- [75] Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Kluter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* 1999;**39**:144-8.
- [76] Mulhern MG, Cullinane A, Cleary PE. Visual and anatomical success with short-term macular tamponade and autologous platelet concentrate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;**238**:577-83.
- [77] Paques M, Chastang C, Mathis A, Sahel J, Massin P, Dosquet C, et al. Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology* 1999;**106**:932-8.
- [78] Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz MB, Dimick A, Vasconez LO. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 1991;**88**:1005-17.
- [79] Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;**107**:229-39.
- [80] Moore MM, Freeman MG. Fibrin sealant in breast surgery. *J Long Term Eff Med Implants* 1998;**8**:133-42.
- [81] Hotz G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part II: Clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991;**20**:208-13.
- [82] Hotz G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part I: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991;**20**:204-7.
- [83] Petrungraro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent* 2001;**22**:729-34.
- [84] Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000;**71**:1654-61.
- [85] Petrungraro PS. Treatment of the infected implant site using platelet-rich plasma. *Compend Contin Educ Dent* 2002;**23**:363-70.
- [86] De Obarrio JJ, Arauz-Dutari JJ, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;**20**:486-97.
- [87] Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol* 2002;**73**:198-205.
- [88] Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol Res* 2002;**37**:300-6.
- [89] Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:746-51.
- [90] Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;**18**:15-22.
- [91] Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;**60**:1176-81.
- [92] Philippart P, Brasseur M, Hoyaux D, Pochet R. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;**18**:411-6.
- [93] Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 2003;**14**:213-8.
- [94] Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;**61**:157-63.
- [95] Danesh-Meyer MJ, Filstein MR, Shanaman R. Histological evaluation of sinus augmentation using platelet rich plasma (PRP): a case series. *J Int Acad Periodontol* 2001;**3**:48-56.
- [96] Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;**22**:45-53.
- [97] Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987;**57**:673-86.
- [98] Nehls V, Herrmann R. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 1996;**51**:347-64.
- [99] Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Deimers PA, et al. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:1044-8.
- [100] Kazura JW, Wenger JD, Salata RA, Budzynski AZ, Goldsmith GH. Modulation of polymorphonuclear leukocyte microbicidal activity and oxidative metabolism by fibrinogen degradation products D and E. *J Clin Invest* 1989;**83**:1916-24.

- [101] Hamaguchi M, Morishita Y, Takahashi I, Ogura M, Takamatsu J, Saito H. FDPD-dimer induces the secretion of interleukin-1, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-2 in a human promonocytic leukemia cell line. *Blood* 1991;**77**:94-100.
- [102] Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Laurent GJ. A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci* 1993;**104**(Pt2):409-13.
- [103] Tuan TL, Song A, Chang S, Younai S, Nimni ME. In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res* 1996;**223**:127-34.
- [104] Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994;**1**:71-81.
- [105] Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003;**196**:245-50.
- [106] Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003;**24**:2497-502.
- [107] Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;**31**:27-33.
- [108] Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg* 2002;**13**:231-43.
- [109] Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;**95**:521-8.
- [110] Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1988;**235**:302-10.
- [111] Choukroun J, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan S, Dohan D. Platelet Concentrates. Part 4: histological analysis. *Implantodontie* 2004;**13**:167-72.
- [112] Simonpieri A, Choukroun J, Girard MO, Ouaknine T, Dohan D. Immediate post-extraction implantation: interest of the PRF. *Implantodontie* 2004;**13**:177-89.

S. Dohan.

A. Dohan.

Hôpital Albert Chenevier, 40, rue de Mesly, 94000 Créteil, France.

J. Choukroun.

Centre anti-douleur, 49, rue Gioffredo, 06000 Nice, France.

A. Diss, Assistant hospitalo-universitaire.

LASIO (laboratoire de surface interface en odontologie), Faculté de chirurgie dentaire, Pôle universitaire Saint-Jean d'Angély, 24, rue des Diabes bleus, 06357 Nice cedex 4, France.

A. Simonpieri.

65, cours Pierre-Puget, 13006 Marseille, France.

M.-O. Girard.

3ter, place de l'Hôtel de Ville, 01100 Bellignat, France.

D. Dohan, Assistant hospitalo-universitaire (drdohand@hotmail.com).

Hôpital Albert Chenevier, 40, rue de Mesly, 94000 Créteil, France.

Laboratoire de Radiologie-Imagerie-Biophysique, Faculté de chirurgie dentaire, 1, rue Maurice-Arnoux, 92120 Montrouge, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Dohan S., Dohan A., Choukroun J., Diss A., Simonpieri A., Girard M.-O., Dohan D. De l'usage des concentrés plaquettaires autologues en application topique. EMC (Elsevier SAS, Paris), Odontologie, 23-330-A-30, 2005.

Disponibles sur [www.emc-consulte.com](http://www.emc-consulte.com)



Arbres  
décisionnels



Iconographies  
supplémentaires



Vidéos /  
Animations



Documents  
légaux



Information  
au patient



Informations  
supplémentaires



Auto-  
évaluations