

# Sommaire

I.	Revue de la littérature - Thérapie Cellulaire et Cordes Vocales cicatricielles (Article 1) ..	3
A.	Auteurs et affiliations .....	3
B.	Résumé .....	3
C.	Mots clés .....	4
D.	Introduction .....	4
E.	Discussion .....	6
1)	Les cellules souches mésenchymateuses : une option de choix dans le traitement des cordes vocales cicatricielles .....	6
2)	Caractéristiques et valeur ajoutée de la fraction vasculaire stromale .....	14
F.	Conclusion .....	17
G.	Références .....	17
II.	Résultats de l'essai clinique CELLCORDES - Première injection chez l'homme de fraction vasculaire stromale autologue d'origine adipeuse dans des cordes vocales cicatricielles : essai clinique prospectif ouvert de phase I (Article 2) .....	22
A.	Auteurs et affiliations .....	22
B.	Résumé .....	22
C.	Abréviations .....	24
D.	Introduction .....	24
E.	Méthodes .....	26
1)	Conception de l'étude et critères d'éligibilité .....	26
2)	Lipoaspiration et Préparation de la Fraction Vasculaire Stromale .....	28
3)	Protocole thérapeutique .....	29
4)	Évaluation clinique .....	30
5)	Analyses statistiques .....	31
F.	Résultats .....	32
1)	Caractéristiques des patients et de la FVS .....	32
2)	Sécurité et tolérance de l'injection autologue de FVS .....	33
3)	Efficacité de l'injection autologue de FVS d'origine adipeuse .....	34
G.	Discussion .....	37
H.	Remerciements .....	41
I.	Références .....	41
J.	Données supplémentaires .....	46

III. Cas clinique détaillé d'une patiente incluse dans l'essai CELLCORDES - Fraction vasculaire stromale d'origine adipeuse et cordes vocales cicatricielles : premier cas clinique (Article 3) .....	50
A. Auteurs et affiliations .....	50
B. Résumé .....	51
C. Mots clés .....	51
D. Liste des abréviations .....	51
E. Introduction .....	52
F. Matériels et méthodes.....	53
1) Patiente .....	53
2) Protocole chirurgical.....	54
3) Evaluation.....	56
G. Résultats .....	57
H. Discussion .....	58
I. Données supplémentaires .....	60
J. Autres informations.....	60
K. Références .....	61
IV. Conclusions et perspectives .....	63
A. Essai clinique CELLCORDES 2 .....	63
B. Projet Amadeus .....	65
C. Quelles perspectives pour l'avenir ? .....	66
D. Références .....	67

## **I. Revue de la littérature - Thérapie Cellulaire et Cordes Vocales cicatricielles (Article 1)**

Cet article a été publié dans la revue des Annales Françaises d’Oto-Rhino-Laryngologie et de pathologie cervico-faciale. Sa référence bibliographique est la suivante : Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Philandrianos C, Veran J, Giovanni A. Cell therapy and vocal fold scarring. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2017;134(5):339-345. doi: 10.1016/j.anorl.2017.06.006

### **A. Auteurs et affiliations**

Alexia Mattei<sup>1,2,\*</sup>, Jérémy Magalon<sup>3,4</sup>, Baptiste Bertrand<sup>5</sup>, Cécile Philandrianos<sup>5</sup>, Julie Veran<sup>4</sup>, Antoine Giovanni<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Aix Marseille Université, 13000 Marseille, France

<sup>2</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, La Conception, service d’Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, 147 Boulevard Baille, 13005 Marseille, France

<sup>3</sup> Aix Marseille Univ, VRCM INSERM UMR 1076, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

<sup>4</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, La Conception, Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, INSERM CBT-1409, 13005 Marseille, France

<sup>5</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, La Conception, service de Chirurgie Plastique et Réparatrice, 13005 Marseille, France

<sup>6</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, Laboratoire Parole et Langage, 5 Avenue Pasteur, 13100 Aix-en-Provence, France

### **B. Résumé**

La microstructure des cordes vocales est complexe et peut être altérée par une microchirurgie laryngée. On peut alors observer un état cicatriciel n’autorisant plus le découplage mécanique entre épithélium et muscle, responsable de difficultés vibratoires à l’origine d’une dysphonie invalidante. Les possibilités thérapeutiques actuelles sont réduites et souvent inefficaces sur la vibration : elles n’apportent qu’un effet volumateur limitant la fuite glottique.

L'objectif de cette revue de la littérature était double : i) décrire l'état actuel de la littérature quant à l'intérêt de la thérapie cellulaire dans la prise en charge des cordes vocales cicatricielles ; ii) analyser l'intérêt thérapeutique de la fraction vasculaire stromale d'origine adipeuse parmi l'arsenal thérapeutique préexistant.

Notre recherche sur PubMed® en septembre 2016 a référencé les articles originaux de langue anglaise ou française traitant de l'usage des cellules souches dans la prise en charge des cordes vocales cicatricielles. Vingt-sept articles publiés entre 2003 et 2016 répondaient aux critères de sélection. Les cellules souches mésenchymateuses étaient les plus utilisées, majoritairement extraites de la moelle osseuse ou du tissu adipeux. Quatre études étaient réalisées *in vitro* sur fibroblastes et dix-huit *in vivo* chez l'animal. Les critères d'évaluation étaient : i) l'analyse de la cicatrisation (morphologie macroscopique et microscopique, propriétés viscoélastiques, matrice extracellulaire, fibroblastes) ; ii) l'évaluation de la survie et différenciation des cellules souches.

Ces études démontrent l'action bénéfique des cellules souches mésenchymateuses, notamment d'origine adipeuse. Par ailleurs, la fraction vasculaire stromale possède des propriétés qui pourraient permettre d'améliorer ces résultats, en facilitant la logistique de production.

### **C. Mots clés**

Cellules souches d'origine adipeuse, Cellules souches mésenchymateuses, Corde vocale, Fibrose, Cicatrice.

### **D. Introduction**

La micro-structure des cordes vocales (CV) [1] est complexe, particulièrement du fait de son organisation feuilletée. Selon la théorie du body-cover d'Hirano [2], la CV se compose d'une couche supérieure composée de l'épithélium, la membrane basale et la partie superficielle de la lamina propria (« cover ») et d'une couche inférieure composée de la partie profonde de la lamina propria et du muscle thyro-aryténoïdien (« body »), les 2 étant séparées par la couche intermédiaire de la lamina propria. Cette architecture spécifique permet à ces deux unités fonctionnelles de vibrer indépendamment. Elle est présente à la partie moyenne des CV, les zones antérieure et postérieure, siège des maculae flavae, présentant une architecture différente qui joue

un rôle d'amortisseur. Les proportions des composants de la matrice extracellulaire (MEC) et leur organisation déterminent en grande partie les propriétés biomécaniques des CV. La couche superficielle de la lamina propria est composée principalement de matériel amorphe pauvre en fibres de collagène et d'élastine. La couche intermédiaire contient plus de fibres élastiques et la couche profonde plus de fibres collagéniques.

Dans les suites d'une microchirurgie laryngée, on peut parfois observer un état cicatririel de la CV secondaire à une disparition partielle de la lamina propria dont la partie superficielle et/ou intermédiaire est remplacée par du tissu fibreux. Cette modification tissulaire empêche le découplage mécanique entre épithélium et muscle, entraînant ainsi une difficulté vibratoire [1]. Un tissu cicatririel peut également être présent sans cause iatrogène, de manière congénitale, ou plus souvent acquise, par un mécanisme s'apparentant aux vergetures cutanées ou résultant de traumatismes ou de phénomènes inflammatoires chroniques.

Cette cicatrisation pathologique comprend trois étapes [3] : une phase inflammatoire, une phase proliférative et une phase de remodelage. La première phase fait intervenir des facteurs inflammatoires tels que l'Interleukine 1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$ , synthétisés 4 à 8 heures après la blessure. Puis il existe une augmentation de l'expression de la Hyaluronan Synthase 1 et 2, du Procollagène I et III, de la Cyclo-oxygénase 2. Un recrutement cellulaire massif s'en suit, concernant majoritairement des cellules aux caractéristiques fibroblastiques et provenant des maculae flavae ou de tissus à distance tels que la moelle osseuse. Leur densité est maximale aux 5<sup>ème</sup> - 7<sup>ème</sup> jours mais elles échouent parfois à restaurer ad integrum la CV [1]. Il existe alors une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, une désorganisation des faisceaux de collagène et d'élastine qui perdent leur parallélisme, une diminution de la densité en élastine, en acide hyaluronique (AH), en fibromoduline et en decorine, un remplacement du collagène de type III de fin calibre par du collagène de type I et une augmentation de la densité en fibronectine [1]. Il s'y associe fréquemment une perte de volume avec insuffisance glottique.

Les conséquences vocales de ces situations sont un handicap pour les patients, en particulier pour les professionnels de la communication. Or les possibilités thérapeutiques actuelles sont réduites, la haute complexité de la micro-structure des CV participant à la difficulté de trouver un traitement efficace. La résection des tissus fibreux a des résultats souvent décevants en raison d'une possible ré-adhésion. L'injection d'acide hyaluronique a montré des effets positifs sur la viscoélasticité à court terme mais sa durabilité tissulaire est limitée [4,5]. Les matériaux autologues (essentiellement graisse et fascia) ont l'avantage d'une excellente biocompatibilité : la graisse est facile à prélever et bien tolérée mais le tissu graisseux injecté selon la technique de Coleman peut se résorber. Ces techniques ne permettent pas de restaurer la

souplesse de la partie vibrante de la CV et n'ont d'intérêt que pour redonner du « volume » en cas de fuite glottique.

La reconstitution d'un plan de glissement peut être envisagée par des approches de thérapie cellulaire consistant à injecter des cellules souches dans la CV. Une recherche bibliographique sur PubMed Central® effectuée en septembre 2016 et référençant les articles en langue anglaise ou française traitant de l'effet des cellules souches au niveau laryngé comptait 27 articles publiés entre 2003 et 2016. Les mots-clés utilisés étaient : « fibrosis », « stem cells », « adipose-derived stem cells », « mesenchymal stem cells », « scarred vocal folds », « vocal cords », « cicatrix », « tissue engineering ». Les articles traitant de l'utilisation de produits pro-régénératifs acellulaires étaient exclus ainsi que ceux traitant de l'utilisation de la thérapie cellulaire au niveau laryngé pour des pathologies autres que les CV cicatricielles. Seuls les articles originaux décrivant un protocole expérimental ont été retenus : les revues de la littérature n'étaient pas incluses.

L'objectif de cette revue est double :

- décrire l'avancée des travaux de thérapie cellulaire dans la prise en charge des cordes vocales cicatricielles ;
- analyser l'intérêt thérapeutique de la fraction vasculaire stromale (FVS) du tissu adipeux par rapport aux autres produits de thérapie cellulaire.

## E. Discussion

### 1) Les cellules souches mésenchymateuses : une option de choix dans le traitement des cordes vocales cicatricielles

La présence de cellules souches mésenchymateuses a été rapportée dans de nombreux tissus chez l'adulte. Ce sont des cellules multipotentes, donc capable de générer différents tissus issus d'un même feuillet embryonnaire. D'abord isolées dans la moelle osseuse [6], le terme de cellules souches mésenchymateuses (CSM) a été employé pour la première fois en 1990 en relation avec le mésenchyme, dérivé du mésoderme, un des 3 feuillets embryonnaires dont est issue la moelle osseuse.

Dans notre revue de la littérature, les cellules souches utilisées étaient majoritairement des CSM, provenant de deux sources principales. Dans 13 cas étaient utilisées des CSM issues de la moelle osseuse (BM-MSC, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Dans 14 autres cas,

les CSM provenaient de tissu adipeux (ADSC, *Adipose Derived Stem Cells*). Ce tissu est disponible par simple lipoaspiration dans des volumes importants : son prélèvement est donc moins contraignant et moins invasif pour le donneur. Les CSM y sont environ 8 fois plus nombreuses que dans la moelle osseuse (de l'ordre de 5000/mL versus 600/mL) [7]. Deux études ont comparé les BM-MSC et les ADSC [8, 9]. Dans deux cas, une lignée de cellules souches embryonnaires (CSE) était utilisée [10,11]. Plus originale, une étude utilisait des CSM prélevées au niveau de l'épiglotte d'un chien [12]. En effet, les cordes vocales renferment des CSM (« stellate cells »), en particulier au niveau des maculae flavae [1]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces cellules étaient également présentes au niveau de l'épiglotte qui a pour avantage d'offrir une surface de prélèvement supérieure aux CV.

Parmi les 27 études, quatre ont été réalisées exclusivement *in vitro* (Tableau1). Elles portaient sur l'effet des CSM sur des fibroblastes de CV d'origine animale ou humaine. Les 23 autres études comportaient une part d'expérimentation *in vivo* avec injection de cellules souches au niveau des CV (Tableau2). Celles-ci portaient exclusivement sur le petit animal (souris, rat) et le gros animal (lapin, chien), aucune injection n'ayant pour l'instant été réalisée chez l'homme.

#### a) *Expérimentation in vitro*

Kumai [13,14] a montré que les fibroblastes cicatriciels produisaient plus de collagène et proliféraient plus vite que les fibroblastes normaux. Il a ensuite montré que ces fibroblastes, mis en co-culture avec des ADSC, proliféraient moins, et exprimaient moins l' $\alpha$ -SMA (Smooth Muscle Actin), marqueur de différenciation en myofibroblaste. Ils produisaient une MEC contenant moins de collagène mais plus d'acide hyaluronique (AH) et d'Hépatocyte Growth Factor (HGF). La neutralisation de l'HGF inhibait l'effet des ADSC sur la production de collagène, confirmant ainsi les propriétés antifibrotiques connus de l'HGF. Son rôle au niveau laryngé a en effet déjà été étudié dans plusieurs études [15,16]. Chen et Thibeault [17] ont placé en co-culture des fibroblastes de CV, saines ou cicatricielles, avec des BM-MSC associées à un hydrogel d'AH. Ces dernières inhibaient la prolifération des fibroblastes sans changement de morphologie ou viabilité. L'étude du transcriptome confirmait l'augmentation de l'expression du gène de l'HGF ainsi que celui du VEGF. A l'inverse de Kumai, Chen et al. Ont retrouvé une augmentation de la production de collagène I en présence de BM-MSC. Hiwatashi et al. [18] ont étudié l'implication de la voie du TGF $\beta$ 1 en réalisant des co-cultures de fibroblastes de CV normales et d'ADSC ou BM-MSC, en présence ou non de TGF $\beta$ 1.

**Tableau 1.** Caractéristiques des études réalisées *in vitro*.

Auteur	Type étude	Source CSM	Type CSM	Source fibroblastes	Type fibroblastes	Matériel associé aux CSM	Délai entre blessure et recueil fibroblastes	Durée de co-culture	Propriétés de la MEC	Prolifération/ différenciation fibroblastes	Transcriptome	Survie des CSM
Kumai [13]	Vitro	Furet	ADSC	Furet	CV cicatricielles et CV normales		2 s	1 à 7 j	x	x		
Kumai [14]	Vitro	Furet	ADSC	Furet	CV cicatricielles	<sup>a</sup>	2 s	6 j	x	x		
Chen [17]	Vitro	Humain	BM-MSC	Humain	CV cicatricielles et CV normales	Acide hyaluronique	DM	7 j	x	x	x	x
Hiwatashi [18]	Vitro	Rat	ADSC/BM-MSC	Rat	CV normales	± TGFβ1		6 à 24 h	x		x	

ADSC : *adipose derived stem cells* ; BM-MSC : *bone marrow mesenchymal stem cells* ; CSM : cellules souches mésenchymateuses ; CV : corde vocale ; MEC : matrice extracellulaire.

<sup>a</sup> ± neutralisation du HGF ; h : heures, j : jour(s), s : semaine(s) ; DM : donnée manquante.

**Tableau 2.** Caractéristiques des études réalisées *in vivo*.

Auteur	Type étude	Animal injecté	Effectif	Type greffe	Cellules injectées	Matériel associé aux CSM	Injection contrôle	Délai entre blessure et injection	Délai entre injection et sacrifice	Morphologie CV <sup>b</sup>	Propriétés visco-élastiques <sup>b</sup>	Propriétés de la MEC <sup>b</sup>	Prolifération/ différenciation fibroblastes <sup>b</sup>	Survie des CSM <sup>c</sup>
Hiwatashi [8]	Vivo	Rat		Allo	ADSC/BM-MSC		NaCl	2 m	1 à 3 m		1			0
Hiwatashi [9]	Vivo	Chien	18	Auto	ADSC/ BM-MSC	± Atelocollagène		2 m	1 à 6 m		1	1		1 m : 1 6 m : 0
Cedervall [10]	Vivo	Lapin	11	Xéno	CSE		NaCl	0 j	1 m		1			1 (5,1 %)
Svensson [11]	Vivo	Lapin	14	Xéno	CSE		NaCl	0 j	6 s à 3 m		1	1		6 s : 1 3 m : 0
Peng [12]	Vivo	Chien	14	Allo	L-MSC		Collagène	0 j	2 à 8 s	1		1		
Svensson [19]	Vivo	Lapin	12	Xéno	BM-MSC		NaCl	9 s	10 s		1	1		0
Svensson [20]	Vivo	Lapin	11	Xéno	BM-MSC		NaCl	0 j	3 m		1	1		0
Xu [21]	Vivo	Lapin		Auto	ADSC	Collagène ou AH	Collagène/AH/0	0 j	15 j à 12 m	1		0		
Kim [22]	Vivo	Lapin	40	Xéno	ADSC	± Hydrogel alginate et AH	Hydrogel/NaCl	0 j	1 à 3 m	1	1	1		1
Kwon [23]	Vivo	Lapin	10	Auto	ADSC	AH ± HGF	AH	0 j	8 s	1		1		
Lee [24]	Vivo	Chien	10	Auto	ADSC	Atélocollagène	Atélocollagène	- 4 j	2 à 24 s	1				1
Kanemaru [25]	Vivo	Chien	8	Auto	BM-MSC	Atélocollagène	Atélocollagène	- 4 j	2 m	1		0		
Shiba [26]	Vivo	Lapin	8	Allo	ADSC	Fibrin hydrogel		0 j	4 s			NE		
Ohno [27]	Vivo	Chien	12	Auto	BM-MSC	Atélocollagène	Atélocollagène	0 j	6 m		1	1		
Johnson [28]	Vivo	Rat	18	Xéno	BM-MSC	± MEC	MEC/NaCl	1 m	1 m		0		0	1
Choi [29]	Vivo	Lapin	24	Xéno	BM-MSC	± Gel porcin	Gel porcin	0 j	8 s	1	1	1		1
Angelou [30]	Vivo	Lapin	74	Allo	ADSC	AH		18 m	3 m	1		1		
Bonnecaze [31]	Vivo	Lapin	20	Auto	ADSC		NaCl	0 j	6 s		1	1		NE
Hong [33]	Vivo	Lapin	12	Xéno	ADSC		NaCl	0 j	4 à 12 s	1		1		1
Kim [34]	Vivo	Lapin		Xéno	BM-MSC		NaCl	0 j	1 à 3 m	1	1	1		1
Hertegard [35]	Vivo	Lapin	10	Xéno	BM-MSC			0 j	4 s	4 s	1	1		1 (0,18 %)
Kanemaru [36]	Vivo	Rat		Xéno	BM-MSC			0 j	8 s					
Hu [37]	Vivo	Chien	17	Auto	ADSC <sup>a</sup>		Fibroblastes de CV	7 j		15 j à 12 m				

ADSC : adipose derived stem cells ; BM-MSC : bone marrow mesenchymal stem cells ; CSM : cellules souches mésenchymateuses ; CSE : cellules souches embryonnaires ; L-MSC : laryngeal mesenchymal stem cells ; CV : corde vocale ; MEC : matrice extracellulaire ; AH : acide hyaluronique ; j : jour(s) ; s : semaine(s) ; m : mois ; NE : non évaluabile.

<sup>a</sup> Plus ou moins prédifférenciées.

<sup>b</sup> 1 : amélioration ; 0 : pas de changement.

<sup>c</sup> 1 : survie (pourcentage de survie) ; 0 : pas de survie.

En effet, cette cytokine joue un rôle majeur dans la cascade inflammatoire causée par la blessure d'une CV. Dans cette étude, les CSM semblaient réguler la composition de la MEC (notamment par une diminution des collagène I et III) et inhiber la voie du TGF $\beta$ 1 ainsi que la différenciation en myofibroblastes (diminution de l' $\alpha$ -SMA).

### *b) Expérimentation in vivo*

La majorité des études précliniques in vivo (Tableau2) correspondait à des xénogreffes de cellules souches (11 études) d'origine humaine (moelle osseuse ou embryon), de souris ou de lapins (moelle osseuse). Certaines études rapportaient l'utilisation de protocoles d'immunosuppresseurs type tacrolimus pour éviter un rejet [10,11,19,20]. Plus rarement les études évaluaient l'autogreffe (8 études) ou encore l'allogreffe de cellules souches d'un autre individu de la même espèce (4 études). Plusieurs études utilisaient des produits de la bio-ingénierie pour potentialiser les effets des CSM ou permettre une meilleure survie de celles-ci : des hydrogels (collagène, atélocollagène, fibrine, AH, plus ou moins associés [21-26]), des éponges d'atélocollagène [9,27], une matrice extracellulaire synthétique [28] ou encore un gel acellulaire issu de sous-muqueuse jéjunale porcine [29]. Une étude associait de l'HGF aux CSM [23]. Une seule équipe administrait lors de chaque intervention une injection d'antibiotiques associés à des corticoïdes [30].

Le modèle animal était globalement similaire dans chaque étude : réalisation d'une cicatrice au niveau d'une ou des 2 CV jusqu'au muscle thyro-aryténoïdien avec laser, électrocautérisation ou instruments froids. Seule l'étude de Bonnecaze [31] comportait une cervicotomie avec laryngotomie médiane. L'injection dans la CV des cellules (conditionnées ou non) ou d'une solution contrôle était le plus souvent réalisée immédiatement après blessure. Pour certaines études le délai entre la blessure et l'injection était plus long : de 4 jours jusqu'à 18 mois pour l'étude d'Angelou [30]. Ce dernier modèle correspondait ainsi plus à la pratique clinique chez l'homme où le traitement d'une CV cicatricielle ne doit être envisagé qu'au minimum 6 mois après chirurgie [32]. Dans 2 études, l'injection était réalisée 4 jours avant réalisation de la cicatrice, à titre préventif [24,25]. Si les cellules étaient associées à une éponge d'atélocollagène, l'injection était alors remplacée par une incision de la CV avec mise en place de l'éponge au sein d'une logette sous-épithéliale [9,27]. Le délai entre l'injection et l'endoscopie et / ou l'euthanasie était en revanche très variable, entre 2 semaines et 12 mois.

Les objectifs de l'analyse étaient :

- d'évaluer les effets de l'injection de CSM sur la cicatrisation par étude macroscopique et microscopique des cordes vocales, étude des propriétés viscoélastiques, de la matrice extracellulaire, des fibroblastes (prolifération, différenciation, survie) ;
- d'étudier la survie et la différenciation des cellules injectées, marquées par une molécule immunofluorescente.

Concernant la morphologie des CV, Peng [12] a étudié l'effet de l'allogreffe de CSM d'épiglotte chez des chiens. A 2 semaines, celles-ci permettaient une cicatrisation avec diminution du tissu granulomateux, de l'inflammation et de la fibrose. A 4 et 8 semaines, les CV traitées étaient moins atrophiques et moins cicatricielles. Des résultats similaires étaient observés à 8 semaines pour Choi et Kanemaru [25,29] (avec des BM-MSC conditionnées ou non dans un gel de sous-muqueuse jéjunale de porc) et Kwon [23] (avec des ADSC associées à de l'AH ± HGF), à 12 semaines pour Hong, Kim ou Angelou [30,33,34] et à 24 semaines pour Lee [24] (CSM seules).

Concernant les propriétés viscoélastiques, plusieurs paramètres étaient utilisés. La viscosité dynamique analyse la résistance d'un matériel à un flux de cisaillement ; le module d'élasticité (module de Young) analyse la raideur d'un matériel dans un flux. La vidéokymographie repose sur l'analyse du déplacement d'un point de la CV grâce à une caméra ultrarapide. L'étude qualitative des kymogrammes est basée sur l'observation de la symétrie droite-gauche, les phases d'ouverture et de fermeture, la périodicité, l'amplitude, la différence de phase. Svensson et al. [11,19,20] et Cedervall et al. [10] retrouvaient des résultats similaires entre les CV normales et celles traitées par CSM / CSE, tous deux meilleurs que ceux des CV blessées non injectées. Ils étudiaient notamment la viscosité dynamique ou le module d'élasticité. Le module d'élasticité était également amélioré avec CSM dans l'étude de Hertegard et al. [35]. Dans l'étude de Kim et al. [22], les modules d'élasticité et de viscosité étaient significativement améliorés avec les CSM associées à un hydrogel mais la vidéokymographie n'était en revanche pas modifiée. Choi et al. [29] ont retrouvé une amélioration de l'amplitude de vibration en vidéokymographie avec les CSM à condition qu'elles soient associées à une MEC d'origine porcine. Hiwatashi a étudié 3 paramètres :

- la pression sous-glottique au seuil phonatoire (pression sous-glottique minimum pour initier la vibration des CV) ;
- l'amplitude de la vibration muqueuse ;
- la taille de la fente glottique.

Ces 3 éléments étaient améliorés par l'injection de CSM, qu'ils s'agissent de BM-MSC ou d'ADSC [9]. De Bonnecaze a mesuré la fréquence fondamentale de ses larynx excisés placés dans un agitateur électrodynamique, celle-ci permettant de caractériser les propriétés biomécaniques du tissu [31]. La diminution de la fréquence était significativement moindre en cas d'injection d'ADSC mais de manière peu pertinente (en moyenne 212 Hz pour les CV normales, 100 Hz pour les CV cicatricielles et 120 Hz pour les CV cicatricielles injectées). Ohno et al. [27] ont retrouvé des propriétés viscoélastiques améliorées par des BM-MSC associées à une éponge de collagène. L'amélioration de ces propriétés permet de faire l'hypothèse d'une amélioration de la dysphonie chez l'homme dans les suites de l'injection de CSM dans des CV cicatricielles.

Concernant les propriétés de la MEC, Peng et al [12] retrouvaient après injection de CSM épiglottiques, une diminution du collagène et de la fibronectine et une augmentation de l'AH et de l'élastine. De manière similaire, de nombreuses autres études retrouvaient une réduction du collagène de type I [9-11,18-20,22,30,31,33,35], une augmentation de l'AH [18], ou de l'élastine [31]. Kim et al. retrouvaient à 1 mois une diminution de la fibronectine et du TGF $\beta$ 1, et à 3 mois une augmentation des glycosaminoglycans [34]. Une diminution de l'épaisseur de la lamina propria après injection était également retrouvée dans plusieurs études [11,19,20,30,31]. De Bonnecaze et al. [31] montraient la diminution du nombre de cellules inflammatoires de façon significative après injection d'ADSC. Johnson et al. [28] ont étudié l'effet de l'injection de BM-MSC et/ou de MEC synthétique, sans pouvoir conclure sur la préparation à privilégier, celle-ci variant selon l'élément de la MEC étudié. L'ajout d'hydrogel d'alginate et d'AH ne modifiait pas l'amélioration obtenue grâce aux ADSC dans l'étude de Kim et al. [22]. La matrice de collagène utilisée par Xu en association avec des ADSC donnait aussi des résultats ambigus avec, à 40 jours, d'une part un collagène augmenté et désorganisé ainsi qu'une augmentation de la fibronectine et d'autre part une augmentation de l'AH, le taux de ces protéines se normalisant ensuite à 12 mois [20]. En revanche, en associant ses BM-MSC à une MEC d'origine porcine, Choi améliorait l'effet des BM-MSC sur la synthèse d'AH et sur l'inhibition de la synthèse de collagène. Il utilisait un index de cicatrice en calculant le ratio entre réfringence rouge (fibres épaisses) et réfringence verte (fibres fines). Les BM-MSC + gel avaient le score le plus bas (1,22) comparées aux BM-MSC seules (1,82) ou au gel seul (2,91) [29]. De même, les BM-MSC utilisées en association à une éponge d'atélocollagène par Ohno avait un résultat favorable en augmentant l'AH et diminuant le collagène [27]. Les résultats de l'étude de Shiba réalisée avec des ADSC [26] sont peu informatifs car les CV cicatricielles injectées étaient comparées à des CV normales. Concernant les fibroblastes, leur prolifération,

différenciation ou apoptose n'étaient pas modifiées dans l'étude de Johnson, seule étude *in vivo* étudiant leur devenir [28].

La survie des cellules souches était variable selon les études mais les résultats cliniques étaient constants, par le biais des molécules synthétisées ou des effets induits sur les fibroblastes. Pour Svensson et al., la survie des CSM était de 5.1% à 1 mois et nulle à 10 semaines [19,20]. Dans une autre étude avec des CSE, des cellules étaient retrouvées chez 4 des 6 CV injectées à 6 semaines puis disparaissaient complètement à 3 mois [11]. Pour Hertegard et al., la survie était de 0.18% à 1 mois [35]. Hong et al. détectaient encore des ADSC chez 4 de ces 12 lapins à 12 semaines [33]. Pour Kim et al., des BM-MSC survivaient à 1 mois mais pas à 3 mois [34] et pour Hiwatashi, des BM-MSC ou ADSC étaient retrouvées à 1 mois mais pas à 6 mois [9]. De plus celles-ci n'étaient jamais détectées au niveau de la CV contralatérale ni au niveau du muscle sous-jacent. Pour Lee et al., des ADSC étaient retrouvées à 8 semaines mais pas à 24 semaines [24]. De même pour Kanemaru : à 8 semaines, les BM-MSC implantées étaient vivantes et exprimaient la kératine et la desmine, marqueurs de tissus épithelial et musculaire [36]. Dans les études de Johnson et Kim [22,28], la survie n'était pas améliorée par l'ajout respectif de MEC synthétique ou d'hydrogel d'alginate/AH. En revanche, Choi et al. augmentaient la survie de ces BM-MSC par le biais de sa MEC d'origine porcine [29].

Hu et al. ont comparé l'efficacité de l'injection d'ADSC prédifférenciées ou non en myofibroblastes à l'injection de fibroblastes de CV [37]. Sur la morphologie des CV et la sécrétion de collagène, les ADSC donnaient de meilleures résultats que les fibroblastes qu'elles soient ou non prédifférenciées. Le résultat était en revanche meilleur si les ADSC étaient prédifférenciées pour la production d'élastine. Les trois préparations avaient des résultats similaires sur la production d'AH, de decorine et de fibronectine. Hiwatashi a comparé l'effet des ADSC et des BM-MSC [8]. Dans une première étude en 2014, les bénéfices étaient similaires pour le collagène, l'AH, le VEGF, les MMP 1 et 8 et le Procollagène de type I. Les ADSC augmentaient plus le Fibroblast Growth Factor (FGF), l'HGF et la Hyaluronan Synthase (reflet de la production d'AH). Les BM-MSC augmentaient plus le Procollagène de type III. Aucune CSM ne survivait à 1 mois. La balance semblait donc pencher en faveur des ADSC. Dans une seconde étude en 2015, les CSM étaient associées à une éponge d'atélocollagène. Les bénéfices étaient comparables quant aux analyses visco-élastiques mais l'amélioration des propriétés de la MEC était supérieure avec les ADSC.

Ces articles ont montré un effet bénéfique des CSM sur la cicatrisation des CV par différents mécanismes d'action. Leur obtention nécessite toutefois une étape de culture, complexe à mettre en œuvre. La FVS possède des propriétés qui pourraient permettre d'améliorer encore ces résultats tout en offrant une logistique plus simple.

## 2) Caractéristiques et valeur ajoutée de la fraction vasculaire stromale

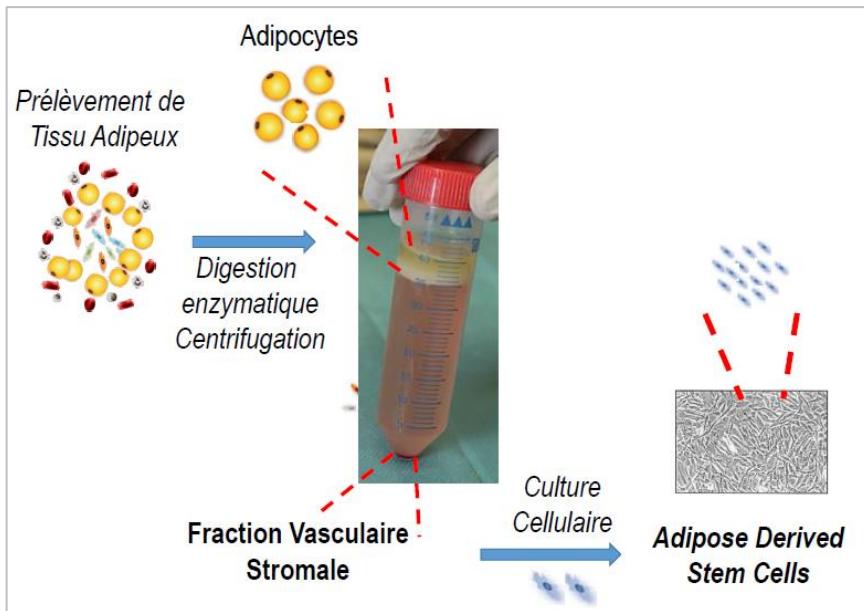
L'injection de tissu adipeux autologue est pratiquée depuis longtemps en chirurgie réparatrice selon la technique de Coleman pour favoriser la revascularisation des greffes et la reconstruction des tissus mous, sans risque de rejet. La graisse permet un effet volumateur mais aussi un effet trophique, par l'action des adipocytes matures mais surtout celle de cellules souches et de cellules progénitrices présentes dans la FVS.

En pratique, après une lipoaspiration, le tissu graisseux est lavé puis traité avec une enzyme (collagénase) afin de séparer les adipocytes et la FVS (manuellement ou à l'aide d'automates). Cette dernière est alors récupérée par centrifugation. Parfois appelées ADRC pour *Adipose Derived Regenerative Cells*, il s'agit d'une population hétérogène de cellules composée de CSM, fibroblastes, leucocytes, progéniteurs et cellules endothéliales, péricytes (Tableau 3, Fig. 1). L'IFATS (*International Federation of Adipose Therapeutics and Science*) et l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) ont élaboré des recommandations permettant une caractérisation précise des différents éléments de la FVS [38]. Les CSM peuvent être isolées et mises en culture avant l'ajout éventuel de facteurs spécifiques pour favoriser une voie de différenciation. La FVS constitue également une option thérapeutique en devenir, pouvant être injectée sans étape de mise en culture.

**Tableau 3.** Caractéristiques des Adipose-Derived Stem Cells et de la Fraction Vasculaire Stromale.

	Fraction Vasculaire Stromale	Adipose-Derived Stem Cells
Population cellulaire	Hétérogène (effet synergique)	Homogène
Délai de préparation	Quelques heures	2 à 3 semaines
Etape de culture	Non	Oui
Type d'utilisation	Autologue	Autologue ou Allogénique
Nombre de cellules	Imprévisible	Prévisible

**Figure 1.** Etapes d'obtention de la FVS et des Adipose Derived Stem Cells.



Le degré d'hétérogénéité de la FVS dépend du site du prélèvement et du procédé de digestion enzymatique utilisé [38]. Dans l'étude d'Astor et al. [39] chez le chien, les ADSC représentaient  $17 \pm 3.2\%$  des cellules de la FVS [8]. Plusieurs facteurs influençait le pourcentage d'ADSC viables par gramme : celui-ci était plus élevé dans la graisse de la paroi thoracique dorsale et du pli inguinal comparée à la graisse du ligament falciforme. Il était également supérieur chez les chiens jeunes (1<sup>er</sup> quartile de vie).

D'un point de vue réglementaire, les ADSC et la FVS sont considérées par l'Agence Européenne du Médicament comme des médicaments de thérapie innovante car ils répondent au moins à l'une des conditions suivantes :

- les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés ;
- les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur.

Elles font à ce titre l'objet d'une réglementation européenne extrêmement stricte, ne peuvent être produites que dans des centres autorisés et pour l'instant uniquement dans le cadre d'essais cliniques.

L'utilisation de la FVS dans son intégralité permet de combiner les propriétés complémentaires de ses différents composants (réparation/régénération, immunomodulation, actions anti-inflammatoire et pro angiogénique) pour une cicatrisation optimisée. De nombreux modèles expérimentaux, chez l'animal ou chez l'homme, ont ainsi montré des résultats très encourageants sur de nombreuses pathologies notamment à composante vasculaire et/ou dysimmunitaire : ischémie des membres inférieurs [40] ou cardiaque [41], sclérodermie [42], maladie du greffon contre l'hôte [43], gonarthrose [44], etc. L'absence d'étape de culture avant l'injection de la FVS permet d'accélérer le processus de fabrication avec possibilité de prélèvement et d'injection la même journée. L'injection est autologue, ce qui limite les risques infectieux et les réactions immunes par l'hôte qui peuvent avoir lieu en cas d'allogreffe. Cela évite également les modifications induites par les cultures dans l'expression de certains marqueurs de surface par rapport à leur état natif. Après plusieurs passages de culture on observe par exemple sur les CSM une perte de l'expression de CD34 et l'acquisition du marqueur  $\alpha$ -SMA. Or ces 2 marqueurs ont un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation. Dans la phase initiale d'inflammation les cellules CD34+ s'activent, changeant de forme et de taille. Dans la phase angiogénique, elles prolifèrent et commencent à exprimer l' $\alpha$ -SMA. Dans la phase de granulation, des macrophages sont recrutés, l'expression de CD34 diminue et l'expression d' $\alpha$ -SMA augmente (signe de différenciation en myofibroblastes) [45].

La FVS présente de plus une certaine facilité d'utilisation de par sa fluidité qui la rend plus facilement injectable que la graisse préparée selon la technique de Coleman.

Enfin, la sécurité d'utilisation de la FVS chez l'homme a déjà été étudiée dans plusieurs études notamment celle de Granel étudiant l'injection de FVS dans les doigts de 12 patients atteints de sclérodermie systémique. Aucun effet secondaire grave n'était survenu. Seuls quatre effets secondaires mineurs liés à la procédure et non à la FVS elle-même étaient à noter : deux ecchymoses abdominales liées à la lipoaspiration, une douleur transitoire sur un pouce et des paresthésies transitoires au niveau d'un doigt [46]. Dans cet essai, des résultats particulièrement prometteurs ont été décrits dans la fibrose cutanée mais ceux-ci ne sont que partiellement extrapolables aux CV car les fibroblastes, la matrice extracellulaire (MEC) et les facteurs de croissance y sont différents de ceux de la peau ou encore de la muqueuse orale.

La FVS n'a jamais fait l'objet d'une expérimentation chez l'animal ou chez l'homme au niveau laryngé. Si les propriétés pressenties de la FVS étaient confirmées, cela laisserait

envisager de nombreuses autres applications au sein de notre spécialité, attrayantes pour de jeunes chercheurs en quête de traitements innovants.

## F. Conclusion

Les données de la littérature et les premiers résultats expérimentaux et cliniques montrent que l'utilisation de la FVS du tissu adipeux semble être une option thérapeutique envisageable dans les lésions cicatricielles des cordes vocales. En effet les bénéfices des ADSC sont déjà prouvés mais des études complémentaires seraient nécessaires pour étudier, au sein de cordes vocales cicatricielles, la valeur ajoutée de la FVS.

## G. Références

1. Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the phonosurgery committee of the European laryngological society. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2013;270(9):2491-507.
2. Hirano M. Phonosurgery. Basic and clinical investigations. Otologia1975.
3. Gugatschka M, Kojima T, Ohno S, Kanemaru S-i, Hirano S. Recruitment Patterns of Side Population Cells During Wound Healing in Rat Vocal Folds. Laryngoscope. 2011;121(8):1662-7.
4. Hertegard S, Dahlqvist A, Goodyer E. Viscoelastic measurements after vocal fold scarring in rabbits--short-term results after hyaluronan injection. Acta Otolaryngol. 2006;126(7):758-63.
5. Molteni G, Bergamini G, Ricci-Maccarini A, et al. Auto-crosslinked hyaluronan gel injections in phonosurgery. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;142(4):547-53.
6. Friedstein A. Osteogenic stem cells in bone marrow. Bone and mineral Research. 1990:243-72.
7. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med. 2005;54(3):132-41.
8. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, et al. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. Laryngoscope. 2014;124(12):E461-9.

9. Hiwatashi N, Hirano S, Suzuki R, et al. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. *Laryngoscope*. 2016;126(5):1143-50.
10. Cedervall J, Ahrlund-Richter L, Svensson B, et al. Injection of embryonic stem cells into scarred rabbit vocal folds enhances healing and improves viscoelasticity: short-term results. *Laryngoscope*. 2007;117(11):2075-81.
11. Svensson B, Nagubothu SR, Nord C, et al. Stem Cell Therapy in Injured Vocal Folds: A Three-Month Xenograft Analysis of Human Embryonic Stem Cells. *Biomed Research International*. 2015.
12. Peng H, Ming L, Yang R, et al. The use of laryngeal mucosa mesenchymal stem cells for the repair the vocal fold injury. *Biomaterials*. 2013;34(36):9026-35.
13. Kumai Y, Kobler JB, Park H, et al. Crosstalk between adipose-derived stem/stromal cells and vocal fold fibroblasts in vitro. *Laryngoscope*. 2009;119(4):799-805.
14. Kumai Y, Kobler JB, Park H, Galindo M, Herrera VL, Zeitels SM. Modulation of vocal fold scar fibroblasts by adipose-derived stem/stromal cells. *Laryngoscope*. 2010;120(2):330-7.
15. Kishimoto Y, Hirano S, Kitani Y, et al. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *Laryngoscope*. 2010;120(1):108-13.
16. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2004;114(3):548-56.
17. Chen X, Thibeault SL. Cell-cell interaction between vocal fold fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells in three-dimensional hyaluronan hydrogel. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10(5):437-46.
18. Hiwatashi N, Bing R, Kraja I, Branski RC. Mesenchymal stem cells have antifibrotic effects on transforming growth factor- $\beta$ 1-stimulated vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope*. 2016;Jun 27.
19. Svensson B, Nagubothu SR, Cedervall J, et al. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of vocal folds after scar excision--a xenograft analysis. *Laryngoscope*. 2011;121(10):2185-90.
20. Svensson B, Nagubothu RS, Cedervall J, et al. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of scarred vocal folds: analysis using a xenograft model. *Laryngoscope*. 2010;120(7):1370-5.

21. Xu W, Hu R, Fan E, Han D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in collagen-hyaluronic acid gel composite scaffolds for vocal fold regeneration. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2011;120(2):123-30.
22. Kim YM, Oh SH, Choi JS, et al. Adipose-derived stem cell-containing hyaluronic acid/alginate hydrogel improves vocal fold wound healing. *Laryngoscope*. 2014;124(3):E64-72.
23. Kwon SK, Lee BJ. The Combined Effect of Autologous Mesenchymal Stem Cells and Hepatocyte Growth Factor on Vocal Fold Regeneration and Fibrosis in Vocal Fold Wound. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2008;5(4-6):735-42.
24. Lee BJ, Wang SG, Lee JC, et al. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):198-204.
25. Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, et al. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(11):915-20.
26. Shiba TL, Hardy J, Luegmair G, Zhang ZY, Long JL. Tissue-Engineered Vocal Fold Mucosa Implantation in Rabbits. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2016;154(4):679-88.
27. Ohno S, Hirano S, Kanemaru S, et al. Implantation of an atelocollagen sponge with autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for treatment of vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2011;120(6):401-8.28. Johnson BQ, Fox R, Chen X, Thibeault S. Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats. *Laryngoscope*. 2010;120(3):537-45.
29. Choi JW, Park JK, Chang JW, et al. Small intestine submucosa and mesenchymal stem cells composite gel for scarless vocal fold regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(18):4911-8.
30. Angelou V, Kalodimou V, Messini Irini, Psychalakis N, Eleftheria K, Papalois A. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Regeneration of Vocal Folds: A Study on a Chronic Vocal Fold Scar. *Stem Cells International*. 2016.
31. De Bonnecaze G, Chaput B, Woisard V, et al. Adipose stromal cells improve healing of vocal fold scar: Morphological and functional evidences. *Laryngoscope*. 2016;126(8):E278-E85.
32. Friedrich G. [Basic principles for indications in phonosurgery]. *Laryngorhinootologie*. 1995;74(11):663-5.

33. Hong SJ, Lee SH, Jin SM, et al. Vocal fold wound healing after injection of human adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(11):1198-204.
34. Kim YM, Yi T, Choi JS, et al. Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells as a source of cell therapy for promoting vocal fold wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013;122(2):121-30.
35. Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, et al. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1248-54.
36. Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, et al. Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(12):907-12.
37. Hu R, Ling W, Xu W, Han D. Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. *PLoS One*. 2014;9(3):e92676.
38. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.
39. Astor DE, Hoelzler MG, Harman R, Bastian RP. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 2013;77(3):177-82.
40. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245-57.
41. LeBlanc AJ, Touroo JS, Hoying JB, Williams SK. Adipose stromal vascular fraction cell construct sustains coronary microvascular function after acute myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012;302(4):H973-H82.
42. Daumas A, Guillaume-Jugnot P, Magalon J, et al. Long term efficacy of subcutaneous injection of the autologous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) in the fingers of patients with systemic sclerosis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2015;29:17-8.

43. Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. Lancet Haematol. 2016;3(1):e45-52.
44. Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, Kim YS, Yeo JE. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2015;23(5):1308-16.
45. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lizartza K, et al. Behavior of In Situ Human Native Adipose Tissue CD34+Stromal/Progenitor Cells During Different Stages of Repair. Tissue-Resident CD34+Stromal Cells as a Source of Myofibroblasts. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 2015;298(5):917-30.
46. Granel B, Daumas A, Jouve E, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. Annals of the Rheumatic Diseases. 2015;74(12):2175-82.

## **II. Résultats de l'essai clinique CELLCORDES - Première injection chez l'homme de fraction vasculaire stromale autologue d'origine adipeuse dans des cordes vocales cicatricielles : essai clinique prospectif ouvert de phase I (Article 2)**

Cette article a été soumis le 15/01/2019 à la revue PlosMedicine (réponse en attente).

### **A. Auteurs et affiliations**

Alexia Mattei<sup>1,2,\*</sup>, Baptiste Bertrand<sup>3,4</sup>, Elisabeth Jouve<sup>5</sup>, Théo Blaise<sup>5</sup>, Cécile Philandrianos<sup>3,4</sup>, Fanny Grimaud<sup>6</sup>, Laurent Giraudo<sup>6</sup>, Houssein Aboudou<sup>6</sup>, Chloé Dumoulin<sup>6</sup>, Laurent Arnaud<sup>6</sup>, Joana Revis<sup>1,2</sup>, Camille Galant<sup>1,2</sup>, Mélanie Velier<sup>6,7</sup>, Julie Veran<sup>6</sup>, Françoise Dignat-George<sup>6,7</sup>, Patrick Dessi<sup>1,8</sup>, Florence Sabatier<sup>6,7</sup>, Jérémie Magalon<sup>6,7</sup>, Antoine Giovanni<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> APHM, CHU La Conception, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, Marseille, France.

<sup>2</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, LPL, Aix-en-Provence, France.

<sup>3</sup> Aix Marseille Univ, Marseille, France.

<sup>4</sup> APHM, CHU La Conception, Service de Chirurgie Plastique et Réparatrice, Marseille, France.

<sup>5</sup> Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, Inst Neurosci Syst, Service de Pharmacologie Clinique et Pharmacovigilance, CIC-CPCET, Marseille, France.

<sup>6</sup> Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, CBT-1409, CHU La Conception, Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, Marseille, France.

<sup>7</sup> Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France.

<sup>8</sup> Aix-Marseille Univ, CNRS, EFS, ADES, Marseille, France.

### **B. Résumé**

Introduction : Les patients présentant des cordes vocales cicatricielles, qu'elles soient d'origine congénitale ou après phonochirurgie, présentent souvent une dysphonie ayant un impact négatif majeur sur leur vie quotidienne et dont le traitement est difficile. La fraction

vasculaire stromale (FVS) autologue d'origine adipeuse est de plus en plus reconnue comme une source facilement accessible de cellules aux propriétés angiogéniques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et régénératrices. Notre objectif était d'évaluer la faisabilité, la sécurité, la tolérance et l'efficacité potentielle des injections locales de FVS autologue d'origine adipeuse chez des patients présentant des cordes vocales cicatricielles.

Méthodes et Résultats : Cet essai pilote de phase I était une étude prospective, ouverte, non contrôlée et monocentrique, avec un suivi de 12 mois auprès de 8 patients (7 femmes et 1 homme) présentant une dysphonie sévère due à des cordes vocales cicatricielles (Voice Handicap Index [VHI] > 60/120). La FVS était préparée et injectée dans une ou deux cordes vocales. Le critère de jugement principal était la faisabilité, le nombre et la gravité des effets indésirables liés au traitement à base de FVS. Les critères d'évaluation secondaires étaient les modifications du bilan vocal, de la vidéolaryngostroboscopie et de l'auto-évaluation de la dysphonie et de la qualité de vie, à 1, 6 et 12 mois après injection.

La sécurité et la faisabilité étaient évidentes puisque ne sont survenus que des événements indésirables liés à la liposuccion et à l'injection de FVS qui étaient prévus et se sont résolus spontanément pour la plupart. Un patient a nécessité des massages par un kinésithérapeute pour drainer un hématome au niveau des zones de liposuccion et un autre s'est plaint d'une gêne esthétique liée à un défaut adipeux au niveau du site de liposuccion. À 12 mois, le VHI était amélioré chez tous les patients, avec une amélioration moyenne par rapport aux valeurs initiales de  $40,1 \pm 21,5$  points ( $p = 0,012$ ). Sept patients ont été considérés comme répondeurs soit une amélioration  $\geq 18$  points correspondant à la différence minimale cliniquement pertinente pour le VHI. Une tendance à l'amélioration de la raucité de la voix dans l'analyse perceptive a également été observée.

Les principales limites étaient celles d'une étude pilote (nombre limité de patients, différentes étiologies de cordes vocales cicatricielles impliquées, essai ouvert sans groupe témoin).

Conclusions : Cette étude valide la sécurité de l'injection autologue de FVS d'origine adipeuse dans les cordes vocales cicatricielles et suggère une efficacité potentielle qui devra être confirmée par la réalisation d'un essai clinique randomisé, versus placebo, sur une population plus importante.

L'étude est enregistrée sur ClinicalTrials.gov (NCT02622464).

## C. Abréviations

ADSC (Adipose-Derived Stem Cells) : cellules souches mésenchymateuses d'origine adipeuse.

CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblastic) : test étudiant le pouvoir clonogénique de différentes cellules. Chaque colonie cellulaire formée dérive d'une seule cellule initiatrice appelée CFU-F.

CSM (Cellules Souches / Stromales Mésenchymateuses) : cellules pluripotentes capables de générer différents tissus du mésoderme.

DAB (Débit d'Air Buccal) : mesure par un pneumotachographe du débit d'air moyen lors d'une phonation soutenue pendant une durée confortable, à hauteur et intensité habituelles et suivant une inspiration standard (cm<sup>3</sup> / seconde).

FVS (Fraction Vasculaire Stromale) : après liposuccion, le tissu adipeux est lavé et digéré avec une enzyme, la collagénase, pour séparer les adipocytes de la FVS, manuellement ou à l'aide d'automates. Cette fraction aqueuse correspond à une population hétérogène de cellules comprenant des ADSC, des fibroblastes, des leucocytes, des cellules et progéniteurs endothéliaux et des péricytes.

MedDRA: Medical Dictionary for Regulatory Activities.

PSG (Pression Sous-Glottique estimée au seuil phonatoire) : pression sous-glottique minimale nécessaire pour initier et maintenir la vibration des cordes vocales (hectopascals).

TMP (Temps Maximum de Phonation) : consiste en la réalisation d'une voyelle /a:/ tenue le plus longtemps possible, après une inspiration maximale et à une hauteur et une intensité confortable et spontanée (secondes).

VHI (Voice Handicap Index) : questionnaire d'auto-évaluation utilisé pour évaluer le ressenti du patient quant à l'impact de sa dysphonie sur ces activités quotidiennes.

## D. Introduction

La microstructure des cordes vocales est complexe [1,2], notamment du fait de son organisation feuillettée. Les proportions et l'organisation des différents composants de la matrice extracellulaire dans chaque couche déterminent en grande partie les propriétés mécaniques des cordes vocales. Après une intervention de phonochirurgie, on observe parfois des cordes vocales cicatricielles dues à la disparition partielle de la lamina propria (sous-muqueuse), la couche superficielle et / ou intermédiaire étant remplacée(s) par du tissu fibreux. Le découplage mécanique de l'épithélium et du muscle n'est plus possible et la vibration des cordes vocales

est altérée. Cela s'accompagne souvent d'une perte de volume à l'origine d'une insuffisance glottique. Un tissu cicatriciel peut également être retrouvé sans étiologie iatrogène, d'origine congénitale (sulcus) ou plus souvent acquise via un mécanisme similaire à celui des vergetures cutanées ou à la suite de traumatismes ou de phénomènes inflammatoires chroniques.

L'impact vocal de telles cicatrices peut être handicapant, en particulier pour les professionnels de la communication. Ces patients présentent généralement une dysphonie ancienne, une perte de contrôle vocal, une fatigue vocale, une voix soufflée, souvent trop aiguë et instable.

Les options thérapeutiques actuelles sont limitées, en grande partie du fait de la complexité de la micro-structure des cordes vocales [1]. Dans les cas où le problème prédominant est l'insuffisance glottique, les procédures de médialisation se sont révélées efficaces [1,3]. Lorsque la rigidité est la caractéristique principale, d'autres techniques ont déjà été décrites (résection de cicatrice, microlambeau [4], acide hyaluronique [5,6]...) mais sont souvent décevantes, surtout à long terme [7–9], et peuvent parfois aggraver la situation en conduisant à des cicatrices supplémentaires. Ainsi, l'identification de stratégies innovantes susceptibles d'améliorer les propriétés mécaniques vibratoires des cordes vocales reste un défi clinique important [1,3].

La fraction vasculaire stromale (FVS) autologue d'origine adipeuse correspond à une population hétérogène de cellules comprenant des cellules souches / stromales mésenchymateuses (CSM), des fibroblastes, des leucocytes, des cellules et progéniteurs endothéliaux et des péricytes [10]. Elle est de plus en plus reconnue comme une source facilement accessible de cellules présentant des propriétés angiogéniques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et régénératrices [11]. Des études pré-cliniques et cliniques récentes ont également confirmé le potentiel antifibrotique de la FVS, principalement attribué aux CSM.

Plusieurs études pré-cliniques ont montré que les cellules souches dérivées du tissu adipeux (Adipose-Derived Stem Cells, ADSC) pouvaient avoir un impact sur les processus physiopathologiques sous-jacents à la formation des cicatrices des cordes vocales. La co-culture d'ADSC avec des fibroblastes issus de tissu cicatriciel entraînait une diminution de leur prolifération, une expression réduite de l' $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (marqueur de la différenciation en myofibroblastes) et la production d'une matrice extracellulaire avec moins de collagène et plus d'acide hyaluronique [12,13]. Des études *in vivo* portant sur des cordes vocales cicatricielles (après création d'une cicatrice par laser, électro-cautérisation ou instruments froids) dans lesquelles étaient injectées des ADSC immédiatement après blessure ou après un intervalle plus long (de 4 jours à 18 mois) ont montré des améliorations significatives lors du

suivi allant de 2 à 12 mois [14], à la fois sur les aspects macroscopiques et histologiques des cordes vocales [15-24] et sur leurs propriétés viscoélastiques [16,18,22,25].

Notre hypothèse est que l'utilisation de la FVS dans sa totalité pourrait avoir des avantages importants par rapport aux ADSC seules. En effet, celle-ci pourrait permettre d'optimiser le processus de guérison en combinant les propriétés complémentaires de ses différents composants : réparation / régénération des tissus, immunomodulation et action anti-inflammatoire et pro-angiogénique. En termes de logistique, la fabrication de la FVS est plus simple et évite la nécessité d'une étape de culture cellulaire. De plus, l'innocuité et l'efficacité des cellules de la FVS ont déjà été examinées dans diverses pathologies, notamment celles comportant des composantes vasculaires ou immunitaires telles que la cicatrisation des brûlures [26], l'ischémie des membres inférieurs [27], l'infarctus du myocarde [28], la maladie du greffon contre l'hôte [29], la sclérodermie systémique [30].

Cependant, l'extrapolation aux cordes vocales des bénéfices déjà prouvés de la FVS doit être prudente car les acteurs du processus de cicatrisation (fibroblastes, composants de la matrice extracellulaire, facteurs de croissance etc.) y diffèrent de ceux de la peau ou de la muqueuse buccale [31]. Néanmoins, les résultats observés chez le premier patient traité [32] nous ont encouragés à inclure et suivre un plus grand nombre de patients.

Le but de cette étude était d'évaluer la faisabilité et la sécurité des injections locales de FVS autologue d'origine adipeuse, et de fournir une évaluation préliminaire de son efficacité en tant que stratégie thérapeutique innovante pour les patients présentant des cordes vocales cicatricielles.

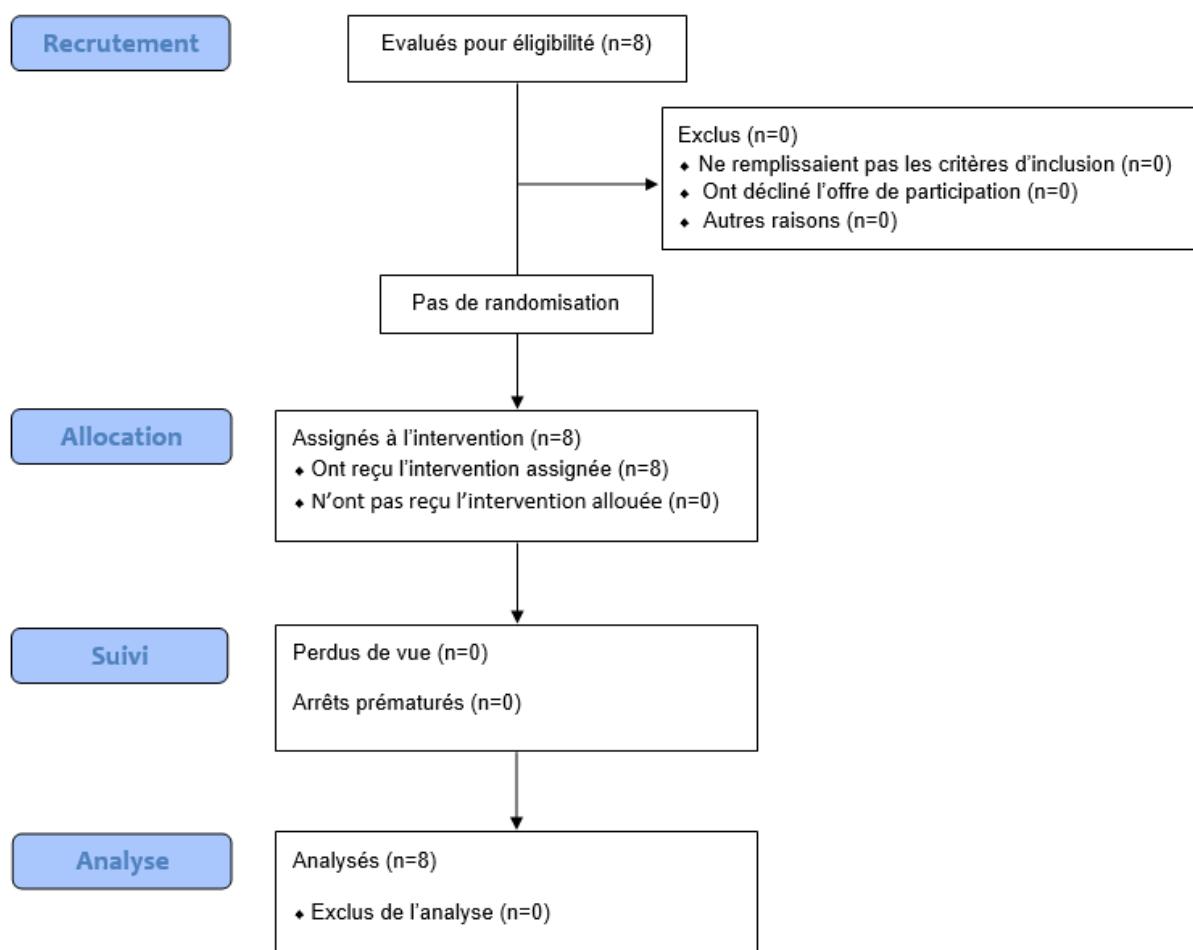
## E. Méthodes

### 1) Conception de l'étude et critères d'éligibilité

Il s'agissait d'une étude de phase I, prospective, ouverte, non-contrôlée, monocentrique, visant à évaluer la faisabilité et la sécurité de la FVS autologue d'origine adipeuse injectée localement dans des cordes vocales cicatricielles (ClinicalTrials.gov, numéro NCT02622464). Huit patients présentant des cordes vocales cicatricielles ont été inclus entre avril 2016 et juin 2017 (Figure 1). Quatre de ces patients avaient déjà été pris en charge chirurgicalement pour ces cordes vocales cicatricielles, sans amélioration notable (résection de cicatrice ( $n = 4$ ) et injection de corticostéroïdes ( $n = 1$ )). L'étude a été approuvée par l'Agence Nationale de

Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et par un comité d'éthique (CPP Sud Méditerranée V, 21.04.2015). Elle a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé écrit pour participer à l'essai et pour la publication des détails de leur cas (comme indiqué dans le formulaire de consentement PLOS). Un comité de surveillance a examiné et évalué les données d'étude accumulées concernant la sécurité, la conduite de l'étude et le suivi des participants.

**Figure 1.** Diagramme de flux CONSORT pour les essais cliniques de phase I, ouverts, non contrôlés.



Tous les patients remplissaient les critères d'inclusion et d'exclusion (listés dans le Tableau 1).

**Tableau 1.** Critères d'inclusion et d'exclusion pour l'essai Clinique CELLCORDES.

Critères d'inclusion	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Affiliation à la sécurité sociale</li><li>- Signature du formulaire de consentement éclairé</li><li>- Difficultés vocales ressenties comme handicapantes (<math>VHI &gt; 60/120</math>)</li><li>- Présence de lésions cicatricielles des cordes vocales causées soit par la chirurgie initiale soit par une pathologie congénitale de type sulcus</li><li>- Aspect cicatriciel du tiers moyen des cordes vocales en stroboscopie</li><li>- Délai d'au moins 1 an par rapport à la chirurgie initiale le cas échéant</li><li>- Patients âgés de 18 à 65 ans</li><li>- Bon état général, selon l'anamnèse et l'examen clinique</li><li>- Test de grossesse négatif et méthode de contraception fiable pour les femmes en âge de procréer</li></ul>	
<b>Critères d'exclusion</b>	
Spécifiques	Non spécifiques
<ul style="list-style-type: none"><li>- Refus de la rééducation orthophonique</li><li>- Patients opérés d'une lésion maligne ou à potentiel malin (dysplasie sévère) de la corde vocale cicatricielle</li><li>- Contre-indication à l'anesthésie</li><li>- Patients sous anti-coagulants</li><li>- Patients présentant des troubles de la coagulation (<math>TP &lt; 65\%</math>, <math>TCK &gt; 1,2</math>)</li><li>- Pathologies infectieuses actives</li><li>- Sérologies positives parmi VIH, VHC, VHB, HTLV I et II, syphilis</li><li>- Patients nécessitant une antibioprophylaxie per opératoire</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Prise d'un médicament expérimental dans les 3 mois</li><li>- Refus ou incapacité de respecter les procédures de l'étude</li><li>- Femmes enceintes ou allaitantes</li><li>- Personnes majeures protégées par la loi (sous tutelle ou curatelle)</li><li>- Personnes séjournant dans un établissement sanitaire ou social</li><li>- Mineurs</li><li>- Personnes non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale</li><li>- Personnes privées de liberté ou détenues</li><li>- Personnes en situation d'urgence</li></ul>

## 2) Lipoaspiration et Préparation de la Fraction Vasculaire Stromale

La lipoaspiration était réalisée sous sédation consciente avec anesthésie locale. Elle était réalisée avec une seringue de 10 ml en circuit fermé, à l'aide d'une canule Khouri de 3 mm et d'un sac de prélèvement de 500 ml. Au moins 100 ml de tissu adipeux étaient recueillis puis immédiatement transportés dans l'unité de thérapie cellulaire agréée et transférés dans le système Celution 800/CRS (Cytori Therapeutics Inc., San Diego, Californie, États-Unis). Le tissu adipeux recueilli était alors lavé et digéré par une enzyme, la collagénase, pour obtenir la FVS conformément à la réglementation européenne et aux bonnes pratiques de fabrication (Good Manufacturing Practices, GMP) des «médicaments de thérapie innovante». Les cellules étaient concentrées, lavées, récupérées de manière aseptique et remises en suspension dans 5

ml de solution de Ringer Lactate à l'aide de réactifs de qualité GMP. Au moins un millilitre était prélevé pour injection (en fonction du nombre de cordes vocales à traiter) et les cellules restantes étaient utilisées pour les tests de stérilité et de caractérisation biologique. Le compte du total des cellules nucléées viables et la viabilité cellulaire étaient déterminées en utilisant l'appareil Nucleocounter NC100 (ChemoMetec, Danemark). Les sous-populations cellulaires au sein de la FVS étaient identifiées par une analyse en cytométrie de flux (appareil Beckman Navios) conformément aux directives de l'International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS) et de l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) [33]. Un panel de marqueurs incluant NucBlue comme marqueur de viabilité et des anticorps associés à un fluorochrome dirigés contre des antigènes de surface cellulaire était utilisé : CD14-FITC, CD90-FITC, CD146-PE, CD34-ECD, CD45-PC5. Des anticorps de contrôle isotypiques étaient utilisés pour déterminer la fluorescence non spécifique. Les débris, les globules rouges et les cellules mortes ont été exclus de l'analyse. La fréquence des ADSC était estimée à l'aide du test clonogénique de formation de colonies fibroblastiques (CFU-F).

Au cours de la préparation de la FVS (4 heures), les patients étaient réveillés et transportés vers la salle de réveil.

### 3) Protocole thérapeutique

La deuxième étape chirurgicale consistait en l'injection de FVS, sous anesthésie générale (laryngoscopie directe en suspension). La suspension de FVS était injectée à l'aide d'une aiguille 14 G dans le tiers antérieur et / ou moyen d'une ou des deux cordes vocales cicatricielles. Le tissu fibreux n'était pas réséqué afin d'éviter l'augmentation de l'atrophie cordale. Toutes les injections de FVS ont été effectuées par un seul laryngologue.

Les patients étaient autorisés à sortir de l'hôpital le soir même (chirurgie ambulatoire) ou le lendemain, avec une prescription de paracétamol 1 g 4 fois par jour pendant 7 jours en cas de douleurs et d'amoxicilline - acide clavulanique 1 g 3 fois par jour pendant 2 jours (après vérification de l'absence d'allergie). Une rééducation orthophonique postopératoire standard était prescrite après la chirurgie.

#### 4) Évaluation clinique

Les critères premiers de faisabilité et de sécurité étaient les suivants: i) au cours de la chirurgie, la faisabilité d'une injection sous-épithéliale sans rupture épithéliale; ii) après l'injection, évaluation des effets indésirables potentiels au jour 7 ( $\pm$  4 jours) et aux mois 1 ( $\pm$  7 jours), 6 ( $\pm$  30 jours) et 12 ( $\pm$  30 jours), conformément au dictionnaire médical MedDRA (MedDRA version 21.0). Les critères d'évaluation secondaire correspondaient à l'évaluation de l'efficacité à 1, 6 et 12 mois (à l'exception du SF36 évalué à 6 et 12 mois seulement).

Le bilan vocal comprenait : 1) l'auto-évaluation de la dysphonie à l'aide du Voice Handicap Index (VHI) ; 2) l'auto-évaluation de la qualité de vie à l'aide du score SF-36 (Short Form Health Survey en 36 items) ; 3) la vidéolaryngostroboscopie permettant d'évaluer la fermeture, la régularité et la vibration des cordes vocales (onde muqueuse) [34] ; 4) l'analyse perceptive avec l'échelle GRB simplifiée dérivée de l'échelle GRBAS proposée par Hirano [35] (G pour globale, R pour raucité, B pour « breathiness » soit « soufflée » en français) ; 5) l'analyse acoustique comprenant le rapport signal sur bruit (quantifie la partie apériodique du signal vocal : plus il est élevé, meilleure est la qualité) et l'étendue vocale (différence entre la fréquence maximale et la fréquence minimale) ; 6) l'analyse aérodynamique comprenant le Temps Maximum de Phonation (TMP) et le Débit d'Air Buccal (DAB) qui permettent de quantifier la fuite d'air glottique (si la fuite est importante, le TMP est court et le DAB élevé), ainsi que la Pression Sous-Glottique estimée (PSG) au seuil phonatoire (pression sous-glottique minimale nécessaire pour déclencher et maintenir la vibration des cordes vocales) [34].

Le Voice Handicap Index (VHI) est composé de 3 parties (E = sous-échelle émotionnelle, F = sous-échelle fonctionnelle, P = sous-échelle physique), un score faible indiquant la perception d'une voix de bonne qualité. Les patients étaient considérés comme répondreurs après injection s'ils obtenaient la différence minimale cliniquement pertinente (Minimal Clinically Important Difference, MCID) définie par Jacobson comme une modification du score VHI total d'au moins 18 points [36].

Le SF36 est une échelle générique de qualité de vie composée de 36 items décrivant huit dimensions (fonctionnement physique, limitations liées aux problèmes physiques, limitations liées aux problèmes émotionnels, vitalité, bien-être émotionnel, fonctionnement sociale, douleur physique et état général de santé perçu) [37] ; et deux scores synthétiques : un score physique (Physical Component Score, PCS) et un score mental (Mental Component Score,

MCS) [38]. Chaque dimension varie de 0 à 100 : plus le score est élevé, meilleur est l'état de santé perçu.

Tous les enregistrements vidéolaryngoscopiques avant injection et à 12 mois de suivi ont été analysés par le même laryngologue expérimenté, dans un ordre aléatoire et à l'aveugle. Pour l'analyse perceptive, tous les enregistrements vocaux avant injection puis à 6 et 12 mois de suivi ont été évalués par un jury composé de 3 orthophonistes expérimentées, dans un ordre aléatoire et également à l'aveugle.

## 5) Analyses statistiques

Aucun calcul formel de la taille de l'échantillon n'avait été effectué. La taille de l'échantillon a été fixée à 8 patients sur la base de considérations empiriques : étude pilote sans hypothèse formelle et testée sur le critère principal d'innocuité, situation clinique relativement rare, taille d'échantillon habituelle des études sur les thérapies innovantes.

L'analyse de l'innocuité était descriptive et basée sur les événements indésirables survenus en cours de traitement. Les événements indésirables ont été codés selon un dictionnaire des effets indésirables établi et validé (Dictionnaire médical MedDRA version 21.0, [www.meddra.org/](http://www.meddra.org/)).

Les données continues sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type (ET), de médiane et d'étendue (minimum - maximum). Les évaluations aux mois 1 (M1), 6 (M6) et 12 (M12) ont été comparées par rapport aux valeurs initiales à l'aide du test de Wilcoxon. Les données dichotomiques ont été analysées à l'aide d'un test binomial. L'objectif principal de l'étude étant la sécurité, les critères d'efficacité ont été jugés comme exploratoires. Le calcul de la p-value a été fait à l'aide de tests nominaux, une valeur de  $p \leq 0,05$  (test bilatéral) a été considéré comme significatif. Les résultats n'ont pas été corrigés pour les comparaisons multiples. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'IBM SPSS Statistics (version 20.0).

## F. Résultats

### 1) Caractéristiques des patients et de la FVS

Les données démographiques des 8 patients et les doses de FVS injectées sont présentées dans le Tableau 2. L'indice de masse corporelle (IMC) médian était de 25,6 (20,4 - 28,1). Le tissu adipeux a été prélevé au niveau abdominal chez 6 patients et au niveau des cuisses chez 2 patients. Tous les patients inclus ont bénéficié d'une injection et il n'y a pas eu d'arrêts prématurés de suivi ni de patients perdus de vue. Toutes les injections sous-épithéliales ont été effectuées sans rupture épithéliale, démontrant ainsi la faisabilité de la technique. Un patient (le patient 7) n'a pas effectué la rééducation orthophonique post-opératoire malgré une prescription adéquate, en raison de problèmes familiaux. Les patients ont reçu une dose médiane de  $7,5 \times 10^6$  (2,2 à 13,6) cellules viables. Les cellules injectées contenaient une médiane de 3,1% (1,3 - 8,0) CFU-F (Tableau 2, Tableau 3). La caractérisation par cytométrie de flux des sous-populations cellulaires présentes dans la FVS est présentée dans le Tableau 3.

**Tableau 2.** Données démographiques des patients et doses de FVS.

Patient	Genre	Age	Etiologie	Durée de la maladie (années)*	Volume injecté (mL)	Nombre de CNV injectées ( $\times 10^6$ )
1	F	55	Phonochirurgie	8	G 0.30 ; D 0.70	G 4.1 ; D 9.5
2	F	43	Phonochirurgie	4	G 0.45 ; D 0.45	G 6.1 ; D 6.1
3	H	43	Sulcus	> 20	G 0.50 ; D 0.75	G 1.1 ; D 1.6
4	F	44	Phonochirurgie	13	G 0.50 ; D 0.50	G 3.6 ; D 3.6
5	F	59	Phonochirurgie	6	G 0.00 ; D 1.00	G 0.0 ; D 10.3
6	F	49	Sulcus	> 20	G 0.50 ; D 0.50	G 3.2 ; D 3.2
7	F	39	Phonochirurgie	3	G 0.40 ; D 0.60	G 0.9 ; D 1.3
8	F	25	Phonochirurgie	1	G 0.30 ; D 0.70	G 2.3 ; D 5.5
Moyenne	-	44.6	-	5.8	G 0.37 ; D 0.65	G 2.7 ; D 5.1
Ecart-type	-	10.4	-	4.3	G 0.17 ; D 0.18	G 2.0 ; D 3.4
Médiane	-	43.5	-	5	G 0.42 ; D 0.65	G 2.8 ; D 4.5
Minimum	-	25	-	1	G 0.00 ; D 0.50	G 0.0 ; D 1.3
Maximum	-	59	-	13	G 0.45 ; D 1.00	G 6.1 ; D 10.3

Abréviations : F: Femme ; H : Homme; G : corde vocale Gauche ; D : corde vocale Droite ; CNV : Cellules Nucléées Viables.

\* Analyse statistique portant uniquement sur les étiologies non congénitales (n=6).

**Table 3.** Caractéristiques du tissu adipeux prélevé et de la FVS.

	Moyenne ± Ecart-type ; Médiane (minimum - maximum)
Volume de tissu adipeux prélevé (ml)*	171 ± 79 ; 163 (100 - 340)
Volume de FVS injectée au total (ml)	1.02 ± 0.10 ; 1.00 (0.90 - 1.25)
Nombre de cellules de FVS injectées après contrôle qualité (millions)	7.8 ± 4.1 ; 7.5 (2.2 ; 13.6)
Viabilité (%)	84.5 ± 4.3 ; 84.0 (80.0 - 93.4)
<i>Leucocytes (%)</i>	28.2 ± 8.5 ; 29.3 (15.7 - 42.8)
<i>Macrophages (%)</i>	8.7 ± 3.1 ; 8.5 (3.8 - 13.0)
<i>Cellules endothéliales (%)</i>	6.3 ± 3.8 ; 5.4 (2.2 - 14.1)
<i>Péricytes (%)</i>	19.9 ± 11.6 ; 19.7 (6.0 - 37.1)
<i>Cellules stromales (%)</i>	36.8 ± 8.6 ; 37.4 (25.5 - 52.3)
CFU-F (%)	3.7 ± 2.1 ; 3.1 (1.3 - 8.0)

\* volume net, après retrait du liquide d'infiltration

## 2) Sécurité et tolérance de l'injection autologue de FVS

Tous les patients ont quitté l'hôpital dans les 24 heures suivant la chirurgie. Aucun événement indésirable grave lié à l'injection de FVS n'a été relevé au cours du suivi. Deux effets indésirables graves ont été signalés à l'autorité de pharmacovigilance : une pancréatite aiguë et une rupture de prothèse mammaire. Aucun n'a été jugé en lien avec le protocole de l'étude ou la FVS. Les effets indésirables mineurs considérés comme potentiellement liés à la procédure (douteux ou possible) sont présentés dans le Tableau 4. La plupart d'entre eux se sont résolus spontanément. Tous les patients présentaient des ecchymoses induites par la lipoaspiration, d'une durée de 7 jours à 1 mois. Un patient a pris du tramadol en plus du paracétamol pendant deux jours et un autre a bénéficié de massages par un kinésithérapeute en raison de douleurs crurales persistantes. Un patient s'est plaint d'une gêne esthétique liée à la liposucción (défaut de graisse avec dépression sous-cutanée). Celle-ci a été corrigée sans séquelles par un lipofilling crural 6 mois après la chirurgie initiale. Les points de suture au niveau des zones de lipoaspiration se sont résorbés en moins de 7 jours après la chirurgie. Enfin, il est important de noter que l'auto-évaluation de la dysphonie n'a empiré pour aucun patient.

**Tableau 4.** Effets indésirables potentiellement liés à l'intervention pour chaque patient et leur durée (termes préférentiels selon le dictionnaire MedDRA 21.0).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8
Odynophagie	3 j	-	-	-	4 j	-	-	-
Ulcération buccale	-	-	-	9 j	-	-	-	-
Asthénie	-	-	-	8 j	-	-	-	-
Hématomes ou ecchymoses	1 m	7 j	1 m	19 j	22 j	5 j	7 j	15 j
Douleurs post-opératoires	-	1 m	-	-	-	-	1 m	12 m
Douleurs mandibulaires	-	5 j	8 m‡	-	-	-	-	-
Dysgueusie	-	-	1 m	-	-	-	-	-
Céphalées	-	-	1m‡	-	-	-	-	-
Tremblements	-	-	2m‡	-	-	-	-	-
Hémoptysie*	-	-	7 j	-	-	-	3 j	-
Toux productive	-	-	1 m	-	-	-	-	-
Rhinorrhée	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermatite allergique†	-	-	-	16 j	-	-	-	-
Lipodystrophie§	-	-	-	6 m	-	-	-	-

Abréviations : j : jour (s) ; m: mois

\*Crachats striés de sang. †Dermatite allergique aux pansements. ‡Le patient 3 rapportait des symptômes en lien avec la récupération d'une voix de forte intensité : une sensation de résonnance dans le crâne, les joues et les membres inférieurs. §Le patient 4 se plaignait d'une gêne esthétique par défaut adipeux.

### 3) Efficacité de l'injection autologue de FVS d'origine adipeuse

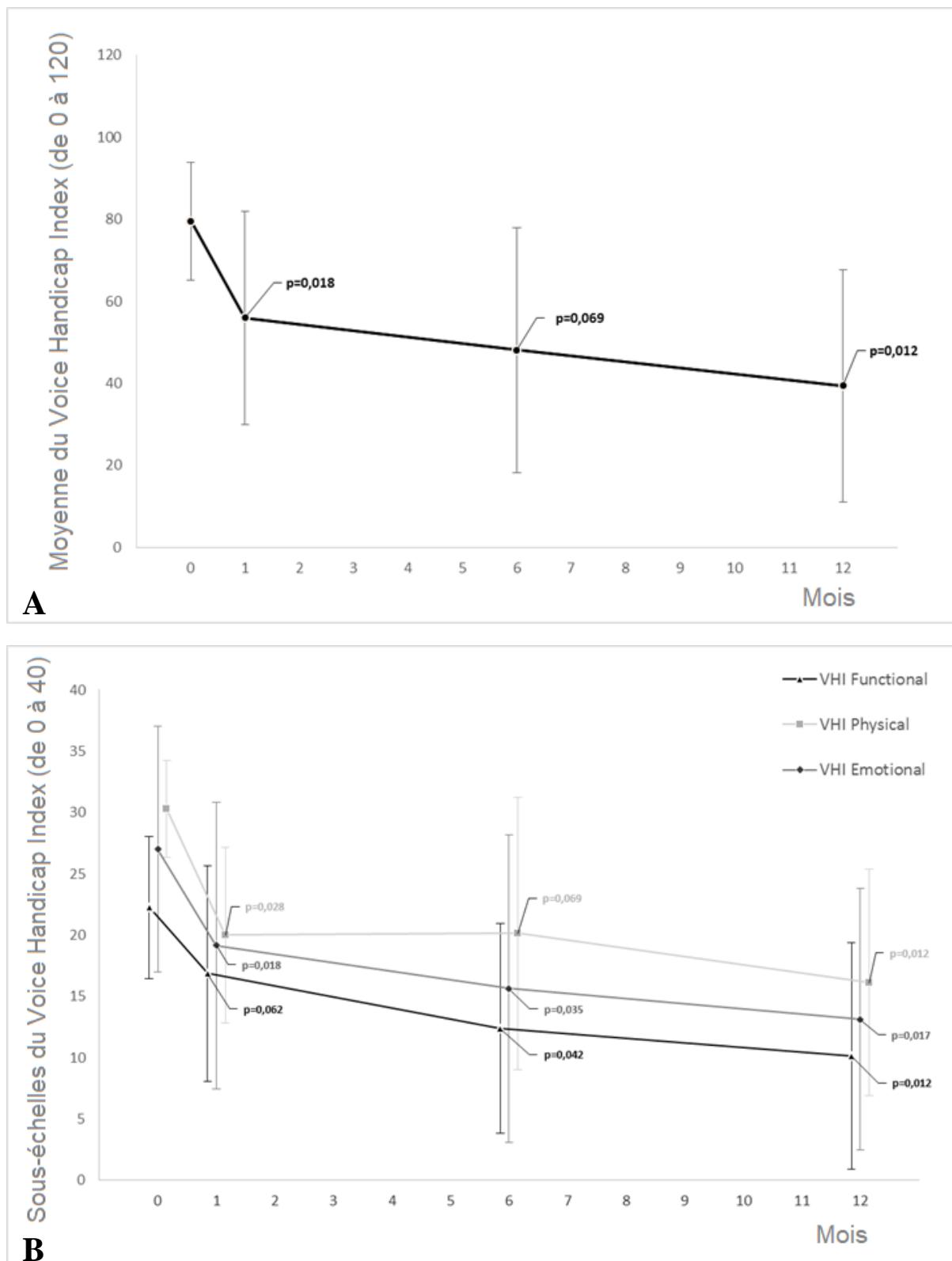
Les critères secondaires d'efficacité sont détaillés en données supplémentaires (Tableau S1).

#### a) Effets sur l'auto-évaluation de la dysphonie

A 12 mois, l'amélioration de la dysphonie se manifestait par une diminution moyenne du VHI de  $40,1 \pm 21,5$  points par rapport au score initial ( $p = 0,012$ , Figure 2). Chaque sous-échelle (sous-échelles émotionnelle, fonctionnelle et physique) était significativement améliorée (Figure 3). Sept des huit patients traités (87,5%) étaient considérés comme répondreurs avec une amélioration de plus de 18 points (changement minimum cliniquement pertinent du score VHI,  $p = 0,070$ ).

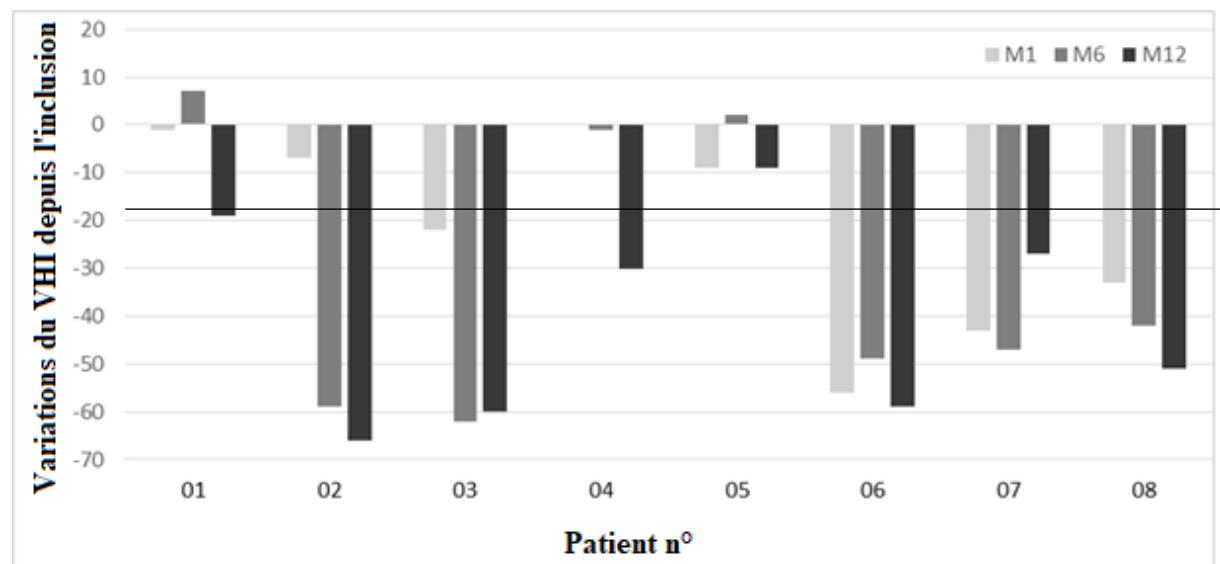
**Figure 2.** Voice Handicap Index (moyenne  $\pm$  écart-type) durant le suivi de douze mois après injection de FVS.

(A) Score total ( $p < 0.05$  à M1 et M12). (B) Sous-échelles Physique, Fonctionnelle et Emotionnelle. n=8 à l'inclusion, M6 et M12 ; n=7 à M1. p calculé selon les changements à partir de l'inclusion.



**Figure 3 :** Variations du Voice Handicap Index durant le suivi de douze mois après injection de FVS, pour chaque patient.

La ligne noire représente le changement minimal requis dans le score VHI total pour être considéré comme cliniquement pertinent (18 points). n = 8 à l'inclusion, M6 et M12 ; n = 7 à M1 (données manquantes pour le patient 4)



*b) Effets sur la qualité de vie*

Les scores physique (Physical Component Score, PCS) et mental (Mental Component Score, MCS) du SF-36 n'étaient pas significativement améliorés (Tableau S1).

*c) Effets sur la vidéolaryngostroboscopie*

Une amélioration clinique de la fermeture glottique et de la vibration des cordes vocales en vidéolaryngostroboscopie était observée chez respectivement 5 (62,5%) et 4 (50%) des 8 patients. Des vidéos disponibles en données supplémentaires montrent les résultats obtenus pour la patiente 6 en comparant la vidéolaryngostroboscopie avant injection (Vidéo S2) et 12 mois après l'injection (Vidéo S3). Ces vidéos montrent une amélioration majeure de la fermeture glottique et de la vibration du tiers moyen des deux cordes vocales.

#### *d) Effet sur les évaluations perceptive, acoustique et aérodynamique*

Une tendance à l'amélioration de la raucité de la voix dans l'analyse perceptive a été observée ( $-0,5 \pm 0,8$ ,  $p = 0,102$ ). Des enregistrements audio disponibles en données supplémentaires montrent les résultats obtenus pour les patientes 6 et 8, en comparant leur voix avant injection (Audio S4-S7) et 12 mois après l'injection (Audio S8-S11). Après injection, leur voix était moins enrouée et plus stable, sans souffle pour les deux patientes et cette amélioration a également été constatée lors du chant chez la patiente 8 (Vidéos S12 et S13).

## **G. Discussion**

Cet essai clinique rapporte la première utilisation chez l'homme de la FVS autologue d'origine adipeuse dans le traitement des cordes vocales cicatricielles. Jusqu'à présent, seules des recherches précliniques (*in vitro* et modèles animaux) avaient suggéré la potentielle efficacité de l'injection de cellules souches dans des cordes vocales cicatricielles. Cette nouvelle thérapie cellulaire est particulièrement intéressante dans cette pathologie car les options thérapeutiques actuelles sont limitées et ne répondent pas pleinement au défi médical soulevé par le handicap vocal.

La faisabilité et la sécurité de l'injection de FVS autologue d'origine adipeuse dans des cordes vocales cicatricielles ont pu être démontrées, aucun événement indésirable grave lié au traitement n'étant survenu. Les effets indésirables rapportés ont été limités à ceux normalement associés à une lipoaspiration ou une laryngoscopie directe. Ceci est cohérent avec la bonne tolérance de l'injection locale de FVS décrite dans d'autres contextes cliniques, y compris ceux caractérisés par une fibrose, telle qu'une invalidité de la main chez les patients atteints de sclérose systémique. Dans ce contexte, la tolérance au traitement par la FVS a été démontrée jusqu'à deux ans après l'administration de cellules [30, 39, 40].

Nos résultats confirment également l'efficacité potentielle de l'injection de FVS dans la mesure où le VHI était significativement réduit dès le premier mois après l'injection, cet effet persistant à un an. Le VHI est un questionnaire utilisé dans le domaine de la laryngologie qui fournit des informations cliniques pertinentes pour l'évaluation du ressenti du patient vis-à-vis de sa dysphonie. C'est l'outil le plus utilisé dans l'auto-évaluation de la dysphonie. Sur la base de la différence minimale cliniquement pertinente (Minimal Clinically Important Difference, MCID) de 18 points [36], le taux de réponse au traitement par FVS était respectivement de 57% et 62,5% à un et six mois et de 87,5% à un an. Ces résultats sont particulièrement encourageants

compte tenu de la longue durée de la maladie qui caractérisait les patients inclus dans l'essai ( $5,8 \pm 4,3$  ans pour les cicatrices survenues après phonochirurgie et deux patients présentant une lésion congénitale avec une symptomatologie évoluant depuis plus de 20 ans). L'amélioration du VHI était associée à l'amélioration d'autres paramètres de la voix. Par exemple, la raucité de la voix, qui a été évaluée dans une analyse perceptive à l'aveugle (grade R), est une caractéristique clinique typique de la dysphonie due à des cordes vocales cicatricielles. Une tendance à l'amélioration du grade R a été observée à six mois et un an. En revanche, le caractère soufflé de la voix (grade B) n'a pas été amélioré. Cela peut être dû au fait que ce paramètre est plus adapté à la description des fuites d'air glottiques importantes qui caractérisent plutôt les paralysies laryngées unilatérales [41]. Enfin, une tendance à l'amélioration a été observée pour le rapport signal sur bruit, en faveur d'une voix plus claire et plus intelligible après injection, les bruits parasites liés aux défauts de vibration diminuant en faveur des harmoniques vocales. L'étendue vocale n'a pas été améliorée mais ce paramètre est plus adapté aux patients qui se plaignent d'une voix trop aiguë, comme c'était le cas de notre seul patient masculin. L'analyse aérodynamique n'a pas été améliorée, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que la diminution de taille de la fente glottique après injection est inframillimétrique. Bien que non statistiquement significative, l'interprétation vidéolaryngostroboscopique a montré une meilleure fermeture de la glotte et une amélioration de la vibration, avec parfois des cordes vocales cicatricielles rigides retrouvant une amplitude et une régularité de vibration presque normales. Ceci suggère que l'effet de l'injection de FVS ne se limite pas à un simple effet volumateur mais pourrait aussi impliquer une régénération de la lamina propria en remplaçant le tissu fibreux pré-existant et permettant ainsi une meilleure ondulation muqueuse. Les scores synthétiques physique et mental du SF-36 n'ont pas été améliorés en partie à cause du faible nombre de patients traités. Cependant, trois patients ont décrit des changements importants dans leur vie après récupération de leur voix (deux reprises de travail et un retour à une activité professionnelle de chanteur).

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été proposées au cours des dernières décennies pour traiter les cordes vocales cicatricielles. En dépit de tous ces efforts, aucune technique permettant une restauration complète de la microstructure des cordes vocales et de la vibration n'a été rapportée. Les techniques chirurgicales comprenant des manipulations de la lamina propria présentent toujours le risque d'une issue défavorable avec une potentielle aggravation de la situation par majoration de la cicatrice existante. Ainsi, un traitement conservateur doit être considéré comme le traitement de première intention. L'injection d'acide hyaluronique, de matrice acellulaire, d'hydroxyapatite de calcium ou de corticostéroïdes sont des candidats potentiels pour améliorer les patients présentant des cordes vocales cicatricielles.

[5,6,42], mais aucun d'entre eux n'a été adopté en pratique quotidienne. Dans leur étude, Welham et al. n'ont révélé aucune amélioration parmi les paramètres du bilan vocal, y compris le VHI [5]. La série de cas décrite par Young utilisant des corticostéroïdes a révélé une amélioration moyenne de 15 points du VHI mais avec un court suivi de seulement 3 mois après l'injection [42].

Bien que les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le bénéfice potentiel de la FVS sur les cordes cicatricielles soient en grande partie méconnus, les CSM hautement représentées au sein de la FVS sont considérées comme de probables importants contributeurs. Les CSM ont été isolées dans de nombreux organes chez l'adulte et sont capables de générer divers tissus mésodermiques, selon les conditions micro-environnementales dans lesquelles elles évoluent [43]. Alors que les premières recherches attribuaient principalement les effets des thérapies à base de cellules souches à leur capacité de greffe locale et de différenciation en plusieurs types tissulaires, des études récentes ont révélé que les cellules implantées ne survivent pas longtemps [16,44,45] et que les effets bénéfiques sont plus probablement dus aux facteurs bioactifs sécrétés par les CSM [46]. Il a été démontré que les fonctions paracrines des CSM jouent un rôle clé dans la régulation des réponses immunosuppressives et inflammatoires [47–49]. Le sécrétome des CSM comprend également un large éventail de facteurs de croissance et de facteurs anti-apoptotiques ayant un impact favorable sur la régénération des tissus endommagés. Les CSM exercent également des effets anti-fibrotiques qui peuvent être bénéfiques pour réduire la formation de cicatrices. Les mécanismes exacts de cet effet antifibrotique restent à élucider mais le concept actuel est que les CSM contribuent à l'inhibition de la voie du Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), à la stimulation de l'expression de l'Hépatocyte Growth Factor (HGF), à la réduction du stress oxydatif et à la régénération de la matrice extracellulaire [50]. Dans les modèles animaux précliniques de cordes vocales cicatricielles, les CSM amélioraient le processus de guérison en réduisant le granulome post-opératoire, l'inflammation et la fibrose [14]. Les cordes vocales étaient moins atrophiques et retrouvaient leur viscoélasticité et leur amplitude vibratoire. En ce qui concerne les propriétés de la matrice extracellulaire, les auteurs signalaient une réduction du collagène et de la fibronectine et une augmentation de l'acide hyaluronique et de l'élastine. L'expression de TGF- $\beta$ 1 était réduite ainsi que l'infiltration cellulaire inflammatoire [51].

Cependant, la FVS et les ADSC sont des produits différents : la FVS est un produit sans étape de culture et subissant peu de transformation, qui contient une population hétérogène de cellules alors que les ADSC correspondent à une population de cellules stromales mésenchymateuses purifiées à partir de tissu adipeux et multipliées en culture. Hirose et al. ont récemment démontré que la FVS sécrétait des niveaux de cytokines et de protéines solubles

plus élevés que les ADSC, indiquant qu'il pourrait s'agir d'une source de thérapie cellulaire aux propriétés multifonctionnelles [52]. Les cellules hématopoïétiques présentes dans la FVS, y compris les macrophages du phénotype anti-inflammatoire M2 et les cellules T régulatrices qui expriment des taux élevés de cytokines immunosuppressives, apparaissent également comme des contributeurs importants à l'effet immunomodulateur de la FVS. En effet, de nombreux éléments de la réponse immunitaire innée et adaptative participent à la différenciation et à l'activation des fibroblastes et les réactions inflammatoires aiguës jouent un rôle important dans le déclenchement de la fibrose [53]. À notre connaissance, il n'existe aucune donnée actuellement disponible concernant l'utilisation de la FVS dans un modèle préclinique de cordes vocales cicatricielles. Cependant, dans un modèle de souris humanisée [54], la FVS était capable de réduire significativement les paramètres cliniques et histologiques des cicatrices cutanées hypertrophiques avec un amincissement de l'épiderme et du derme par rapport au contrôle 8 semaines après son injection, suggérant un puissant effet antifibrotique.

De manière générale, les propriétés régénératrices et antifibrotiques spécifiques de la FVS sont probablement impliquées dans l'utilisation croissante de cette nouvelle thérapie cellulaire. Dans notre étude, l'hypothèse d'une régénération spontanée peut être écartée en raison de la durée des lésions chez tous les patients. De plus, la possibilité que l'effet bénéfique observé soit indépendant des cellules injectées et uniquement basé sur l'effet volumateur de l'injection est peu probable car, dans ce cas, l'amélioration aurait rapidement diminué avec le temps et aucun bénéfice n'aurait été observé quant à la vibration muqueuse.

Les principales limites de cette étude étaient le faible nombre de patients inclus et l'absence de groupe témoin. Il existait également un rapport hommes-femmes déséquilibré et différentes étiologies étaient impliquées dans la genèse des cicatrices, ce qui peut avoir eu un impact sur les résultats. Par exemple, le seul patient non répondant avait déjà été traité avec une injection de Vox Implant à visée de médialisation. En l'absence de groupe témoin, l'effet positif observé sur les paramètres subjectifs tels que le VHI pourrait résulter des attentes propres du patient en matière de thérapie cellulaire, conduisant à un effet placebo. Il est également possible que la rééducation orthophonique réalisée en post-opératoire ait contribué à l'amélioration de la voix, bien que cela soit peu probable car tous les sujets avaient déjà effectué une rééducation complète sans efficacité avant l'inclusion dans l'essai.

En conclusion, cette étude de phase I monocentrique a non seulement montré que ce traitement innovant était bien toléré chez les patients présentant des cordes vocales cicatricielles, mais fournissait également des données préliminaires encourageantes concernant son efficacité potentielle. D'autres études de sécurité et faisabilité portant sur l'utilisation de la FVS dans les cordes vocales cicatricielles après cordectomie pour néoplasie laryngée pourraient

également être envisagées. Des études à plus long terme, sur une population plus large, multicentriques, randomisées, en double aveugle et sur des patients plus homogènes seront nécessaires pour confirmer que la FVS autologue d'origine adipeuse peut améliorer le pronostic à long terme de cette pathologie. En outre, de futures études pourraient permettre de préciser la contribution de chaque sous-population cellulaire au sein de la FVS et donc les mécanismes qui sous-tendent ses effets cliniques bénéfiques.

## **H. Remerciements**

Les auteurs remercient la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Investigation de l'APHM (Marseille) pour son aide dans la mise en place et la gestion de cet essai clinique.

## **I. Références**

1. Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, Remacle M, Hess M, Giovanni A et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the phonosurgery committee of the European laryngological society. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270(9):2491-507.
2. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigation. Otologia (Fukuoka). 1975; 21:239–440.
3. Graupp M, Bachna-Rotter S, Gerstenberger C, Friedrich G, Fröhlich-Sorger E, Kiesler K, et al. The unsolved chapter of vocal fold scars and how tissue engineering could help us solve the problem. Eur Arch Otorhinolaryngol. sept 2016;273(9):2279-84.
4. Sataloff RT, Spiegel JR, Heuer RJ, Baroody MM, Emerich KA, Hawkshaw MJ et al. Laryngeal minimicroflap: a new technique and reassessment of the microflap saga. J Voice. 1995 Jun;9(2):198-204.
5. Welham NV, Choi SH, Dailey SH, Ford CN, Jiang JJ, Bless DM. Prospective multi-arm evaluation of surgical treatments for vocal fold scar and pathologic sulcus vocalis. Laryngoscope. 2011;121(6):1252-60.

6. Molteni G, Bergamini G, Ricci-Maccarini A, Marchese C, Ghidini A, Alicandri-Ciufelli M et al. Auto-crosslinked hyaluronan gel injections in phonosurgery. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142(4):547-53.
7. Hertegard S, Hallen L, Laurent C, Lindström E, Olofsson K, Testad P et al. Cross-linked hyaluronan versus collagen for injection treatment of glottal insufficiency: 2-year follow-up. *Acta Otolaryngol* 2004;124:1208–1214.
8. Liu Y, Zheng Shu X, Prestwich GD. Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. *Biomaterials.* 2005;26(23):4737-46.
9. Zhang Y, Rossi F, Papa S, Violatto MB, Bigini P, Sorbona M, et al. Non-invasive in vitro and in vivo monitoring of degradation of fluorescently labeled hyaluronan hydrogels for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2016;30:188-98.
10. Magalon J, Velier M, Simoncini S, François P, Bertrand B, Daumas, A et al. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2019 Jan 5. pii: annrheumdis-2018-214218. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214218. [Epub ahead of print].
11. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM et al. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Apr;6(4):1096-1108.
12. Kumai Y, Kobler JB, Park H, Lopez-Guerra G, Karajanagi S, Herrera VL et al. Crosstalk between adipose-derived stem/stromal cells and vocal fold fibroblasts in vitro. *Laryngoscope* 2009;119:799–805.
13. Kumai Y, Kobler JB, Park H, Galindo M, Herrera VL, Zeitels SM. Modulation of vocal fold scar fibroblasts by adipose-derived stem/stromal cells. *Laryngoscope* 2010;120:330–7.
14. Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Philandrianos C, Veran J, Giovanni A. Cell therapy and scarred vocal folds. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017 Jul 6. 1879-296(17)30103-5.
15. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, et al. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope* 2014;124:E461–9.

16. Hiwatashi N, Hirano S, Suzuki R, Kawai Y, Mizuta M, Kishimoto Y et al. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. *Laryngoscope*. 2016;126:1143–50.
17. Xu W, Hu R, Fan E, Han D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in collagen-hyaluronic acid gel composite scaffolds for vocal fold regeneration. *Ann OtolRhinol Laryngol* 2011;120(2):123–30.
18. Kim YM, Oh SH, Choi JS, Lee S, Ra JC, Lee JH et al. Adipose-derived stem cell-containing hyaluronicacid/alginate hydrogel improves vocal fold wound healing. *Laryngoscope*. 2014;124(3):E64–72.
19. Kwon SK, Lee BJ. The combined effect of autologous mesenchymal stem cells and hepatocyte growth factor on vocal fold regeneration and fibrosis in vocal fold wound. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;5(4–6):735–42.
20. Shiba TL, Hardy J, Luegmair G, Zhang ZY, Long JL. Tissue-engineeredvocal fold mucosa implantation in rabbits. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2016;154(4):679–88.
21. Angelou V, Kalodimou V, Messini I, Psychalakis N, Eleftheria K, Papalois A. Adipose-derived mesenchymal stem cells in the regeneration of vocal folds:a study on a chronic vocal fold scar. *Stem Cells Int* 2016;2016:9010279.
22. De Bonnecaze G, Chaput B, Woisard V, Uro-Coste E, Swider P, Vergez S et al. Adipose stromal cells improve healing of vocal fold scar: morphological and functional evidences. *Laryngoscope*. 2016;126(8):E278–85.
23. Hong SJ, Lee SH, Jin SM, Kwon SY, Jung KY, Kim MK et al. Vocal fold wound healing after injection of human adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(11):1198–204.
24. Hu R, Ling W, Xu W, Han D. Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. *PLoS One*. 2014;9(3):e92676.
25. Lee BJ, Wang SG, Lee JC, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ et al. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3–4):198–204.
26. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns*. 2014;40(7):1375-83.

27. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL et al. Phase I triaG : the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245-57.
28. LeBlanc AJ, Touroo JS, Hoying JB, Williams SK. Adipose stromal vascular fraction cell construct sustains coronary microvascular function after acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(4):H973-H82.
29. Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol*. 2016;3(1):e45-52.
30. Granel B, Daumas A, Jouve E, Harlé JR, Nguyen PS, Chabannon C et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015;74(12):2175-82.
31. Karbiener M, Darnhofer B, Frisch MT, Rinner B, Birner-Gruenberger R, Gugatschka M. Comparative proteomics of paired vocal fold and oral mucosa fibroblasts. *J Proteomics*. 2017 Feb 23;155:11-21.
32. Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Grimaud F, Revis J, Velier M, et al. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jul 27;9(1):202.
33. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641–8.
34. Dejonckere PH, Bradley P, Clemente P, Cornut G, Crevier-Buchman L, Friedrich G, et al. A basic protocol for functional assessment of voice pathology, especially for investigating the efficacy of (phonosurgical) treatments and evaluating new assessment techniques. Guideline elaborated by the Committee on Phoniatrics of the European Laryngological Society (ELS). *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2001 Feb;258(2):77–82.
35. Hirano M. Psycho-acoustic evaluation of voice: GRBAS Scale for evaluating the hoarse voice. In: Hirano M, editor. Clinical examination of voice. Wien: Springer Verlag; 1981:81–84.

36. Jacobson B, Johnson A, Grywalski C, Silbergbeit A, Jacobson G, Benninger M, et al. The Voice Handicap Index (VHI): development and validation. *Am J Speech Lang Pathol.* 1997;6:66–70.
37. Ware JE, Kosinski M, Gandek B. SF-36 ® Health Survey: Manual & Interpretation Guide. Lincoln, RI: QualityMetric Incorporated;1993; 2000.
38. Ware JE, Kosinski M, Keller SD. SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual. Boston, MA: The Health Institute; 1994.
39. Daumas A, Magalon J, Jouve E, Truillet R, Casanova D, Giraudo L, et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Current Research in Translational Medicine.* 2017;65(1):40-3.
40. Guillaume-Jugnot P, Daumas A, Magalon J, Jouve E, Nguyen P-S, Truillet R, et al. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction in patients with systemic sclerosis: 12-month follow-up. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(2):301-6.
41. Mattei A, Desuter G, Roux M, Lee B-J, Louges M-A, Osipenko E, et al. International consensus (ICON) on basic voice assessment for unilateral vocal fold paralysis. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2018;135(1S):S11-5.
42. Young W, Hoffman MR, Koszewski IJ, Whited CW, Ruel BN, Dailey SH. Voice Outcomes following a Single Office-Based Steroid Injection for Vocal Fold Scar. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016 Nov;155(5):820-828.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
44. Svensson B, Nagubothu SR, Nord C, Cedervall J, Hultman I, Ährlund-Richter L et al. Stem cell therapy in injured vocal folds:a three-month xenograft analysis of human embryonic stem cells. *Biomed ResInt.* 2015;2015:754876.
45. Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FH, Vidovska D et al. Viscoelastic and histologic propertiesin scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope* 2006;116:1248–54.
46. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and regenerative Potential. *Stem Cells Int.* 2017;2017:5173732.

47. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25;18(9).
48. Ma OK, Chan KH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World J Stem Cells.* 2016 Sep 26;8(9):268-78.
49. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jul;74(13):2345-2360.
50. Song Y, Peng C, Lv S, Cheng J, Liu S, Wen Q, Guan G, Liu G. Adipose-derived stem cells ameliorate renal interstitial fibrosis through inhibition of EMT and inflammatory response via TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2017 Mar;44:115-122.
51. Hiwatashi N, Bing R, Kraja I, Branski RC. Mesenchymal stem cells have antifibrotic effects on transforming growth factor- $\beta$ 1-stimulated vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope* 2017;127:E35–41.
52. Hirose Y, Funahashi Y, Matsukawa Y, Majima T, Yamaguchi M, Kawabata S et al. Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals. *Cytotherapy.* 2018 Apr;20(4):589-591.
53. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 6 juill 2012;18(7):1028-40.
54. Domergue S, Bony C, Maumus M, Toupet K, Frouin E, Rigau V et al. Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS One.* 2016 May 26;11(5):e0156161.

## J. Données supplémentaires

**S1 Tableau :** Effets de l'injection de FVS autologue d'origine adipeuse sur l'auto-évaluation, la videolaryngostroboscopie et les analyses perceptive, acoustique et aérodynamique.

**S2 Vidéo :** Videolaryngostroboscopie avant injection de FVS chez la patiente 6 - aspect cicatriciel des cordes vocales avec absence de vibration de leur tiers moyen et insuffisance glottique (MP4).

**S3 Vidéo** : Videolaryngostroboscopie un an après injection de FVS chez la patiente 6 - la vibration du tiers moyen des cordes vocales est améliorée (onde muqueuse clairement visible) (MP4).

**S4 Audio** : Enregistrement vocal pendant la lecture avant injection de FVS chez la patiente 6 - voix soufflée et légèrement éraillée (WAV).

**S5 Audio** : Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue avant injection de FVS chez la patiente 6 - voix soufflée avec un temps maximum de phonation court (WAV).

**S6 Audio** : Enregistrement vocal pendant la lecture avant injection de FVS chez la patiente 8 - voix éraillée et légèrement soufflée (WAV).

**S7 Audio** : Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue avant injection de FVS chez la patiente 8 - voix éraillée, instable et légèrement soufflée (WAV).

**S8 Audio** : Enregistrement vocal pendant la lecture un an après injection de FVS chez la patiente 6 - la voix est plus claire, sans souffle ni éraillement (WAV).

**S9 Audio** : Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue un an après injection de FVS chez la patiente 6 - la voix est plus claire, sans souffle ni éraillement et le temps maximum de phonation est plus long (WAV).

**S10 Audio** : Enregistrement vocal pendant la lecture un an après injection de FVS chez la patiente 8 - la voix est plus claire, moins éraillée (WAV).

**S11 Audio** : Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue un an après injection de FVS chez la patiente 8 - la voix est plus claire, moins éraillée (WAV).

**S12 Vidéo** : Patiente 8 en voix chantée avant l'injection de FVS - voix éraillée, instable et légèrement soufflée (MP4).

**S13 Vidéo** : Patiente 8 en voix chantée un an après l'injection de FVS - la voix est plus claire, plus stable et moins éraillée (MP4).

**Tableau S1.** Effets de l'injection de Fraction Vasculaire Stromale autologue d'origine adipeuse sur l'auto-évaluation, la videolaryngostroboscopie et les analyses perceptive, acoustique et aérodynamique.

		Inclusion	30 jours	Différence (30 jours-inclusion)	p	6 mois	Différence (6 mois-inclusion)	p	12 mois	Différence (12 mois-inclusion)	p
<b>Auto-évaluation</b>											
VHI	Moyenne ± ET	79,5 ± 14,3	56,0 ± 26,0	-24,4 ± 20,5	<b>0,018</b>	48,1 ± 29,9	-31,4 ± 29	0,069	39,4 ± 28,2	-40,1 ± 21,5	<b>0,012</b>
(0-120)	Médiane (étendue)	74,0 (61 ; 107)	64,0 (5 ; 84)	-22,0 (-56 ; -1)		45,5 (12 ; 92)	-44,5 (-62 ; 7)		37,0 (2 ; 80)	-40,5 (-66 ; -9)	
VHI Fonctionnel	Moyenne ± ET	22,3 ± 5,8	16,9 ± 8,8	-6,9 ± 7,1	0,062	12,4 ± 8,6	-9,9 ± 10,4	<b>0,042</b>	10,1 ± 9,2	-12,1 ± 7,8	<b>0,012</b>
(0-40)	Médiane (étendue)	24,0 (12 ; 30)	21,0 (0 ; 26)	-5,0 (-16 ; 1)		12,5 (2 ; 25)	-11,0 (-22 ; 6)		6,5 (0 ; 26)	-11,0 (-22 ; -4)	
VHI Physique	Moyenne ± ET	30,3 ± 4,0	20,0 ± 7,1	-10,1 ± 8,7	<b>0,028</b>	20,1 ± 11,1	-10,1 ± 11,3	0,063	16,1 ± 9,2	-14,1 ± 8,3	<b>0,012</b>
(0-40)	Médiane (étendue)	30,0 (27 ; 39)	21,0 (5 ; 27)	-9,0 (-25 ; 0)		19,0 (4 ; 33)	-14,5 (-26 ; 6)		16,0 (2 ; 28)	-13,0 (-28 ; -3)	
VHI Emotionnel	Moyenne ± ET	27,0 ± 10,0	19,1 ± 11,7	-7,4 ± 5,8	<b>0,018</b>	15,6 ± 12,6	-11,4 ± 10,1	<b>0,035</b>	13,1 ± 10,7	-13,9 ± 8,6	<b>0,017</b>
(0-40)	Médiane (étendue)	27,0 (15 ; 38)	22,0 (0 ; 35)	-8,0 (-15 ; -1)		16,5 (1 ; 40)	-11,5 (-23 ; 3)		14,0 (0 ; 27)	-12,0 (-27 ; 1)	
SF-36 - PCS	Moyenne ± ET	51,6 ± 7,3	/	/		52,6 ± 2,7	0,9 ± 8,0	0,866	53,5 ± 4,2	1,1 ± 8,9	0,735
(0-100)	Médiane (étendue)	52,4 (38,5 ; 60,8)				52,8 (48,8 ; 57,4)	-0,1 (-7,2 ; 14,3)		55,6 (46,7 ; 57,8)	1,8 (-10,6 ; 12,4)	
SF-36 - MCS	Moyenne ± ET	44,5 ± 13,4	/	/		40,0 ± 12,1	-3,7 ± 10,5	0,398	46,3 ± 11,3	0,5 ± 12,4	0,499
(0-100)	Médiane (étendue)	50,4 (25,6 ; 59,5)				39,3 (26,4 ; 62,1)	-6,9 (-20,2 ; 10,6)		45,9 (35,0 ; 62,1)	6,5 (-24,5 ; 10,1)	
<b>Vidéolaryngostroboscopie§</b>											
Fermeture glottique	Moyenne ± ET	1,6 ± 0,9	/	/		/	/		1,0 ± 0,9	-0,6 ± 1,6	0,301
(0-3)	Médiane (étendue)	2,0 (0,0 ; 3,0)							1,0 (0,0 ; 2,0)	-1 (-3,0 ; 2,0)	
Régularité	Moyenne ± ET	1,2 ± 0,7	/	/		/	/		0,9 ± 0,8	-0,3 ± 1,4	0,399
(0-3)	Médiane (étendue)	1,3 (0,5 ; 2,0)							1,0 (0,0 ; 2,0)	0,0 (-2,0 ; 1,5)	
Vibration	Moyenne ± ET	1,3 ± 0,5	/	/		/	/		0,9 ± 0,8	-0,4 ± 1,2	0,394
(0-3)	Médiane (étendue)	1,3 (0,5 ; 2,0)							0,8 (0,0 ; 2,0)	-0,3 (-2,0 ; 1,5)	
<b>Analyse perceptive</b>											
Grade G (global)	Moyenne ± ET	2,1 ± 0,4	/	/		2,0 ± 0,5	-0,1 ± 0,4	0,317	1,8 ± 1	-0,4 ± 0,9	0,257
(0-3)	Médiane (étendue)	2,0 (2,0 ; 3,0)				2,0 (1,0 ; 3,0)	0,0 (-1,0 ; 0,0)		2 (0,0 ; 3,0)	0,0 (-2,0 ; 1,0)	
Grade R (raucité)	Moyenne ± ET	1,9 ± 0,6	/	/		1,5 ± 0,9	-0,4 ± 0,7	0,180	1,4 ± 1,1	-0,5 ± 0,8	0,102

(0-3)	Médiane (étendue)	2.0 (1.0 ; 3.0)			1,5 (0.0 ; 3.0)	0.0 (-2.0 ; 0.0)		1,5 (0.0 ; 3.0)	0.0 (-2.0 ; 0.0)
Grade B (souffle)	Moyenne ± ET	1,5 ± 1,1	/	/	1,6 ± 0,9	0,1 ± 0,4	0,317	1,5 ± 1,2	0,0 ± 0,5
(0-3)	Médiane (étendue)	2.0 (0.0 ; 3.0)			2.0 (0.0 ; 3.0)	0 (0.0 ; 1.0)		1,5 (0.0 ; 3.0)	0.0 (-1.0 ; 1.0)
<b>Analyse acoustique</b>									
RSB (dB)	Moyenne ± ET	15.2 ± 4.1	9.8 ± 3.9	-0.7 ± 5.7	0.674	19,1 ± 2,6	3,9 ± 4,8	0.069	17.8 ± 1.5
	Médiane (étendue)	15.9 (9.5 ; 21.3)	13.4 (9.8 ; 19.7)	-0.3 (-11.5 ; 8.4)		19.0 (15.8 ; 23.0)	3,3 (-2,3 ; 11,2)		17.9 (16.2 ; 21.1)
Etendue vocale (Hz)	Moyenne ± ET	380 ± 111	458 ± 101	109 ± 181	0.225	420 ± 91	99 ± 157	0.285	379 ± 84
	Médiane (étendue)	421 (209 ; 474)	456 (295 ; 593)	86 (-77 ; 384)		414 (316 ; 538)	107 (-61 ; 252)		375 (235 ; 518)
<b>Analyse aérodynamique</b>									
TMP (s)	Moyenne ± ET	10.7 ± 6.2	10.3 ± 6.0	-0.4 ± 4.9	0.944	8.6 ± 5.5	-2.0 ± 3.6	0.161	10.6 ± 4.7
	Médiane (étendue)	9.6 (3.1 ; 22.0)	10.4 (2.4 ; 21.0)	1.0 (-8.1 ; 5.0)		7.6 (3.6 ; 19.4)	-1.9 (-8.0 ; 3.4)		9.1 (3.8 ; 19.0)
DAB (cm <sup>3</sup> /s)	Moyenne ± ET	302 ± 112	298 ± 113	-5 ± 153	0.674	344 ± 246	42 ± 169	0.575	282 ± 103
	Médiane (étendue)	296 (149 ; 519)	270 (160 ; 497)	25 (-334 ; 178)		275 (108 ; 919)	44 (-164 ; 400)		326 (138 ; 418)
PSG (hPa)	Moyenne ± ET	8.0 ± 3.1	7.7 ± 2.2	-0.2 ± 2.0	0.866	8.1 ± 4.0	0.3 ± 4.3	0.866	9.6 ± 4.6
	Médiane (étendue)	7.7 (5.0 ; 13.0)	7.2 (5.1 ; 11.5)	0.1 (-2.9 ; 2.7)		7.5 (3.5 ; 16.5)	0.7 (-6.6 ; 5.3)		8.3 (5.0 ; 17.0)
									2.7 (-2.7 ; 5.8)

PCS : Physical Component Summary score (score synthétique physique) ; MCS : Mental Component Summary score (score synthétique mental).

Pour les paramètres de vidéolaryngostroboscopie et l'échelle GRB, 0 (minimum) signifie normal et 3 (maximum) perturbation sévère.

RSB : Rapport Signal sur Bruit ; TMP : Temps Maximum de Phonation ; DAB : Débit d'Air Buccal ; PSG : Pression Sous-Glottique estimée au seuil phonatoire ; dB : decibels ; s : seconds ; Hz : Hertz ; hPa : hectopascals.

Données manquantes : VHI à 30 jours (n=7), SF-36 à 6 et 12 mois (n=7), étendue vocale à l'inclusion (n=6), 30 jours (n=7, n pour calcul de la différence =5), 6 mois (n=4, n pour calcul de la différence =3) et 12 mois (n pour calcul de la différence =6), et PSG (n=7).

Un p ≤ 0.05 était considéré comme significatif. Les valeurs de p sont calculées sur la différence en comparaison à l'inclusion.

§ Calculé avec la moyenne des cordes vocales droite et gauche pour chaque patient

### **III. Cas clinique détaillé d'une patiente incluse dans l'essai CELLCORDES - Fraction vasculaire stromale d'origine adipeuse et cordes vocales cicatricielles : premier cas clinique (Article 3)**

Cet article a été publié dans la revue Stem Cell Research and Therapy.

Sa référence bibliographique est la suivante : Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Grimaud F, Revis J, Velier M et al. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report. Stem Cell Res Ther. 2018 Jul 27;9(1):202. doi: 10.1186/s13287-018-0842-0.

#### **A. Auteurs et affiliations**

Alexia Mattei<sup>1,2,\*</sup>, Jérémie Magalon<sup>3,4</sup>, Baptiste Bertrand<sup>5</sup>, Fanny Grimaud<sup>4</sup>, Joana Revis<sup>2,6</sup>, Mélanie Velier<sup>1,4</sup>, Julie Veran<sup>4</sup>, Patrick Dessi<sup>2,7</sup>, Florence Sabatier<sup>3,4</sup>, Antoine Giovanni<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Aix Marseille Univ, 13000 Marseille, France

<sup>2</sup> Service d’Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, CHU La Conception, 13385 Cedex, Marseille, France

<sup>3</sup> Aix Marseille Univ, VRCM INSERM UMR 1076, Faculté de Pharmacie de Marseille, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, INSERM CBT-1409, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, CHU La Conception, 13385 Cedex Marseille, France

<sup>5</sup> Service de Chirurgie Plastique et Reconstrucrice, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, CHU La Conception, 13385 Cedex, Marseille, France

<sup>6</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, Laboratoire Parole et Langage, 5 Avenue Pasteur, 13100 Aix-en-Provence, France

<sup>7</sup> Aix-Marseille Univ, Anthropologie ADES UMR 7268 AMU EFS CNRS, 13385 Cedex, Marseille, France

## **B. Résumé**

Les patients présentant des cordes vocales cicatricielles (de manière congénitale ou après phonochirurgie) sont actuellement difficiles à traiter et présentent une dysphonie souvent invalidante au quotidien. Plusieurs thérapies sont disponibles sur le marché, mais leurs résultats sont souvent décevants. La Fraction Vasculaire Stromale (FVS) autologue d'origine adipeuse est reconnue comme une source facilement accessible de cellules aux propriétés angiogéniques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et régénératrices. Nous présentons ici le cas d'une femme âgée de 43 ans qui souffrait d'une dysphonie sévère en lien avec des cordes vocales cicatricielles après phonochirurgie, résistante aux traitements médicaux et chirurgicaux conventionnels. Elle a reçu une administration locale de FVS autologue. Le protocole comprenait, le même jour, une extraction du tissu adipeux, la préparation de la FVS puis l'injection locale de FVS (0,45 ml dans chaque corde vocale, pour un total de 12,2 millions de cellules viables de FVS). Aucun effet indésirable grave n'a été décrit. Un an après l'injection, l'aspect laryngoscopique et la majorité des paramètres vocaux s'étaient améliorés, en particulier le Voice Handicap Index qui avait diminué de 75 à 9. L'analyse perceptive retrouvait une voix moins éraillée et plus stable, non soufflée. Le cas de cette patiente souligne le potentiel thérapeutique de la FVS pour de telles applications (enregistrement de l'essai sur ClinicalTrials.gov NCT02622464 le 4 décembre 2015).

## **C. Mots clés**

Fraction vasculaire stromale, tissu adipeux, thérapie cellulaire, corde vocal, fibrose, cicatrice, dysphonie.

## **D. Liste des abréviations**

ADSC : Adipose-Derived Stem Cells

CNV : Cellules Nucléées Viables

CV: Corde(s) Vocale(s)

DAB : Débit d'Air Buccal

FVS : Fraction Vasculaire Stromale

GMP: Good Manufacturing Practices

PSG : Pression Sous-Glottique estimée

TMP : Temps Maximum de Phonation

VHI : Voice Handicap Index

## E. Introduction

La microstructure des cordes vocales (CV) [1, 2] est complexe, en particulier du fait de son organisation feuillettée. La proportion et l'organisation des différents composants de la matrice extracellulaire déterminent les propriétés mécaniques des CV. Après une microchirurgie laryngée, une cicatrice des CV est parfois observée en raison de la disparition partielle de la lamina propria, avec sa couche superficielle et / ou intermédiaire remplacée(s) par du tissu fibreux, empêchant le découplage mécanique de l'épithélium et du muscle et induisant ainsi un trouble de la vibration [1]. Des cordes vocales cicatricielles peuvent également être retrouvées de manière congénitale, sans étiologie iatrogène (sulcus vocalis par exemple).

Les CV cicatricielles peuvent entraîner, en fonction de la gravité et de l'étendue de la cicatrice, une variété de symptômes tels qu'un enrouement, une voix soufflée, un effort vocal accru pour parler, une fatigue vocale. L'incapacité de produire une phonation normale cause à la fois un handicap physique et psychologique, en particulier pour les professionnels de la communication. Plusieurs thérapies sont actuellement disponibles mais celles-ci sont souvent décevantes car la grande complexité de la microstructure des CV empêche le développement de traitements efficaces. Ainsi, l'identification de stratégies thérapeutiques innovantes capables d'améliorer les propriétés mécaniques vibratoires des CV cicatricielles reste un défi clinique important.

La fraction vasculaire stromale (FVS) autologue d'origine adipeuse est reconnue comme une source facilement accessible de cellules présentant des propriétés angiogéniques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et régénératives [3]. De récentes études cliniques et précliniques soutiennent également le potentiel antifibrotique de la FVS, principalement attribué à la sous-population des cellules souches / stromales mésenchymateuses. Bien que les thérapies basées sur l'utilisation de FVS soient pour le moment totalement inexplorées dans le domaine de la laryngologie, l'injection locale de FVS pourrait être bénéfique dans le traitement

des CV cicatricielles. Nous avons obtenu l'approbation de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et d'un comité d'éthique français (CPP Sud Méditerranée V) pour utiliser de la FVS chez huit patients présentant des CV cicatricielles réfractaires aux traitements médicaux et chirurgicaux conventionnels (NCT02622464). Nous présentons ici le cas de la première patiente ayant achevé son suivi de 12 mois.

## F. Matériels et méthodes

### 1) Patiente

Une femme de 43 ans a été incluse dans l'essai clinique prospectif de phase I CELLCORDES après avoir donné son consentement éclairé écrit (numéro EudraCT 2015-000238-31, enregistrement sur clinicaltrials.gov NCT02622464).

Ses antécédents médicaux incluaient une thyroïdectomie pour goitre et une hysterectomie pour endométriose. Elle présentait une dysphonie sévère liée à des CV cicatricielles dans les suites d'une phonochirurgie. Cinq ans auparavant, elle avait subi deux chirurgies du larynx : i) une laryngoscopie en suspension pour résection d'un œdème de Reinke, dans laquelle une lésion ventriculaire droite avait été découverte et biopsiée ; ii) une cervicotomie avec thyrotomie latérale pour la résection de cette lésion dont l'histologie définitive était en faveur d'un chondrome. Un an plus tard, la patiente a subi une autre laryngoscopie en suspension pour une exérèse de granulome au tiers antérieur de la CV gauche. Les pathologies laryngées traitées n'ont pas récidivé mais la persistance d'une dysphonie marquée quatre ans après la dernière intervention chirurgicale (malgré une rééducation orthophonique régulière) a justifié une nouvelle consultation. La patiente répondait aux critères d'inclusion et d'exclusion de l'essai clinique (listés dans le Tableau 1) et était donc éligible pour recevoir une injection locale de FVS autologue.

En vidéolaryngostroboscopie, un aspect cicatriciel des CV était observé avec en particulier une absence de vibration de leur tiers moyen. Le bilan vocal a permis d'objectiver cette dysphonie (Tableau 2), l'orthophoniste signalant une voix éraillée, instable et légèrement soufflée, avec une incapacité à atteindre des notes aigues. Des enregistrements vidéo et audio disponibles en données supplémentaires montrent cela plus en détail [voir données supplémentaires 1, 2 et 3].

**Tableau 1:** Critères d'inclusion et non inclusion pour l'essai clinique CELLCORDES.

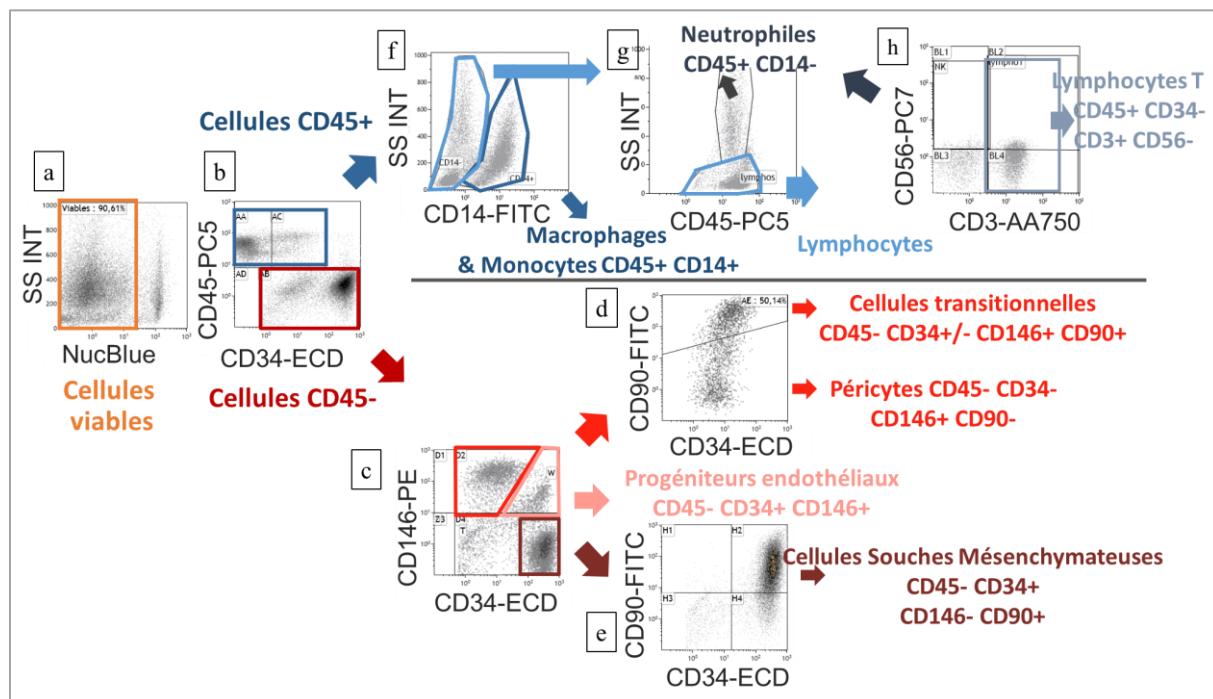
<b>Critères d'inclusion</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Affiliation à la sécurité sociale</li> <li>- Signature du formulaire de consentement éclairé</li> <li>- Difficultés vocales ressenties comme handicapantes (<math>VHI &gt; 60/120</math>)</li> <li>- Présence de lésions cicatricielles des cordes vocales causées soit par la chirurgie initiale soit par une pathologie congénitale de type sulcus</li> <li>- Aspect cicatriciel du tiers moyen des cordes vocales en stroboscopie</li> <li>- Délai d'au moins 1 an par rapport à la chirurgie initiale le cas échéant</li> <li>- Patients âgés de 18 à 65 ans</li> <li>- Bon état général, selon l'anamnèse et l'examen clinique</li> <li>- Test de grossesse négatif et méthode de contraception fiable pour les femmes en âge de procréer</li> </ul>	
<b>Critères de non-inclusion</b>	
Spécifiques	Non spécifiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refus de la rééducation orthophonique</li> <li>- Patients opérés d'une lésion maligne ou à potentiel malin (dysplasie sévère) de la corde vocale cicatricielle</li> <li>- Contre-indication à l'anesthésie</li> <li>- Patients sous anti-coagulants</li> <li>- Patients présentant des troubles de la coagulation (<math>TP &lt; 65\%</math>, <math>TCK &gt; 1,2</math>)</li> <li>- Pathologies infectieuses actives</li> <li>- Sérologies positives parmi VIH, VHC, VHB, HTLV I et II, syphilis</li> <li>- Patients nécessitant une antibioprophylaxie per opératoire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prise d'un médicament expérimental dans les 3 mois</li> <li>- Refus ou incapacité de respecter les procédures de l'étude</li> <li>- Femmes enceintes ou allaitantes</li> <li>- Personnes majeures protégées par la loi (sous tutelle ou curatelle)</li> <li>- Personnes séjournant dans un établissement sanitaire ou social</li> <li>- Mineurs</li> <li>- Personnes non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale</li> <li>- Personnes privées de liberté ou détenues</li> <li>- Personnes en situation d'urgence</li> </ul>

## 2) Protocole chirurgical

Le protocole nécessitait deux interventions chirurgicales consécutives le même jour. La première intervention consistait en une lipoaspiration abdominale pour la fabrication de la FVS, sous anesthésie locale avec sédation. Le prélèvement de tissu adipeux a été réalisé avec une seringue de 10 ml en circuit fermé à l'aide d'une canule Khouri de 3 mm et d'un sac de prélèvement de 500 ml. 340 ml de tissu adipeux ont été recueillis, transportés vers notre unité de thérapie cellulaire agréée et transférés dans le système Celution 800/CRS (Cytori therapeutics Inc, San Diego, Californie, États-Unis). Le tissu adipeux prélevé a été lavé et digéré de manière enzymatique en utilisant des réactifs de qualité GMP (Good Manufacturing Practices). Les cellules ont été concentrées, lavées, récupérées de manière aseptique et remises en suspension dans 5 ml de solution de Ringer Lactate. Un millilitre a été prélevé pour injection

et les cellules restantes ont été utilisées pour des tests de stérilité et caractérisation biologique, puis congelées dans une biobanque à des fins de recherche. Le compte du total des cellules nucléées viables et la viabilité cellulaire ont été déterminées en utilisant l'appareil Nucleocounter NC100 (ChemoMetec, Danemark). Les sous-populations cellulaires au sein de la FVS ont été identifiées par une analyse en cytométrie de flux (appareil Beckman Navios) à l'aide d'un panel de marqueurs de surface cellulaire, en accord avec les recommandations de l'International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) et de l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) [4] incluant NucBlue comme marqueur de viabilité et des anticorps conjugués à un fluorochrome (CD14-FITC, CD90-FITC, CD146-PE, CD34-ECD, CD45-PC5, CD56-PC7, CD3-APC-A750) ou leur contrôle isotypique pour déterminer la fluorescence non spécifique (Figure 1).

**Figure 1.** Analyse en cytométrie de flux des sous-populations cellulaires de la FVS : stratégie de classification des cellules CD45+ (hématopoïétique) et CD45- (régénératives). (a) Sélection des cellules viables sur la base de l'expression négative de NucBlue et de la dispersion selon la taille ; (b) Les cellules viables sont divisées en cellules CD45+ (hématopoïétiques) et CD45- (régénératives) ; (c) Parmi les cellules régénératives, trois sous-populations sont identifiées sur la base de l'expression de CD146 et CD34 : CD146 élevé / CD34 élevé sont des cellules endothéliales, CD146 - / CD34 élevé sont des cellules stromales, CD146 élevé / CD34 moyen rassemblent des péricytes et des cellules transitionnelles ; (d) Les péricytes et les cellules transitionnelles sont divisés en fonction de l'expression de CD90 (+ pour les cellules transitionnelles et - pour les péricytes) ; (e) Confirmation de l'identification des cellules stromales sur la base de l'expression de CD90 (+ pour les cellules stromales) ; (f) Parmi les cellules hématopoïétiques, les macrophages sont identifiés sur la base de l'expression de CD14 et de la dispersion en fonction de la taille ; (g) Parmi les cellules CD14 - / CD45 +, les granulocytes et les lymphocytes sont séparés en fonction de la dispersion selon la taille ; (h) L'expression de CD56 et CD3 permet la caractérisation des sous-populations de lymphocytes NK et T.



La seconde intervention consistait en l'injection de FVS sous anesthésie générale. La suspension de FVS était injectée à l'aide d'une aiguille de 14G dans le tiers moyen des deux CV cicatricielles (0,45 ml par CV).

La patiente a pu retourner à son domicile le lendemain avec un traitement antibiotique à base d'amoxicilline et une analgésie par paracétamol. Une rééducation orthophonique péri-opératoire était prescrite.

### 3) Evaluation

Le critère d'évaluation principal était la sécurité de l'injection évaluée par le relevé des événements indésirables survenus à 7 jours, 1, 6 et 12 mois. Les critères d'évaluation secondaires concernaient l'efficacité, définie comme une amélioration du bilan vocal, de l'auto-évaluation et/ou de l'aspect en vidéolaryngostroboscopie à 1, 6 et 12 mois.

La vidéolaryngostroboscopie permet d'évaluer la fermeture glottique, l'onde muqueuse, sa régularité et sa symétrie. L'auto-évaluation était réalisée à l'aide du Voice Handicap Index (VHI), un score faible indiquant une voix ressentie comme de bonne qualité. Une différence de 18 points ou plus dans le score total du VHI est nécessaire pour être cliniquement pertinente [5]. La sévérité de la dysphonie était quantifiée avec l'échelle GRB simplifiée dérivée de l'échelle GRBAS proposée par Hirano [6] (G pour global, R pour raucité, B pour « breathiness » soit « soufflée » en français). Le jitter fait référence à une perturbation à court terme (cycle à cycle) de la fréquence fondamentale de la voix (le plus bas le meilleur). Le rapport signal sur bruit quantifie la partie apériodique du signal vocal (plus le signal est haut, meilleur il est). Le temps maximum de phonation (TMP) et le débit d'air buccal (DAB) quantifient la fuite d'air glottique : si la fuite est importante, le TMP est court et le DAB élevé. La pression sous-glottique estimée (PSG) au seuil phonatoire est la pression sous-glottique minimale nécessaire pour déclencher et maintenir la vibration des CV [7].

## G. Résultats

Les caractéristiques de la FVS sont résumées dans le Tableau 3.

**Table 2 :** Bilan vocal avant et 12 mois après injection de FVS autologue d'origine adipeuse.

		Bilan vocal pré-opératoire	Bilan vocal à 12 mois
Auto-évaluation	VHI 30 (/ 120)	75	9
Analyse perceptive	Echelle GRB d'Hirano	G2R2B0	G1R1B0
Analyse acoustique	Fréquence fondamentale (hertz)	180	203
	Etendue vocale (hertz)	381	921
	Jitter (%)	4.6	0.2
	Rapport signal sur bruit (décibel)	9.5	17.7
Analyse aérodynamique	TMP (second)	13.2	7.8
	Débit d'air buccal (cm <sup>3</sup> /second)	203	198
	PSG (hectopascal)	7.9	7.3

VHI : Voice Handicap Index ; TMP : Temps Maximum de Phonation ; PSG : Pression Sous-Glottique estimée au seuil phonatoire

**Tableau 3 :** Caractéristiques de la FVS d'origine adipeuse.

Volume de tissu adipeux prélevé (ml)	340
Volume de FVS injectée (ml)	2 x 0.45
Nombre de CNV obtenues, avant contrôle qualité (millions)	135
Taux de récupération (CNV / ml de tissu adipeux)	397 000
Nombre de CNV injectées, après contrôle qualité (millions)	12.2
Viabilité (%)	86
Leucocytes (%)	35
<i>Macrophages / Monocytes (%)</i>	17.6
<i>Lymphocytes (%)</i>	12.8
<i>Dont Lymphocytes T (%)</i>	9.8
<i>Neutrophiles (%)</i>	4.6
Cellules transitionnelles (%)	3.8
Progéniteurs endothéliaux (%)	2.7
Péricytes (%)	3.8
Cellules Souches Mésenchymateuses = Adipose-Derived Stem Cells (%)	54,7

FVS : Fraction Vasculaire Stromale ; CNV : Cellules Nucléées Viables

Les seuls événements indésirables rapportés ont été l'existence d'hématomes dans les zones de liposuccion (résorption en 3 semaines) et de douleurs mandibulaires pendant 1 semaine (liées à l'installation requise pour la laryngoscopie). Aucun événement indésirable grave lié à l'administration du produit cellulaire n'a été signalé. En ce qui concerne l'efficacité, le Tableau 2 indique les résultats de l'évaluation finale à 12 mois (des enregistrements audio et vidéo en données supplémentaires les montrent de manière plus détaillée [voir données

supplémentaires 4, 5 et 6]). L'analyse perceptive retrouvait une voix moins éraillée et plus stable, sans souffle. La vidéolaryngostroboscopie révélait une amélioration significative de la vibration du tiers moyen des deux CV. La patiente déclarait être mieux entendue par son entourage grâce à une voix "plus claire".

## H. Discussion

L'impact vocal des CV cicatricielles est handicapant tandis que les options de traitement actuelles sont limitées. L'utilisation de la FVS est particulièrement prometteuse puisque son efficacité a déjà été prouvée dans plusieurs pathologies [3, 8-11], mais elle n'avait jusqu'à présent jamais été testée chez l'homme dans cette indication. Les cellules souches / stromales mésenchymateuses d'origine adipeuse (Adipose-Derived Stem Cells, ADSC) sont des cellules multipotentes qui, une fois purifiées et cultivées, ont montré leur capacité à diminuer l'inflammation et la fibrose et à améliorer les propriétés viscoélastiques de la muqueuse [12, 13]. À notre connaissance, il s'agit cependant ici du premier cas publié d'injection de FVS (donc sans étape de culture et avec un minimum de transformation du produit) au niveau laryngé chez l'homme. La FVS présente une consistance très fluide permettant son injection dans l'espace de Reinke, luttant ainsi contre l'adhérence entre l'épithélium et les tissus sous-jacents. Nous avons délibérément choisi de ne pas associer une exérèse des tissus fibreux afin d'éviter une augmentation de l'atrophie de la CV. Les résultats suggèrent une nette amélioration de la majorité des paramètres du bilan vocal, en particulier du VHI illustrant le ressenti du patient vis-à-vis de sa dysphonie, sans événement indésirable grave ou imprévu.

Sept autres patients ont été inclus dans cet essai. Leur suivi n'est pas encore terminé mais il semblerait que 3 d'entre eux obtiennent également de très bons résultats (notamment sur le VHI). Aucun d'entre eux n'a eu d'effets indésirables graves ni d'aggravation de la dysphonie.

Des études précliniques et cliniques antérieures suggèrent que la FVS exerce des effets anti-fibrotiques. Dans une sclérose cutanée ressemblant à la sclérodermie, induite chez la souris, Serratrice et al. [14] ont montré que la FVS limitait de manière significative la sclérose dermique et épidermique et était associée à une augmentation significative de la vascularisation locale. Domergue et al. [15] ont comparé la FVS dans sa totalité et des ADSC cultivées à partir de tissu adipeux dans un modèle de greffe cutanée de cicatrice hypertrophique chez la souris

nude. Ils ont montré que les deux stratégies de thérapie cellulaire étaient capables de réduire de manière significative les paramètres cliniques et histologiques de la cicatrice hypertrophique. Par la sécrétion d'adrénomodulline et d'Hepatocyte Growth Factor (HGF), les ADSC réduisaient l'expression du TGF- $\beta$ 1 et ses gènes cibles (collagène I, collagène III,  $\alpha$ -SMA). Bien qu'ils ne soient significatifs que pour le TGF- $\beta$ 1, ils observaient une régulation négative de tous les gènes au huitième jour suivant l'injection de FVS, mais pas après l'injection d'ADSC. Par ailleurs, les ADSC ont induit une augmentation hautement significative de l'expression de TGF- $\beta$ 3, avec une modification du rapport TGF- $\beta$ 1 / TGF- $\beta$ 3 en faveur d'un effet antifibrotique. Les ADSC avaient également tendance à augmenter MMP-1 et MMP-3 et augmentaient significativement MMP-2 et le ratio MMP-2 / TIMP-2, contrairement aux cellules de la FVS.

Ainsi, l'effet bénéfique rapporté dans ce cas clinique pourrait être attribué à la présence de cellules ADSC dans la FVS puisqu'elles représentaient 54,7% des 12,2 millions de cellules injectées viables.

D'un point de vue réglementaire, ces thérapies sont régies par le règlement n°1394/2007 du Parlement européen et du Conseil décrivant une nouvelle catégorie de produits de santé dénommés «médicaments de thérapie innovante». La production de ceux-ci doit être conforme aux bonnes pratiques de fabrication (Good Manufacturing Practices, GMP) des industries pharmaceutiques. Cela implique une augmentation des coûts de production, ce qui peut ne pas être viable pour les institutions publiques. Cependant, bien que la culture des ADSC nécessite deux à trois semaines, la FVS peut, elle, être fabriquée en quelques heures, permettant ainsi une lipoaspiration et une réinjection le même jour. Cet élément est important du point de vue du rapport coût-efficacité.

Ce rapport encourage l'inclusion et la surveillance d'un plus grand nombre de patients afin de documenter l'innocuité et l'efficacité de ce traitement. Par la suite, des essais d'efficacité versus placebo devront être envisagés pour confirmer l'efficacité espérée. En effet, une action volumatrice isolée ou surajoutée n'est pas exclue et un effet placebo partiel est possible chez ces patients qui espèrent beaucoup de tels traitements perçus comme futuristes. Cependant, ce cas clinique est prometteur quant à l'utilisation de thérapie cellulaire dans les pathologies laryngées telles que les CV cicatririelles, notamment lorsque les traitements disponibles font défaut. Parmi le panel de produits de thérapie cellulaire actuellement accessibles, la FVS pourrait présenter des avantages importants en raison de sa relative simplicité de production et d'utilisation.

## **I. Données supplémentaires**

- Fichier additionnel 1 (video mp4) – Videolaryngostroboscopie avant injection de fraction vasculaire stromale : aspect cicatriciel des cordes vocales avec absence de vibration de leur tiers moyen.
- Fichier additionnel 2 (audio wav) – Enregistrement vocal en lecture, avant injection de fraction vasculaire stromale : voix éraillée, instable et légèrement soufflée.
- Fichier additionnel 3 (audio wav) – Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue, avant injection de fraction vasculaire stromale : voix éraillée, instable et légèrement soufflée.
- Fichier additionnel 4 (video mp4) – Videolaryngostroboscopie un an après injection de fraction vasculaire stromale : la vibration du tiers moyen des cordes vocales est améliorée.
- Fichier additionnel 5 (audio wav) – Enregistrement vocal en lecture, un an après injection de fraction vasculaire stromale : la voix est moins éraillée, plus stable, non soufflée.
- Fichier additionnel 6 (audio file .wav) – Enregistrement vocal pendant une voyelle /a/ tenue, un an après injection de fraction vasculaire stromale : la voix est moins éraillée, plus stable, non soufflée.

## **J. Autres informations**

Approbation éthique et consentement : La patiente a été incluse dans l'essai clinique de phase I CELLCORDES (numéro EudraCT 2015-000238-31; ClinicalTrials.gov NCT02622464, publié pour la première fois le 4 décembre 2015). Elle a donné son consentement écrit pour participer à l'étude. L'étude a été approuvée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et un comité d'éthique français (CPP Sud Méditerranée V, 21.04.2015).

Consentement à la publication : La patiente a donné son consentement pour la publication de ses données.

Disponibilité des données et du matériel : L'ensemble des données générées et / ou analysées au cours de la présente étude sont disponibles auprès de l'auteur correspondant sur demande raisonnable.

Conflits d'intérêt : Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Financement : Le projet a été promu par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, avec un financement de la Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (Paris, France) et de la Fondation des Gueules Cassées.

Contributions des auteurs : AM et JM ont contribué de manière égale à la rédaction du manuscrit et à la collecte des données ; BB, JR, JV, FG et AG ont grandement contribué à la collecte de données et à la rédaction du manuscrit ; MV, FS et PD ont participé à l'interprétation des données et contribué à la rédaction du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

## K. Références

- [1] Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, Remacle M, Hess M, Giovanni A et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the phonosurgery committee of the European laryngological society. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270(9):2491-507.
- [2] Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigation. Otologia (Fukuoka). 1975; 21:239–440.
- [3] Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, et al. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. Stem Cells Transl Med. 2017 Apr;6(4):1096-1108.
- [4] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy. 2013;15(6):641-8.
- [5] Jacobson B, Johnson A, Grywalski C, Silbergbeit A, Jacobson G, Benninger M et al. The Voice Handicap Index (VHI): Development and Validation. Am J Speech Lang Pathol. 1997; 6:66-70.

- [6] Hirano M. Psycho-acoustic evaluation of voice: GRBAS Scale for evaluating the hoarse voice. In: Hirano M, editors. Clinical Examination of voice,. Wien: Springer Verlag; 1981.
- [7] Dejonckere PH, Bradley P, Clemente P, Cornut G, Crevier-Buchman L, Friedrich G et al. A basic protocol for functional assessment of voice pathology, especially for investigating the efficacy of (phonosurgical) treatments and evaluating new assessment techniques. Guideline elaborated by the Committee on Phoniatrics of the European Laryngological Society (ELS). Eur Arch Otorhinolaryngol. 2001 Feb;258(2):77-82.
- [8] LeBlanc AJ, Touroo JS, Hoying JB, Williams SK. Adipose stromal vascular fraction cell construct sustains coronary microvascular function after acute myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012;302(4):H973-H82.
- [9] Daumas A, Magalon J, Jouve E, Truillet R, Casanova D, Giraudo L et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. Curr Res Transl Med. 2017;65(1):40-43.
- [10] Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toronto JD, Wirth GA et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2016 Feb;69(2):170-9.
- [11] Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. Burns. 2014;40(7):1375-83.
- [12] Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Philandrianos C, Veran J, Giovanni A. Cell therapy and vocal fold scarring. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2017;134(5):339-345.
- [13] Fishman JM, Long J, Gugatschka M, De Coppi P, Hirano S, Hertegard S et al. Stem cell approaches for vocal fold regeneration. Laryngoscope. 2016;126(8):1865-70.
- [14] Serratrice N, Bruzzese L, Magalon J, Véran J, Giraudo L, Aboudou H et al. New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. Stem Cell Res Ther. 2014 Dec;5(6):138.
- [15] Domergue S, Bony C, Maumus M, Toupet K, Frouin E, Rigau V et al. Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156161.

## **IV. Conclusions et perspectives**

Notre essai CELLCORDES a permis de prouver la sécurité d'emploi de la Fraction Vasculaire Stromale (FVS) au niveau laryngé, aucun effet secondaire grave ou inattendu n'ayant eu lieu. Mais au-delà de la faisabilité et de la tolérance de cette thérapie cellulaire, nous sommes désormais en possession de résultats montrant une indéniable amélioration clinique. Nous avons en effet noté une franche amélioration du Voice Handicap Index (bien au-delà des seuils requis pour affirmer la pertinence clinique), témoignant de la satisfaction majeure des patients traités. D'autre part, plusieurs paramètres objectifs ont également été améliorés : c'est en particulier le cas de l'aspect vibratoire des cordes vocales en vidéo-laryngo-stroboscopie qui s'est amélioré de façon spectaculaire chez certains patients. Ces éléments nous semblent ainsi aller à l'encontre d'un simple effet placebo même si nous n'avons pour autant pas encore pu démontrer que cette amélioration repose réellement sur un effet anti-fibrotique. D'autres études sont en cours dans ce but (*cf infra*).

Nous gardons toutefois à l'esprit que notre essai CELLCORDES a été réalisé sur un nombre restreint de patients et en l'absence de groupe contrôle. Pour aller plus loin et affirmer l'efficacité de la prometteuse FVS, nous avons donc élaboré le projet CELLCORDES 2 qui reposera sur une étude comparative avec un traitement de référence.

### **A. Essai clinique CELLCORDES 2**

Afin de confirmer l'efficacité de la FVS dans les cordes vocales cicatricielles, nous avons récemment déposé une demande de PHRC (Programme Hospitalier de Recherche Clinique) régional pour la mise en place de l'essai CELLCORDES 2. Cet essai de phase II, randomisé, contrôlé, en double aveugle étudiera l'efficacité de l'injection de FVS autologue d'origine adipeuse comparée à l'injection de corticoïdes chez des patients présentant les mêmes critères d'inclusion et d'exclusion que ceux de l'essai CELLCORDES.

L'injection de corticostéroïdes n'est pas le traitement de référence pour les cordes vocales cicatricielles, car il n'existe en réalité aucun traitement de référence dans cette pathologie, mais il s'agit d'un agent anti-inflammatoire et immunomodulateur connu, déjà utilisé en microchirurgie laryngée pour la prévention des cicatrices cordales même si son

efficacité n'est pas prouvée sur le long terme. La solution de corticostéroïdes ayant une consistance proche de celle de la FVS, cela permettra de comparer les deux produits, sans biais lié à l'effet volumateur. Une autre option aurait été de proposer une *sham injection* c'est à dire l'injection d'un simple placebo mais, pour des raisons éthiques, il nous a semblé préférable de proposer l'injection du seul traitement actuellement disponible, même si celui-ci semble très insuffisant.

L'essai CELLCORDES 2 sera multicentrique et inclura des patients de Marseille, Nice, Toulouse et Montpellier. Lors de l'inclusion, qui durera 2 ans, 36 patients seront randomisés dans deux groupes (ratio 1/1) : le groupe FVS et le groupe témoin traité par corticostéroïdes.

Le groupe FVS sera traité en chirurgie ambulatoire avec :

- Le matin, lipoaspiration de 50 à 150 ml de graisse (abdomen ou hanches) par un chirurgien plasticien, sous anesthésie locale avec sédation ;
- L'après-midi, injection par l'équipe ORL, sous anesthésie générale en laryngoscopie en suspension, de 1,5 ml de FVS dans la(les) corde(s) vocale(s) cicatricielle(s).

Le groupe témoin sera traité en chirurgie ambulatoire avec :

- Le matin, une lipoaspiration (selon les mêmes modalités) avec congélation de la FVS obtenue ;
- L'après-midi, injection de corticostéroïdes (1,5 ml d'une solution composée de 120 mg de Méthylprednisolone dilué dans 3 ml de sérum physiologique) selon les mêmes modalités.

Pour des raisons pratiques, les procédures chirurgicales seront réalisées à Marseille à proximité immédiate du service de Thérapie Cellulaire du Pr Sabatier tandis que le suivi sera effectué dans le centre d'origine. Il est apparu plus simple et moins dangereux de déplacer les patients plutôt que le prélèvement adipeux dans un sens et la FVS après extraction dans l'autre sens. Le suivi sera de 6 mois ± 6 mois supplémentaires (voir ci-dessous : cross over partiel). Les patients seront suivis et évalués, en double aveugle, sur le critère principal (Voice Handicap Index, VHI) et les critères secondaires (vidéo-laryngo-stroboscopie, mesures perceptives, acoustiques et aérodynamiques) à 1 et 6 mois.

Au terme de ce suivi de 6 mois, les patients en échec thérapeutique (amélioration du VHI < 18 points) pourront bénéficier dans le cadre d'une étude de type cross-over partiel, s'ils le souhaitent, de l'injection du traitement non encore reçu (corticostéroïdes pour le groupe FVS

et FVS congelée pour le groupe témoin). Dans ce cas, le suivi sera prolongé avec de nouvelles évaluations à 1 et 6 mois.

Les analyses finales porteront sur 4 groupes :

- Injection de FVS fraîche,
- Injection de FVS fraîche puis injection de corticostéroïdes,
- Injection de corticostéroïdes,
- Injection de corticostéroïdes puis de FVS congelée.

La mise en évidence d'une efficacité supérieure de la FVS comparée aux corticoïdes, au sein d'un essai randomisé contrôlé, permettrait de confirmer définitivement l'efficacité clinique de la FVS.

## B. Projet Amadeus

Afin de préciser les mécanismes physiopathologiques sous-tendant l'action anti-fibrotique de la FVS, nous avons développé conjointement un modèle *in vitro* de cordes vocales cicatricielles. Ce projet, financé conjointement par les pouvoirs publics français et autrichiens dans le cadre d'un partenariat sous l'égide de la Communauté Européenne, a été rendu possible par la collaboration des équipes marseillaises du service ORL du Pr Dessi et de Thérapie Cellulaire du Pr Sabatier avec l'équipe autrichienne dirigée par le Pr Gugatschka à Gratz, spécialisée dans l'ingénierie tissulaire au niveau laryngé. Ce modèle est basé sur le principe du Macromolecular Crowding (MMC) correspondant à l'induction d'une fibrose par l'ajout de macromolécules inertes (Ficoll) et de TGF $\beta$ 1 au milieu de culture de fibroblastes issus de cordes vocales [1,2]. Dans des conditions de culture cellulaire standard, la conversion du procollagène soluble dans l'eau en collagène insoluble est très lente car les enzymes et molécules impliquées peinent à entrer en contact. L'ajout de macromolécules inertes dans le milieu de culture permet d'occuper une grande partie du volume disponible et confine les autres molécules dans le peu d'espace restant, ce qui a pour effet d'augmenter les interactions protéiques. La conversion de procollagène en collagène est accélérée et on obtient une matrice extracellulaire d'une densité plus proche de celle des tissus vivants. L'ajout de TGF $\beta$ 1 permet quant à lui de stimuler la transformation des fibroblastes en myofibroblastes, marqueurs de fibrose. Ce modèle a déjà été utilisé pour montrer l'effet anti-fibrotique de l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) par d'autres auteurs dans des indications similaires [1].

Les premiers résultats obtenus avec la FVS sont très encourageants (Tableau 1) puisque celle-ci semble diminuer l’ $\alpha$ -SMA (marqueur des myofibroblastes et de fibrose), avec une efficacité supérieure à l’HGF et selon un gradient de dose.

**Tableau 1.** Etude de l’effet anti-fibrotique de la FVS par analyse de la synthèse d’ $\alpha$ -SMA en qPCR.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Moyenne
Milieu classique	0,15	0,15	2,38	0,89
Milieu MMC	100,00	100,00	100,00	100,00
Milieu MMC + HGF	78,29	78,29	29,91	62,16
Milieu MMC + FVS 1/1	9,51	10,34	14,42	11,42
Milieu MMC + FVS 1/2	4,29	5,59	6,32	5,40
Milieu MMC + FVS 1/5	7,42	3,22	5,37	5,34

Chaque expérience testait un échantillon différent de FVS.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage, 100% correspondant au taux d’ $\alpha$ -SMA retrouvé en condition de Macromolecular Crowding (MMC) et en l’absence de traitement à visée anti-fibrotique.

Un ratio 1/5 de Fraction Vasculaire Stromale (FVS) correspond à l’ajout d’un nombre de cellules de FVS 5 fois supérieur au nombre de fibroblastes compris dans le milieu.

### C. Quelles perspectives pour l’avenir ?

La thérapie cellulaire représente une des innovations médicales majeures de ces dernières années. Son utilisation dans un champ très large de pathologies ne cesse de croître et s’étend désormais au-delà de la recherche clinique, gagnant petit à petit la pratique quotidienne des médecins de diverses spécialités.

La laryngologie est une discipline qui n’a pour l’instant pas encore pleinement tiré bénéfice des multiples promesses faites par la thérapie cellulaire, son emploi restant du domaine de la recherche dans la sphère ORL. Mais, dans une perspective de diffusion plus large de la thérapie cellulaire, la FVS offre l’avantage de sa simplicité de production et d’utilisation par rapport aux cultures cellulaires nécessaires pour produire des cellules souches « purifiées ». Ces modalités de fabrication ne cessent de se simplifier et il est probable que dans un futur proche elle puisse être directement produite au sein du bloc opératoire, sans l’interface d’un service de Thérapie Cellulaire dédié, grâce à l’emploi de système de microfiltrages venant remplacer les étapes de digestion enzymatique. La possibilité de congélation de la FVS offre de plus la possibilité de traitements itératifs d’un même patient après réalisation d’un prélèvement adipeux unique.

Nous avons dans notre essai CELLCORDES choisi de tester son efficacité dans l'indication restreinte des cordes vocales cicatricielles après phonochirurgie pour tumeur bénigne ou après involution de lésions congénitales comme des kystes épidermiques. Mais le champ des pathologies qui pourraient bénéficier de ses propriétés est évidemment beaucoup plus vaste. Nous avions exclu les patients aux antécédents carcinologiques laryngés par mesure de précaution ; cependant de récentes études cliniques s'intéressant au risque néoplasique lié à l'emploi de la FVS ne semblent pas montrer de sur-risque. C'est notamment le cas d'études portant sur la reconstruction mammaire après chirurgie du cancer du sein, indication où la FVS est utilisée pour augmenter la survie des transplants de graisse. Le nombre de récidives néoplasiques n'était pas augmenté par l'emploi de FVS [3-5]. Une fois l'absence de risque confirmé, la question de l'emploi de FVS à visée anti-fibrotique ou régénérative pourra alors se poser dans le traitement de diverses séquelles carcinologiques, chirurgicales ou post-radiques : cicatrice de cordectomie laser, fibrose post-radique, pharyngostome etc.

Enfin, l'utilisation de FVS à visée préventive pourrait également être envisagée immédiatement après chirurgie afin de diminuer le risque d'évolution cicatricielle défavorable, de manière systématique ou par sélection des patients à risque sur des critères cliniques, puis un jour peut-être génétiques.

C'est donc avec impatience que nous attendons les résultats des études suscitées qui viendront, nous l'espérons, confirmer et expliquer les propriétés pressenties de la FVS ; car nul doute que ceux-ci auront une répercussion bientôt au-delà du plan glottique.

## D. Références

1. Graupp M, Gruber HJ, Weiss G, Kiesler K, Bachna-Rotter S, Friedrich G, Gugatschka M. Establishing Principles of Macromolecular Crowding for In Vitro Fibrosis Research of the Vocal Fold Lamina Propria. Laryngoscope. 2015;125:E203–E209.
- 2 Kumar P, Satyam A, Fan X, Collin E, Rochev Y, Rodriguez BJ et al. Molecularly crowded in vitro microenvironments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. Sci. Rep. 2015;5, 8729.

3. Mazur S, Zołocińska A, Siennicka K, Janik-Kosacka K, Chrapusta A, Pojda Z. Safety of adipose-derived cell (stromal vascular fraction - SVF) augmentation for surgical breast reconstruction in cancer patients. *Adv Clin Exp Med.* 2018 Aug;27(8):1085-1090.
4. Ito S, Kai Y, Masuda T, Tanaka F, Matsumoto T, Kamohara Y, et al. Long-term outcome of adipose-derived regenerative cell-enriched autologous fat transplantation for reconstruction after breast-conserving surgery for Japanese women with breast cancer. *Surg Today.* 2017 Dec;47(12):1500-1511.
5. Calabrese C, Kothari A, Badylak S, Di Taranto G, Marcasciano M, Sordi S, et al. Oncological safety of stromal vascular fraction enriched fat grafting in two-stage breast reconstruction after nipple sparing mastectomy: long-term results of a prospective study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Aug;22(15):4768-4777.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

**J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.**

**Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.**

**Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.** Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

**Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.** Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

**Je préserverais l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.** Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

**J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.**

**Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.**



## RÉSUMÉ

**Introduction :** Les patients présentant des cordes vocales cicatricielles, qu'elles soient d'origine congénitale ou après phonochirurgie, présentent souvent une dysphonie ayant un impact négatif majeur sur leur vie quotidienne et dont le traitement est difficile. La Fraction Vasculaire Stromale (FVS) autologue d'origine adipeuse est de plus en plus reconnue comme une source facilement accessible de cellules aux propriétés angiogéniques, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et régénératrices. Notre objectif était d'évaluer la faisabilité, la sécurité, la tolérance et l'efficacité potentielle des injections locales de FVS autologue d'origine adipeuse chez des patients présentant des cordes vocales cicatricielles.

**Matériel et méthodes :** Cet essai pilote de phase I était une étude prospective, ouverte, non contrôlée et monocentrique, avec un suivi de 12 mois auprès de 8 patients (7 femmes et 1 homme) présentant une dysphonie sévère due à des cordes vocales cicatricielles (Voice Handicap Index [VHI] > 60/120). La FVS était préparée et injectée dans une ou deux cordes vocales. Le critère de jugement principal était la faisabilité, le nombre et la gravité des effets indésirables liés au traitement à base de FVS. Les critères d'évaluation secondaires étaient les modifications du bilan vocal, de la vidéo-laryngo-stroboscopie et de l'auto-évaluation de la dysphonie et de la qualité de vie, à 1, 6 et 12 mois après injection.

**Résultats :** La sécurité et la faisabilité étaient évidentes puisque ne sont survenus que des événements indésirables liés à la liposuccion et à l'injection de FVS qui étaient prévus et se sont résolus spontanément pour la plupart. Un patient a nécessité des massages par un kinésithérapeute pour drainer un hématome au niveau des zones de liposuccion et un autre s'est plaint d'une gêne esthétique liée à un défaut adipeux au niveau du site de liposuccion. À 12 mois, le VHI était amélioré chez tous les patients, avec une amélioration moyenne par rapport aux valeurs initiales de  $40,1 \pm 21,5$  points ( $p = 0,012$ ). Sept patients ont été considérés comme répondeurs soit une amélioration  $\geq 18$  points correspondant à la différence minimale cliniquement pertinente pour le VHI. Une tendance à l'amélioration de la raucité de la voix dans l'analyse perceptive a également été observée. Les principales limites étaient celles d'une étude pilote (nombre limité de patients, différentes étiologies de cordes vocales cicatricielles impliquées, essai ouvert sans groupe témoin).

**Conclusion :** Cette étude valide la sécurité de l'injection autologue de FVS d'origine adipeuse dans les cordes vocales cicatricielles et suggère une efficacité potentielle qui devra être confirmée par la réalisation d'un essai clinique randomisé, versus placebo, sur une population plus importante.

## MOTS-CLÉS

Cellules souches d'origine adipeuse, Cellules souches mésenchymateuses, Thérapie cellulaire, Fraction vasculaire stromale, Corde vocale, Fibrose, Cicatrice, Sulcus, Dysphonie.