



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2013

*THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE*

*MISE AU POINT D'UN MODELE ANIMAL CHEZ LE RAT
POUR LA CRYOPRESERVATION DES TISSUS COMPOSITES*

Présentée et soutenue publiquement le 3 mai 2013
Par *Adrien BONNET-TORRES*

Jury

Président : Madame le Professeur DUQUENNOY-MARTINOT

Assesseurs : Monsieur le Professeur MARCHETTI
Madame le Professeur AUQUIT-AUCKBUR
Monsieur le Docteur GUERRESCHI
Monsieur le Docteur SCHOofs
Monsieur le Docteur WAVREILLE

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur GUERRESCHI

Table des matières

INTRODUCTION.....	10
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1) LES TISSUS COMPOSITES	12
a. Définition.....	12
b. Utilisation clinique des tissus composites autologues.....	12
c. Allogreffe de tissus composites.....	14
d. Spécificité des allogreffes de tissus composites du membre supérieur	17
2) CRYOPRESERVATION	19
a. Définition.....	19
b. Physiopathologie.....	20
c. Cryoprotecteurs	22
d. Lésions d'ischémie-reperfusion.....	23
e. Applications pratiques.....	25
f. Immunité et cryopréservation.....	26
3) CRYOPRESERVATION DES TISSUS COMPOSITES.....	27
a. Intérêt clinique	27
b. Enjeux dans le domaine de la chirurgie réparatrice.....	28
4) INTERET DE LA MISE AU POINT D'UN MODELE D'ETUDE.....	34
PARTIE EXPERIMENTALE.....	36
1) POSTULAT DE DEPART	36
a. Cahier des charges du modèle.....	36
b. Choix des animaux.....	37
c. Choix du greffon.....	38
d. Choix du site receveur.....	39
2) ETUDE PRELIMINAIRE RADIO-ANATOMIQUE	39
a. Protocole	39
b. Membre postérieur.....	40
c. Région cervicale	43
d. Greffon en place.....	46
3) MATERIEL ET METHODE.....	47
a. Avis du Comité d'Ethique	47
b. Lieu de l'étude.....	48
c. Protocole anesthésique et antalgique.....	49

<i>d. Protocole chirurgical</i>	50
<i>e. Matériel spécifique</i>	56
<i>f. Mesure des paramètres peropératoires</i>	57
<i>g. Surveillance postopératoire</i>	57
<i>h. Sortie de protocole</i>	59
<i>i. Analyses statistiques</i>	59
4) RESULTATS.....	61
<i>a. Description de la cohorte</i>	61
<i>b. Evolutions de protocole</i>	61
<i>c. Analyse statistique des données des transplants</i>	62
<i>d. Analyse statistique des données des anastomoses</i>	64
<i>e. Survie des transplants</i>	65
<i>f. Survie des rats</i>	67
5) DISCUSSION.....	68
<i>a. Les animaux</i>	68
<i>b. Le transplant</i>	69
<i>c. Le site receveur</i>	71
<i>d. La survie des rats et des transplants</i>	73
<i>e. Les conditions de l'étude</i>	75
CONCLUSION	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78
ANNEXE 1 : DONNEES BRUTES	83
ANNEXE 2 : DOSSIER DE DEMANDE D'APPROBATION DU COMITE D'ETHIQUE	86
ANNEXE 3 : AVIS DU COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE	95
ANNEXE 4 : ARTICLE CORRESPONDANT (SANS FIGURE)	96

Liste des figures

- Figure 1 :** Le miracle de Saint Côme et Saint Damien, Fra Angelico, vers 1450.15
- Figure 2 :** Micro-IRM 7 Tesla. A : vue d'ensemble. B : lit et tunnel de chargement.40
- Figure 3 :** Etude de la corrélation radioanatomique de la vascularisation du membre postérieur chez le rat. A : vue ventrale peropratoire. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). Vaisseaux AO : aorte, IP : iliaques primitifs, II : iliaque internes, F : fémoraux, POP : poplités, SI : saphènes internes.42
- Figure 4 :** Trifurcation des vaisseaux poplités chez le rat. A : vue latérale sur cadavre, genou disjoint. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). Vaisseaux Fe : fémoraux, SI : saphènes internes, POP : poplités, TA : tibiaux antérieurs, TP : tibiaux postérieurs, Fi : fibulaires. NFC : nerf fibulaire commun.42
- Figure 5 :** Vue latérale de la musculature de la cuisse chez le rat. VL : muscle vaste latéral, GF : muscle grand fessier, BF : muscle biceps fémoral, OE : muscle oblique externe.43
- Figure 6 :** Vue ventrale sur cadavre de la musculature cervicale du rat. A : les muscles sternohyoïdiens (SH) sont d'emblée visibles entre les muscles sternocléidomastoïdiens (SCM) dont l'insertion sur la clavicule répond au muscle grand pectoral (GP). Le chef antérieur du muscle trapèze (TA) s'insère en regard du muscle deltoïde (D). B : la réclinaison du SCM permet d'aborder le muscle omohyoïdien (OH) qui le croise obliquement vers l'arrière et le dehors.44
- Figure 7 :** Coupe axiale du cou en IRM séquence T1 chez le rat. Noter la prédominance de la musculature dorsale et l'enfouissement des processus épineux.45
- Figure 8 :** Etude de la corrélation radioanatomique de la vascularisation cervicale chez le rat. A : vue ventrale sur cadavre. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). La flèche rouge matérialise l'artère carotide commune et la bleue la veine jugulaire externe. SCM : muscles sternocléidomastoïdiens, OH : muscle omohyoïdien, SH : muscles sternohyoïdiens.46
- Figure 9 :** Coupe axiale d'une IRM en pondération T1 chez un rat transplanté montrant le trajet de l'artère (trait rouge) et de la veine (trait bleu) du pédicule entre les muscles du cou. RA : muscle rhomboïde antérieur, TA : chef antérieur du muscle trapèze, SCM : muscle sternocléidomastoïdien, OH : muscle omohyoïdien.47
- Figure 10 :** Vue d'ensemble du poste de travail. A : zone chirurgicale avec le microscope opératoire, le tapis chauffant, le masque de ventilation et le module de monitoring. B : zone anesthésique avec sur le plateau supérieur le débitmètre, la cuve, le double circuit (vers le masque ventilatoire et vers la cage à induction) et sur le plateau inférieur le module d'extraction des gaz.48
- Figure 11 :** Vue ventrale peropratoire du carrefour des veines iliaques chez le rat. A : la veine iliaque primitive (VIP) et la veine iliaque externe (VIE) masquent intégralement la veine iliaque interne. B : la veine iliaque interne (VII) n'est visible qu'après réclinaison de la VIP et de la VIE. AI : artère iliaque.51
- Figure 12 :** Vue latérale d'un transplant de membre postérieur de rat fraîchement prélevé. Les muscles sont coupés au niveau du genou sans parage.53

Figure 13 : Tunnelisation du pédicule entre les muscles cervicaux. A : vue ventrale, le muscle sternocléidomastoïdien est récliné par un lac. B : vue latérale avec le pédicule engagé dans l'extrémité dorsale.....	54
Figure 14 : Vue de profil d'un rat receveur avec le transplant en position cervicale dorsale médiane. Noter la longueur de pédicule nécessaire pour un branchement cervical ventral.	55
Figure 15 : Surveillance du transplant par mesure de la saturation en oxygène.	58
Figure 16 : Vue de 3/4 d'un rat receveur avec le transplant en position cervicale dorsale paramédiane.	62
Figure 17 : Evolution des durées opératoires de prélèvement et de réimplantation au cours de l'étude. Le changement d'inclinaison de la courbe d'apprentissage se situe après le septième cas. C'est le nombre moyen de manipulations nécessaires pour obtenir des résultats fiables et reproductibles.	63
Figure 18 : Dispersion des valeurs de diamètre des vaisseaux et de longueur du pédicule du transplant en fonction du poids. Il n'y a pas de corrélation entre le poids et les autres paramètres.	64
Figure 19 : Dispersion des valeurs de diamètre des vaisseaux cervicaux du rat receveur en fonction du poids. Il n'y a pas de corrélation entre le poids et les autres paramètres.	65
Figure 20 : Aspect à J3 d'un transplant avec parage musculaire extensif. Noter la nécrose cutanée de la jambe et la bonne vitalité du pied malgré un aspect transitoirement congestif des orteils.	66
Figure 21 : Signe de Claude-Bernard-Horner gauche à J1 d'une réimplantation : énoptalmie et ptosis. Le myosis n'est pas visible sur la photo.	67
Figure 22 : Vue ventrale au grossissement x16 de la différence de calibre et de consistance entre la veine jugulaire externe (VJE) spasmée et la veine iliaque primitive (VIP) après anastomose chez le rat. ACC : artère carotide commune, AIP : artère iliaque primitive.	71
Figure 23 : Vue ventrale au grossissement x10 des rapports entre l'artère carotide commune (ACC) et le nerf vague (NV) chez le rat. VJI : veine jugulaire interne (réclinée).....	72
Figure 24 : Résultat de revascularisation immédiate du transplant en fonction de la position du pédicule vasculaire. Le passage sous-cutané du pédicule donne de meilleures chances de succès.	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Revue de la littérature des différents modèles expérimentaux sur la cryopréservation de tissus composites dans le domaine de la chirurgie réparatrice.	33
--	-----------

INTRODUCTION

« On ne peut compter que sur ses doigts » écrivait en 2001 l'humoriste Ylipe¹ (1). L'homme de lettres devait probablement ignorer que son aphorisme était erroné. En effet, l'utilisation d'allogreffes de tissus composites orthotopiques dans les reconstructions distales du membre supérieur était une réalité depuis plusieurs années : on pouvait donc déjà à l'époque compter sur les doigts des autres !

La faisabilité technique ne semble plus être un frein à l'expansion des allogreffes de segment de membre. Pour autant, leur utilisation dans un but purement fonctionnel soulève bon nombre de problèmes à mettre en balance avec le bénéfice escompté. Le premier d'entre eux est la nécessité d'un traitement immunosuppresseur à vie et tout son cortège de contraintes et d'effets indésirables. Le sujet est actuellement très étudié et débattu avec, à la clef, l'émergence de nouveaux protocoles mieux tolérés. Le deuxième écueil majeur de cette technique est la disponibilité des greffes. Ces protocoles sont à l'heure actuelle dépendants d'un approvisionnement discontinu en greffes car ils sont prélevés sur donneurs en état de mort encéphalique. La logistique inhérente à ces prélèvements multi-organes est lourde et le délai entre la récupération et la réimplantation nécessairement court.

Un des espoirs de généralisation de ces reconstructions repose sur la création de banques de tissus cryopréservés. Les greffes, de petite taille et de natures diverses, seront

¹ De son vrai nom Philippe Labarthe (1936-2003)

stockés pour une durée théoriquement infinie et leur utilisation pourra être programmée. Néanmoins, la congélation des tissus composites n'est pas encore maîtrisée et la comparaison des différentes études sur le sujet est perturbée par une très grande disparité méthodologique.

Petit à petit s'est imposée l'idée qu'il était indispensable de disposer d'un modèle d'étude fiable et reproductible afin d'harmoniser les pratiques expérimentales et de faciliter une intégration multicentrique des résultats obtenus par les différentes équipes intéressées par le sujet. L'élaboration de ce modèle animal est présentée dans ce travail.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Les tissus composites

a. Définition

Stricto sensu, un tissu composite est un segment corporel composé d'au moins deux contingents cellulaires différents. Il s'agit d'une définition trop vaste pour être applicable en pratique courante. Afin de ne pas créer de confusion avec la notion d'« organe », l'usage a consacré ce terme à des tissus non vitaux de nature tégumentaire et/ou musculosquelettique. Ils correspondent classiquement à des unités anatomiques, fonctionnelles ou esthétiques et trouvent leur principal intérêt dans le domaine de la chirurgie réparatrice.

b. Utilisation clinique des tissus composites autologues

Considérant ces unités anatomiques comme une réserve de « pièces détachées » utilisables en reconstruction, leurs applications cliniques couvrent un champ colossal, des techniques les plus simples aux plus pointues. Par ordre croissant de difficulté technique, le premier échelon est sans conteste la « greffe composite » (2). Elle est utilisée de façon courante dans les reconstructions partielles de la pyramide nasale, pour des surfaces réduites. Le greffon comporte de la peau, du tissu cellulaire sous-cutané et du cartilage. Il est prélevé aux dépens du pavillon auriculaire. Le site de choix est la racine de l'hélix pour les zones de

réflexion telles que le bord libre des narines ou la face postérieure de la conque pour les surfaces convexes comme la pointe ou les faces latérales. La notion de greffe fait référence à l'absence de revascularisation propre. La survie du greffon est donc dépendante du lit vasculaire sous-jacent, qui peut être amélioré par lambeau d'assistance local, et de la néovascularisation qui se développera à partir de celui-ci.

Lorsque le tissu conserve une vascularisation par un pédicule défini et immédiatement efficace, il est plus juste de parler de transplantation. Le maintien de la continuité de l'axe vasculaire est un domaine à part, on évoque dans ce cas la notion de lambeau pédiculé, le terme de transplantation étant réservé aux tissus dont l'apport sanguin est interrompu avant d'être rétabli par anastomoses microchirurgicales. Lorsque le transplant est prélevé sur le patient, il s'agit d'une « autotransplantation » dans le cadre d'une reconstruction autologue. Cependant, le terme est peu usité, remplacé par celui de « lambeau libre ». Il existe plusieurs catégories de lambeaux libres en fonction de leur complexité. Le concept le plus simple est celui de lambeau cutané ou fascio-cutané, où seuls de la peau, de la graisse et des fascias coexistent. Ensuite, les « lambeaux composites » comportent un autre constituant. Il s'agit le plus souvent de transplants musculo-cutanés ou ostéo-cutanés, voire ostéo-musculo-cutanés. Quand deux (ou plus) unités tissulaires différentes sont prélevées sur le même axe vasculaire, en gardant chacune leur propre pédicule artérioveineux et une mobilité indépendante dans les trois plans de l'espace, elles sont appelées « lambeaux chimères » (3). Leur intérêt est de disposer, en un seul lambeau, de tissus capables de s'adapter à des sites receveurs plus complexes, nécessitant par exemple une couverture multicouche ou un comblement de plusieurs zones distinctes, comme par exemple une perte de substance de la cavité buccale. Parfois, la nature du transplant peut être très complexe et peut correspondre à un regroupement d'unités fonctionnelles homogènes et bien délimitées, dont la définition se

rapproche de celle des organes. C'est notamment le cas des transferts d'orteils utilisés dans la reconstruction des doigts (4).

Dans tous les cas de reconstruction autologue, la transplantation est dite hétérotopique. C'est-à-dire que le transplant est prélevé à un endroit différent de celui qui doit être reconstruit. Il s'agit d'une évidence, mais elle représente un des principaux inconvénients de ces techniques pour deux raisons : les tissus apportés, aussi proches soient-ils de la structure défaillante, ne seront qu'une approximation acceptable de la réalité anatomique, fonctionnelle et esthétique de la région lésée. De plus, ils imposent un prélèvement de tissu sain sur un site donneur choisi, avec des séquelles plus ou moins importantes.

c. Allotransplantation de tissus composites

L'allotransplantation (ou homotransplantation) représente le concept le plus abouti en matière de chirurgie réparatrice car elle permet de réaliser des reconstructions à l'identique et de s'affranchir des séquelles du site donneur, les transplants étant prélevés sur un autre individu. La plupart du temps, il s'agit d'un donneur en état de mort encéphalique, mais, dans certaines rares indications, le transplant est issu d'un donneur vivant. Par exemple dans le cadre de la chirurgie de la main, Guimberteau a prélevé un système fléchisseur complet chez un patient demandeur d'une amputation de l'annulaire pour séquelles douloureuses plusieurs années après un traumatisme grave (5).

L'allotransplantation de tissu composite (ATC), si l'on en croit les textes anciens, est une technique ancestrale (6). En effet, la légende raconte qu'au 3^e siècle après J-C, les jumeaux Saint Côme et Saint Damien, respectivement patrons des chirurgiens et des

pharmaciens, ont miraculeusement guéri un diacre dont la jambe était gangrénée en la remplaçant par celle d'un esclave maure récemment décédé (figure 1). Plus tardivement,



Figure 1 : Le miracle de Saint Côme et Saint Damien, Fra Angelico, vers 1450.

au 16^e siècle, Tagliacozzi utilisa un lambeau cutané brachial, prélevé sur un esclave en échange de sa liberté, pour reconstruire le nez amputé d'un duelliste malheureux. Le lambeau survécut trois ans avant d'être intégralement rejeté le jour du décès de l'affranchi. Grâce aux travaux d'Alexis Carrel, les premières publications fiables sur les ATC datent du début du 20^e siècle. Il formalise la technique d'anastomose vasculaire et introduit la notion de transplantation, qui sera explorée par ses élèves. Il obtient le prix Nobel de médecine en 1912 pour ses avancées dans le domaine de la chirurgie vasculaire. A cette époque, les modèles expérimentaux peuvent être surprenants, à l'image de Guthrie en 1912 qui décrit une transplantation hétérotopique d'une tête de chien entière (7). La tête du chien donneur est anastomosée sur une artère carotide commune et une veine jugulaire externe du receveur qui garde sa propre tête, tel le chien à deux têtes Orthos, terrassé par Hercule. Les muscles et la peau sont suturés. La récupération fonctionnelle de l'extrémité céphalique surnuméraire est partielle : battement de narines et de paupières, réflexes cornéens et photomoteurs, sécrétion

de larmes et de salive et mouvements de déglutition après application de viande fraîche sur la langue...

Même si quelques tentatives infructueuses furent réalisées auparavant, le véritable essor des ATC a débuté avec la mise au point des traitements immunosuppresseurs dans les années soixante. Depuis lors, ces traitements font l'objet de nombreuses études qui ont permis une amélioration constante des protocoles thérapeutiques, notamment grâce à la découverte des propriétés de la ciclosporine dans les années 70. Les ATC quittent le domaine de la recherche en 1964 avec la première allotransplantation de main réalisée en Equateur (8). Malheureusement, le transplant est rejeté malgré les immunosuppresseurs de l'époque et amputé deux semaines plus tard. Ce n'est qu'à la fin des années 80 que les succès se matérialisent grâce à l'équipe bordelaise de Guimberteau qui réalise une allotransplantation de tendon fléchisseur microvascularisé chez deux patients avec des résultats fonctionnels satisfaisants (5). L'aventure continue dix ans plus tard en 97-98 avec une allotransplantation réussie de diaphyse fémorale, puis d'un genou vascularisé (9), du complexe larynx/trachée/thyroïde/parathyroïdes (10) et la première allotransplantation de main par Dubernard à Lyon (11). La même année Jones publie un cas clinique de lambeau de muscle droit de l'abdomen pour reconstruction du scalp (12). Le lambeau est prélevé sur donneur en état de mort encéphalique et il n'y a pas eu de rejet grâce aux immunosuppresseurs que le patient receveur prenait déjà suite à une transplantation rénale. Par la suite, les ATC se développent sans pour autant devenir une technique de routine. D'autres transplantations sont réalisées avec succès dans ces localisations, notamment les voies aériennes supérieures et la main (13). Il n'y a pas d'autre cas publié d'allotransfert hétérotopique de muscle et le suivi à long terme de la série initiale d'ATC ostéo-articulaire s'est avéré décevant avec un taux d'échec à cinq ans de 83 % (14). Outre ceux déjà cités, d'autres sites receveurs ont été concrétisés. Le plus spectaculaire d'entre eux reste sans conteste l'allotransplantation de face

réalisée pour la première fois en 2005 par l'équipe amiénoise de Devauchelle (15). Depuis, ce n'est pas moins de 21 allotransplantations partielles ou totales qui ont été répertoriées à travers le monde (16). Les résultats sont très encourageants : aucune perte de transplant et récupération sensitive rapide. Cependant un cas de décès par obstruction des voies aériennes supérieures est survenu au 65^e jour postopératoire. Pour les autres, la réinnervation motrice reste lente et globalement faible même si quelques cas spectaculaires sont décrits. Un cas controversé de transplantation du scalp et des deux pavillons auriculaires est également publié chez une patiente âgée atteinte d'un mélanome récidivant et métastatique du cuir chevelu (17). Le suivi à quatre mois ne montre pas de signe de rejet sous immunosuppresseurs, mais il serait plus intéressant de connaître l'évolution à long terme sur le plan local mais aussi carcinologique et général. Plusieurs transplantations de paroi abdominale partielles ou totales ont également été relatés (18), en général associées à des transplantations d'intestin grêle. Un unique cas d'allotransplantation de pénis est publié à ce jour par une équipe chinoise (19). Il s'agit d'une reconstruction après amputation traumatique, avec l'aval du comité d'éthique local. Le résultat immédiat est satisfaisant sur le plan morphologique et fonctionnel (reprise des mictions à l'ablation de la sonde vésicale à J10) mais des troubles psychologiques sévères chez le patient et son épouse ont imposé l'ablation du transplant à 14 jours postopératoires.

d. Spécificité des allotransplantations de tissus composites du membre supérieur

C'est dans le domaine de la chirurgie de la main que les ATC sont actuellement le plus réalisées et surtout le mieux connues grâce au Registre International des Transplantations de Main et de Tissus Composites créé en 2002 et mis à jour annuellement (13).

En 2011, mis à part ceux opérés par certaines équipes chinoises qui n'ont pas donné de résultats suffisamment précis, 39 patients ont reçu 57 allotransplants de membres supérieurs. Les receveurs sont majoritairement des hommes jeunes et les amputations sont dues à un traumatisme direct ou une séquelle pour 79 % et à une brûlure thermique ou électrique dans 15 % des cas. Un patient a bénéficié simultanément de transplantations des deux avant-bras et de la face mais il est mort au 65^e jour postopératoire (cf. § 1) c.). Les autres transplants sont constitués à 65 % d'extrémités distales du membre supérieur (au-delà du tiers distal de l'avant-bras, dont un transplant de pouce isolé) tandis que le niveau le plus haut est situé au coude. Le premier patient transplanté est réamputé après deux ans et demi pour inobservance de la rééducation puis du traitement immunosuppresseur ayant conduit au rejet du transplant. Pour un patient, une des deux mains réimplantées est perdue suite à une infection au 45^e jour postopératoire. Un autre transplant est retiré à neuf mois pour oblitération artérielle par hyperplasie intinale à mettre en parallèle avec quatre épisodes de rejets aigus non traités. Sept patients chinois sont régularisés après deux ans pour arrêt du traitement immunosuppresseur en raison du déremboursement des thérapeutiques par la sécurité sociale chinoise après ce délai. Trois transplants sont sauvés par reprise chirurgicale pour thrombose artérielle ou veineuse à J1 et un pour fistules artérioveineuses multiples.

85 % des patients présentent entre un et cinq épisodes de rejet aigu du ou des transplants. Tous ces épisodes sont liés à un défaut d'observance ou une décroissance des doses des immunosuppresseurs en raison des effets indésirables. Ils sont repérés par des signes dermatologiques (macules rosées, papules lichénoïdes, avec ou sans œdème) et confirmés par biopsies cutanées. Quand ils sont pris en charge à temps par traitements locaux et systémiques, les signes sont régressifs et ne mettent pas en danger la survie du transplant. Aucun signe histologique de rejet chronique ni aucune réaction de type « graft versus host » ne sont identifiés à ce jour. Les effets indésirables des immunosuppresseurs sont fréquents

avec 88 % d'infections opportunistes, majoritairement à cytomégalovirus (CMV) et bactéries pyogènes, et 69 % de troubles métaboliques, dominés par l'hyperglycémie. Un cas de maladie sérique due à des anticorps anti-thymocytes est répertorié.

Concernant la réadaptation fonctionnelle, les résultats subjectifs sont meilleurs en cas de transplantation bilatérale, car il n'y a pas de comparaison avec la main native. La récupération sensitive est bonne avec 90 % de sensibilité tactile de protection et 84 % de sensibilité discriminative jugée satisfaisante, chez les patients ayant plus d'un an de suivi. La motricité extrinsèque est rapidement effective, permettant une utilisation de la pince. Les muscles intrinsèques montrent des signes cliniques et électromyographiques d'activité après seulement 9 à 15 mois. Ce délai est corrélé au niveau d'amputation. Les patients qui en bénéficient sont alors capables de pratiquer la majorité des activités de la vie quotidienne et de reprendre le travail. Après quelques mois, l'IRM fonctionnelle montre que la représentation de la main transplantée est enregistrée dans la même aire corticale qu'une main native. Au final, 75 % des patients constatent une amélioration de leur qualité de vie à un an.

2) Cryopréservation

a. Définition

La cryopréservation (ou cryopréserver) est le maintien de tissus biologiques vivants à des températures inférieures à -80°C . La conservation de tissus à températures plus « chaudes » définit la congélation. Les réactions enzymatiques, physicochimiques et autres processus biologiques intra- ou extracellulaires sont progressivement bloqués lors de la descente en température. L'activité enzymatique est ralentie entre 0 et -25°C puis stoppée en deçà de -40°C . Mais ce n'est que vers -130°C que l'intégralité des processus cellulaires est

gelée, autorisant théoriquement une conservation *ad vitam æternam*. Actuellement les températures cibles pour la cryopréservation sont majoritairement celles de l'azote liquide (-196°C) ou des vapeurs d'azote (-150 à -175°C).

b. Physiopathologie

Le franchissement du point de fusion de l'eau contenue dans les tissus provoque sa cristallisation. La valeur de ce seuil dépend entre autres de la concentration en électrolytes du liquide considéré. La formation de cristaux entraîne une augmentation de la concentration de la solution résiduelle et donc une diminution du point de fusion. L'ensemble des phénomènes qui en découlent est appelé « effet de solution ». En dehors de contraintes spécifiques, la matrice cristalline progresse jusqu'à l'équilibre entre le point de fusion de la solution résiduelle et la température du tissu. Néanmoins, il est possible de maintenir de l'eau liquide en dessous du point de fusion grâce au phénomène de « surfusion ». Il s'agit d'un état métastable dont la moindre perturbation (impureté, choc) entraînera la formation et la propagation rapide de glace. L'état de surfusion peut être artificiellement atteint en appliquant des vitesses de décroissance thermique élevées en l'absence d'impureté ou de stimulation mécanique. La progression de la matrice cristalline, que ce soit en condition normale ou en état de surfusion est ralentie voire stoppée par la viscosité de la solution, indépendamment de sa concentration. L'association d'un état de surfusion obtenu par refroidissement brutal et d'un blocage de la cristallisation par augmentation de la viscosité de la solution conduit à la formation d'un état solide non cristallin (ou liquide solide, incapable de couler), appelée « vitrification » (20).

La cristallisation extracellulaire entraîne des dégâts cellulaires par plusieurs mécanismes. Les contraintes mécaniques sont modélisées par une séquestration des cellules et

du liquide résiduel dans des tunnels dont le diamètre diminue en même temps que la température (21). Cet effet produit une déformation extrinsèque des cellules jusqu'à la rupture irréversible de leurs constituants pariétaux. Cette rupture sera d'autant plus précoce que l'effet de solution du liquide extracellulaire en cours de cristallisation en modifie la concentration ionique et le pH qui deviennent délétères pour les protéines et complexes lipoprotéiques de la membrane. Toujours par le biais de l'effet de solution, le gradient de concentration va entraîner une déshydratation cellulaire par afflux ionique et déplétion hydrique dans le cytoplasme de la cellule. Cet échange est aggravé par la modification avec le froid du coefficient de perméabilité de la paroi cellulaire qui perd sa sélectivité (22). La matrice extracellulaire elle-même subit les assauts de la cristallisation. Les quantités de collagène, d'élastine et de desmosine restent équivalentes à l'état frais mais la structure et l'agencement de ces fibres (surtout le collagène et l'élastine) sont quasi complètement détruits. Il en résulte un aspect de fragmentation des tissus en microscopie optique et une disjonction des cellules qui diminue fortement leur capacité à interagir (23).

La déshydratation cellulaire n'est pas le seul préjudice induit dans le milieu intracellulaire par les modifications extracellulaires. La formation de glace dans la matrice extracellulaire est impliquée dans la cristallisation du milieu intracellulaire. Sa progression est proportionnelle à la déshydratation cellulaire (24). En plus de l'effet de solution, la glace intracellulaire aura pour conséquence une déformation mécanique irréversible de la structure cytoplasmique et des organites cellulaires incompatible avec la survie de la cellule après réchauffement. Indépendamment de la formation de cristaux de glace, la baisse de la température entraîne des lésions de « choc thermique » proportionnelles à la vitesse de cette diminution. Elles seraient dues à un différentiel de contraction des constituants de la membrane cellulaire. Dans certaines conditions, notamment la vitrification, la cristallisation intracellulaire peut apparaître lors du réchauffement lent par phénomène de « nucléation » :

les cristaux épars et instables qui étaient bloqués par la viscosité du milieu vont s'agglutiner lors de la phase de croissance thermique en raison de la dilution intracellulaire provoquée par la fonte de la glace extracellulaire (25).

c. Cryoprotecteurs

Les dégâts occasionnés par la formation de cristaux de glace sont nettement atténués par l'utilisation de substances cryoprotectrices. Elles ont été découvertes fortuitement en 1949 par l'étude de la survie des spermatozoïdes de poulet préalablement congelés à -70°C avec du glycérol (26).

De nos jours, il existe deux grandes classes de cryoprotecteurs :

- Diffusibles ou intracellulaires, les plus utilisés, ils traversent la membrane cellulaire en raison de leur faible poids moléculaire : diméthylsulfoxyde (DMSO), glycérol, propanediol, ...
- Non diffusibles ou extracellulaires, le plus souvent utilisés en association avec un cryoprotecteur diffusible : tréhalose, polyéthylène glycol (PEG), hydroxyéthyl starch (HES), polyvinylpyrrolidone (PVP), ...

Leur mécanisme d'action n'est pas parfaitement élucidé. Ils protègent les cellules par des liaisons non covalentes avec les molécules d'eau permettant de diminuer le point de fusion de la solution. Ils se comportent également en solvant pour les électrolytes extracellulaires et diminuent de ce fait l'effet de solution. Leur viscosité perturbe la progression de la matrice cristalline, que ce soit en extra- ou en intracellulaire (pour les molécules diffusibles). Certains comme le DMSO auraient un rôle protecteur direct sur la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques (27).

L'utilisation de cryoprotecteurs est un compromis entre l'effet bénéfique de la molécule et sa toxicité. Un apport trop brutal du protecteur peut, en plus de son éventuelle toxicité directe, générer des phénomènes de choc osmotique (28). Paradoxalement, le risque de déshydratation cellulaire est important par appel d'eau vers le milieu extracellulaire avant que la molécule n'ait eu le temps de diffuser à travers la paroi. Une fois dans la cellule, l'effet s'inverse avec un risque de surcharge hydrique et de formation de cristaux de glace intracellulaires. Ces phénomènes de nature osmotique sont considérablement réduits par une mise en contact progressive du tissu et du cryoprotecteur. Concrètement, celui-ci est administré par paliers de dilution décroissante du bain extracellulaire ou du liquide de rinçage dans le cas d'un organe avec pédicule vasculaire. Par ailleurs, la toxicité directe de la molécule ne s'exprime que lorsque les processus biologiques et physicochimiques sont encore possibles. Il est donc envisageable de la limiter en diminuant le temps de contact à température ambiante.

d. Lésions d'ischémie-reperfusion

Les dommages occasionnés par la formation de glace ne sont pas la seule cause de mort cellulaire. Les lésions d'ischémie-reperfusion sont également redoutables. Elles ne sont pas spécifiques de la cryopréservation : ses effets sont visibles en cas d'ischémie prolongée (transplantation d'organe frais, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral) ou de traumatisme sévère (de l'abdomen surtout mais également du thorax ou des membres).

La physiopathologie découle de phénomènes biochimiques et immunologiques (29). D'un point de vue biochimique, la baisse de production d'ATP induite par l'ischémie provoque d'une part une augmentation du calcium intracellulaire par perturbation des pompes électrolytiques membranaires et d'autre part une diminution du pH liée à la production

d'acide lactique par la glycolyse anaérobie. Ces deux mécanismes induisent de façon synergique une destruction des organites intracytoplasmiques comme les lysosomes et les mitochondries. Les enzymes lytiques libérées provoquent une protéolyse du cytosquelette et une peroxydation des phospholipides membranaires. Les radicaux libres (anion superoxyde O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2) ainsi formés entraînent une dénaturation de l'ADN et aggravent la destruction des constituants cellulaires déjà mis à mal. Lors de la phase de reperfusion, la reprise de la phosphorylation oxydative et l'afflux massif d'oxygène dans la cellule augmente transitoirement la production de radicaux libres.

Pour ce qui est des aspects immunologiques, le stress cellulaire et les lésions intracytoplasmiques provoquées par l'ischémie entraînent l'expression membranaire de protéines contenues normalement dans les organites. Après reperfusion, des autoanticorps naturels vont s'y fixer et déclencher la cascade d'activation du complément. Il en résulte un recrutement des polynucléaires neutrophiles qui vont s'attaquer aux cellules déjà lésées en libérant massivement des radicaux libres.

A l'échelle cellulaire, le résultat est une mort par apoptose lorsque les dégâts sur les mitochondries surviennent progressivement (30) ou par nécrose quand les modifications sont brutales. L'ensemble réalise un cercle vicieux (lésions intracellulaires → production de radicaux libres → majoration des lésions → mort cellulaire → extension aux cellules voisines) dès la phase d'ischémie avec un emballement du processus lors de la reperfusion car la plus grande partie des radicaux libres est produite par l'activation des leucocytes après restauration de l'afflux sanguin.

A l'échelle macroscopique, les dégâts peuvent toucher tous les organes, mais ils s'expriment différemment en fonction de la fragilité des tissus. Dans le cadre de la cryopréservation des tissus composites, le facteur limitant de l'ischémie-reperfusion est la

survie des vaisseaux car les autres contingents cellulaires sont plus robustes. La physiopathologie des lésions vasculaires est un peu différente (31). Au niveau des artéroles, la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) est diminuée, entraînant un déficit de vasodilatation, et l'activation du complément donne des lésions endothéliales qui provoquent une thrombose rapidement extensive. Dans les veinules, la diapédèse massive des neutrophiles et les lésions de l'endothélium dues aux radicaux libres augmentent la perméabilité pariétale, l'œdème extracellulaire et la gêne au retour de l'afflux sanguin qui majore le risque thrombotique en amont. La conséquence de ces lésions vasculaires liés à l'ischémie-reperfusion sont connues sont le nom de phénomène de « non-reperfusion ».

e. Applications pratiques

Nous avons vu qu'un grand nombre de paramètres doivent être combinés pour aboutir à un protocole de cryopréservation optimal : température cible, vitesses de refroidissement et de réchauffement, choix du cryoprotecteur, de sa concentration et de ses modalités d'administration. L'élaboration de tels protocoles nécessite un effort de recherche considérable comme en témoignent les très nombreuses publications à ce sujet. Les avancées les plus significatives coïncident avec l'utilisation de formules mathématiques qui permettent de modéliser les réponses de contingents cellulaires spécifiques à la baisse de température (24). Ces équations dépendent de la répartition des constituants pariétaux et cytoplasmiques et ne sont donc valables que pour des lignées cellulaires homogènes.

En pratique clinique, ce sont sans conteste la biologie de la reproduction et l'hématologie qui ont le plus bénéficié des progrès de la cryopréservation, avec le stockage en routine des gamètes et des embryons dans l'azote liquide, mais également des produits dérivés du sang, dont les plasmas frais congelés. Cependant, les banques de tissus sont à l'heure

actuelle en mesure de conserver d'autres tissus, comme de la peau (greffes minces), de l'os (congelé ou lyophilisé) et dans une moindre mesure des vaisseaux, des valves cardiaques, des tendons, du cartilage ou des cornées (32).

f. Immunité et cryopréservation

Plusieurs études suggèrent un effet immunomodulateur de la cryopréservation. Celui-ci a été évalué sur des valves cardiaques de rats et sur des greffes dermoépidermiques humaines (33,34). De façon indirecte, Hirasé démontre aussi la bonne tolérance des greffes cutanées cryopréservées avec survie à six mois malgré une apposition sur des rats présentant le plus de différences possibles du complexe majeur d'histocompatibilité (35). Le nombre de cellules immunitaires du donneur dans le greffon n'étant pas corrélé à l'intensité de la réponse du receveur, l'hypothèse d'une altération des capacités immunogènes des cellules semble la plus probable (36). Wingefeld a également prouvé l'immunomodulation de tissu ostéocartilagineux cryopréservé et a montré que cet effet est majoré par l'adjonction de DMSO (37). D'autres travaux abondent dans ce sens. En effet, des tissus sont réimplantés sur un autre individu sans traitement immunosuppresseur (38–40), il s'agit de greffons plutôt que de transplants et les tissus employés sont réputés faiblement immunogènes : trachées, vaisseaux, nerfs (41). Néanmoins, aucun signe de rejet n'a été rapporté.

3) Cryopréservation des tissus composites

a. Intérêt clinique

Même si les possibilités offertes par l'aboutissement des travaux de cryopréservation des tissus composites sont immenses, trois disciplines sont à l'heure actuelle particulièrement concernées par le sujet : la gynécologie, la chirurgie dentofaciale et la chirurgie reconstructrice.

Dans le domaine de la gynécologie, la conservation des gamètes ou des embryons des patients atteints de cancers dont le traitement va induire une stérilité ne semble plus suffisante. L'autogreffe non vascularisée de tissu ovarien (ortho- ou hétérotopique) est une technique utilisée par quelques centres et donne des résultats en retrait par rapport aux attentes des praticiens (42). Le stock de follicules primaires est limité par la taille de l'échantillon et par les dégâts occasionnés lors de la cryopréservation. De plus, la reprise de la fertilité n'est pas systématique, comme en témoigne la publication de seulement onze grossesses depuis l'avènement de la technique. La prochaine étape dans la restauration de la fertilité pour ces personnes sera l'auto- voire l'allotransplantation de gonades entières cryopréservées et micro-revascularisées. Yin publie une étude intéressante sur la cryopréservation des gonades mâles et femelles chez le rat (43). Si aucun testicule ne montre de signe de spermatogénèse, quatre ovaires sur sept sont fonctionnels à 60 jours. La fonction endocrine est diminuée par rapport au groupe contrôle mais reste compatible avec des ovulations normales et une gestation est même constatée sur une des rattes. Les études chez la brebis sont moins concluantes : entre 20 et 38% des transplants permettent une reprise de l'activité endocrinienne et on note la perte de quasiment tous les follicules primaires (44,45).

La cryopréservation des tissus composites est également très étudiée par les dentistes et chirurgiens maxillo-faciaux. De nombreuses publications s'intéressent à la congélation des dents dans l'idée de créer des banques de dents. Les essais chez le rat montrent une régénération pulpaire et une production de dentine sur des dents cryopréservées et greffées dans le tissu sous-cutané (46–48). Les études in vitro sur des dents humaines montrent également des signes de vitalité sur les dents décongelées mais une moins bonne résistance mécanique qu'une dent fraîche (49).

La troisième spécialité assurant une recherche active sur le sujet est la chirurgie reconstructrice. Les publications répertoriées sont détaillées plus bas (cf. § 3) b.). De façon plus marginales, d'autres tissus cryopréservés sont transplantés avec succès chez l'animal. Il s'agit de transplants trachéaux utilisés pour la reconstruction de la trachée chez le lapin (38) ou de l'œsophage chez le chien (40). Hirase a également testé la congélation d'artères, de veines et de nerfs chez le singe. Les résultats montrent un flux normal pour l'artère, une bonne réinnervation des segments nerveux mais une oblitération des greffons veineux (39).

b. Enjeux dans le domaine de la chirurgie réparatrice

Actuellement, les applications de la cryopréservation des tissus composites dans le cadre de la chirurgie plastique et reconstructrice se projettent dans le cercle restreint de la chirurgie de la main. En effet, depuis l'amélioration des traitements immuno-suppresseurs nous savons que la création de banques de segments digitaux ne dépend que de la maîtrise du stockage des tissus composites (50). Ces segments pourront être des appareils fléchisseurs de doigts longs comme ceux utilisés dans l'étude de Guimberteau, mais les travaux expérimentaux montrent la possibilité de prélever, avec leurs axes vasculaires, des appareils extenseurs associés aux articulations métacarpophalangiennes (MCP) et interphalangiennes

proximales (IPP) (50). A l'instar de la technique du « doigt banque », il est également possible de prélever en îlot vasculaire les articulations MCP, IPP voire interphalangiennes distales (51).

Peu d'études s'intéressent à la cryopréservation des tissus composites (tableau 1). On en dénombre sept dont une série de cas cliniques sur patients humains et six protocoles expérimentaux chez l'animal.

Le premier essai remonte à 1985 et est réalisé par l'équipe chinoise de Huang chez l'Homme (52). Une série de dix patients a bénéficié d'une reconstruction du pouce par une allogreffe monobloc congelée à -34°C à l'état frais, incluant les phalanges et les articulations adjacentes ainsi que les tendons. La nutrition du greffon est assurée grâce à la couverture par un lambeau libre neurocutané prélevé aux dépens du pied et du gros orteil. En fait la congélation est plutôt une astuce pour diminuer l'immunogénicité du greffon plutôt qu'une méthode de stockage à long terme. Malgré une déminéralisation osseuse et une destruction partielle des structures cartilagineuses, les résultats fonctionnels sont jugés satisfaisants. L'auteur évoque un essai préliminaire avec anastomoses microchirurgicales d'allotransplants congelés avec des résultats décevants (thromboses, aspect congestif, trouble de l'architecture osseuse). Cependant, l'article est très peu détaillé et souffre de ses nombreuses imprécisions, notamment concernant l'étude préliminaire, la technique opératoire, les modalités de conservation et le suivi.

Peu de temps après, en 1986, des essais de conservation de lambeaux inguinaux à -80°C sont effectués par Dubert à Paris (53). Des rats issus de souches syngéniques (également appelées souches Inbred) sont utilisés pour éviter les phénomènes de rejet à long terme. Le cryoprotecteur est le DMSO. Malgré un taux d'échec de 80%, certains transplants restent viables à deux mois. Cependant, la survie des lambeaux permet de constater un phénomène de

rétraction cutanée comparable à celui des cicatrices de brûlures, malgré une vascularisation effective. L'absence de prélèvement histologique ne permet pas d'avancer d'hypothèse pour tenter de comprendre cette manifestation.

Hirase étudie, en 1993, la survie de lambeaux cutanés épigastriques superficiels cryopréservés en azote liquide chez le rat (35). Le cryoprotecteur est la glycérine. Les allotransplants sont réimplantés en site orthotopique dans un groupe et en hétérotopique dans un autre groupe : le lambeau sert alors de couverture à une réimplantation de membre postérieur dépecé fraîchement amputé et le tronçon fémoral du pédicule du lambeau est utilisé en pontage du membre. Les résultats montrent une bonne intégration à long terme avec administration d'immunosuppresseurs (Tacrolimus). Dans le premier groupe, 90 % des lambeaux sont vivants à deux mois et dans le deuxième, ce sont 80 % des lambeaux et des membres réimplantés qui survivent. Les auteurs envisagent un concept de banque de lambeaux cutanés cryopréservés. Ils formulent l'hypothèse que le caractère fortement immunogène de la peau provient de ses couches les plus superficielles où la concentration en cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigènes) est la plus importante. Selon cette hypothèse, ils proposent un allègement voire une absence de traitement immunosuppresseur en remplaçant l'épiderme de l'allotransplant cryopréservé par une greffe de peau mince ou une culture de kératinocytes autologue.

En 1995, l'équipe américaine de Buncke teste la cryopréservation en azote liquide de genoux vascularisés de rats (54). Ils sont réimplantés de façon hétérotopique en sous-cutané dans le pli inguinal, sur des souches syngéniques. Le cryoprotecteur est une association de glycérol et de DMSO. 67% des transplants sont vivants à une semaine (objectif primaire) et l'étude histologique montre une bonne préservation de l'architecture des matrices osseuses et cartilagineuses malgré une diminution du nombre d'ostéocytes et de chondrocytes. L'endothélium des capillaires semble endommagé par endroits avec présence de zones

d'infarctissement. Cependant, en cas de survie, la vascularisation macroscopique et la viabilité de l'ensemble des tissus sont correctes. Les résultats sont nettement meilleurs dans les groupes recevant en postopératoire un traitement adjuvant par antibiotique, corticoïdes et héparine, suggérant le rôle physiopathologique important des lésions d'ischémie-reperfusion.

La même équipe publie, en 1998, une étude plus vaste chez le rat. Le but est de comprendre les réactions des différents constituants de structures composites complexes (55). Plusieurs types de tissus sont conservés dans l'azote liquide à -196°C puis transplantés sur des animaux syngéniques. Les prélèvements utilisés sont des artères et des veines fémorales, des lambeaux musculaires de gracilis, des lambeaux cutanés inguinaux et des queues. Le cryoprotecteur est identique (glycérol + DMSO). Les segments vasculaires sont greffés en pontage sur des lambeaux inguinaux prélevés aux dépens du receveur afin d'évaluer leur récupération fonctionnelle. Les autres tissus sont transplantés de façon orthotopique. Tous les greffons vasculaires sont fonctionnels comme en témoigne la survie des lambeaux autologues qu'ils irriguent. Cependant des lésions endothéliales sévères apparaissent dès la revascularisation et jusqu'un mois après. La réparation de ces lésions est effective à deux mois. Par contre, aucun des véritables transplants composites n'a survécu. Après confrontation à leurs premiers résultats, l'hypothèse des auteurs est qu'il existe un effet de seuil dans la détérioration des structures capillaires au-delà duquel la réparation de l'endothélium n'est pas suffisamment rapide pour permettre la survie des tissus.

En 2007, Rinker et son équipe (56) congèlent des lambeaux cutanés épigastriques superficiels de rats. Après préservation à -196°C , ils sont transplantés sur individus syngéniques. Deux groupes contrôles sont utilisés, un avec transplantation à l'état frais et un après rinçage avec le cryoprotecteur. Tous les lambeaux contrôles survivent jusqu'à 60 jours (terme de l'étude), démontrant que la mise en contact avec le protecteur ne suffit pas à provoquer l'échec de la transplantation. Parmi les lambeaux congelés, les cryoprotecteurs sont

soit le DMSO seul, soit une association de DMSO et de glycérol, soit une association de DMSO et de tréhalose (cryoprotecteur non diffusible). Aucun des lambeaux des deux premiers groupes n'a survécu à la fin de la première semaine. Dans le dernier groupe, un rat sur huit a conservé son lambeau jusqu'au 60^e jour avec une repousse des poils sur le transplant. Un autre a survécu jusqu'au 13^e jour avant nécrose complète et soudaine. Ces résultats suggèrent la supériorité de l'association de cryoprotecteurs intra- et extracellulaires pour les tissus composites.

La même année, Guimberteau réalise la première xénotransplantation de tissus composites cryopréservés (57). Des doigts humains sont prélevés chez des patients soit en demande de régularisation pour déficit fonctionnel après traumatisme, soit après amputation avec fragment non réimplantable. Après conservation à -196°C dans du DMSO, ils sont transplantés sur les vaisseaux cervicaux de lapins. Contrairement aux autres études, une prévention des phénomènes de non-reperfusion est administrée. Le mélange, en perfusion continue pendant toute la durée de l'étude, est constitué d'un fibrinolytique (Streptokinase), d'un anticoagulant (Héparine) et d'un vasodilatateur (Lidocaïne). Trois doigts sont réimplantés avec un objectif initial de survie à sept jours. Un lapin est mort dans les suites opératoires, un autre a perdu son doigt par thrombose artérielle à J1, peut-être à cause de la perte accidentelle de la perfusion dans la première nuit postopératoire. Le troisième animal est mort à cinq jours de cause inconnue. L'étude histologique de ce transplant révèle une bonne architecture des différents tissus, en dehors d'une épidermolyse prévisible, et surtout l'absence de lésion endothéliale et de thrombose, y compris au niveau des capillaires. Le rôle des traitements adjuvants dans le succès des allotransplantations cryopréservés mérite d'être approfondi.

Tableau 1 : Revue de la littérature des différents modèles expérimentaux sur la cryopréservation de tissus composites dans le domaine de la chirurgie réparatrice.

Auteur	Année	Espèce	Transplant	Site receveur	Immuno-suppr	Température cible	Durée de surveillance
Huang	1985	Homme	Complexe ostéotendineux pouce, greffe potentialisée	Orthotopique	Non	-34°C	Non défini
Dubert	1986	Rat	Lambeau cutané inguinal	Orthotopique	Souches Inbred	-80°C	60 jours
Hirasé	1993	Rat	Lambeau cutané épigastrique	Orthotopique et membre post	Oui	-196°C	60 jours
Meuli-Simmen	1995	Rat	Genou	Inguinal	Souches Inbred	-196°C	7 jours
Zhang	1998	Rat	Lambeau musculaire de gracilis, lambeaux cutanés inguinaux, queues	Orthotopique	Souches Inbred	-196°C	3 (muscle), 5 jours (peau, queue)
Cui	2007	Rat	Lambeaux cutanés épigastriques	Orthotopique	Souches Inbred	-196°C	60 jours
Guimberteau	2007	Lapin	Doigts humains	Vaisseaux cervicaux	Non	-196°C	7 jours

4) Intérêt de la mise au point d'un modèle d'étude

Les modèles animaux pour les ATC sont très nombreux. Il est possible de distinguer différentes catégories d'études en la matière.

Les modèles de faisabilité : non superposables, ils doivent se rapprocher au plus près du projet définitif. En l'absence de modèle parfait, les expériences doivent être répétées chez plusieurs espèces animales pour envisager plusieurs configurations et anticiper les variations inter-espèces. En général, les études préliminaires sont réalisées chez les petites espèces (58,59) comme les rongeurs et les projets plus aboutis s'intéressent rapidement aux animaux plus grands (60–62).

Les modèles d'étude des protocoles immunosuppresseurs : les plus nombreux, ils constituent l'effort de recherche prépondérant dans le domaine des ATC. Les procédures expérimentales, notamment le choix des tissus transplantés, sont éventuellement adaptées à un objectif bien déterminé. La plupart des publications utilisent des rongeurs dont la maîtrise des phénomènes de rejet semble quasiment acquise (63–66). La multiplicité des stratégies employées a pour conséquence l'émergence d'études dont l'unique but est l'évaluation des modèles publiés (67). Il apparaît que les efforts doivent être concentrés sur la réponse immunitaire des grands animaux, en particulier chez le porc (68–72).

Les modèles d'étude de la cryopréservation : sous-représentés, on ne dénombre que sept études, dont seulement six sont publiées (cf. § 3) b.). Si l'espèce majoritaire est le rat, c'est bien la seule similitude entre les publications. Les variations sont importantes concernant le choix de transplant, la gestion du rejet immunologique, le site receveur et la durée de surveillance (tableau 1).

Pour les tissus composites, l'étude de la cryopréservation ne peut pas pour l'instant faire appel aux modélisations mathématiques. En effet, la complexité des formules utilisées pour simuler la réponse de contingents monocellulaires isolés est telle qu'il est impossible de proposer des outils théoriques fiables qui prendraient en compte d'une part chacun des types cellulaires présents et d'autre part les interactions entre ces différentes cellules. L'élaboration de protocoles acceptables sera donc nécessairement le fruit d'une progression à tâtons, faite d'échec et de succès. Certaines tendances semblent se détacher de l'analyse des quelques publications disponibles, comme l'instillation concomitante de cryoprotecteurs diffusibles et non diffusibles (35,56) ou l'utilisation adjuvante de traitements antithrombotiques au sens large (57). Mais la relative nouveauté de ce champ d'exploration entraîne un manque de concertation entre les intervenants, même si des efforts sont faits en la matière avec entre autre une table ronde internationale organisée en juin 2012 lors du congrès de la SOFCPRE² à Bordeaux. Un des moyens de diminuer la somme de travail sur ce sujet est de disposer d'un schéma expérimental solide et fiable qui servirait de base commune à plusieurs équipes dont chacune pourrait étudier la variation d'un facteur.

C'est précisément cet aspect du problème que nous envisageons en proposant un modèle d'étude animal de la cryopréservation des tissus composites applicable à la création d'une banque de segments digitaux.

² Société Française de Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique

PARTIE EXPERIMENTALE

1) Postulat de départ

a. Cahier des charges du modèle

La phase de réflexion pré-expérimentale a permis de mettre au point la base de travail concernant le modèle. Les impératifs techniques et logistiques du protocole concernent :

1. Le choix des animaux

- Espèce animale facilement disponible.
- Robuste.
- Taille et poids suffisants pour avoir des vaisseaux de gros calibre.
- Coût limité.

2. Le choix du transplant

- Tissus prélevés correspondant à ceux des transplants qui seront utilisés *in fine* chez l'Homme : os, tendons et ligaments, muscles, cartilage et membrane synoviale, vaisseaux, nerfs, peau.
- Système clos pour permettre le rinçage efficace du transplant qui sera mis en évidence par un retour veineux clair.
- Pédicule vasculaire unique autorisant un rinçage facile et une réimplantation relativement rapide.

- Calibre des vaisseaux du pédicule comparable à des artères de doigt.
- Surveillance possible sur des critères morphologiques macroscopiques et microscopiques.
- Taille limitée pour permettre un conditionnement compatible avec les méthodes de cryopréservation actuelles.

3. Le choix du site receveur

- Facilité d'accès.
- Vaisseaux receveurs de calibres équivalents à ceux des vaisseaux du transplant.
- Surveillance facile en limitant la contention de l'animal et en évitant les manipulations douloureuses.
- Absence de retentissement sur la vie de relation de l'animal.
- Prévention des automutilations.

4. Organisation

- Interposition facile de la phase de cryopréservation.
- Protocole réalisable par un seul opérateur.
- Prévention des hétéromutilations.
- Matériel standard et peu coûteux.

b. Choix des animaux

Le choix de l'espèce animale s'est rapidement porté sur le rat (*Rattus norvegicus*). Il s'agit d'un animal particulièrement répandu en expérimentation animale, dont la physiologie est bien connue. Sa robustesse et sa relative indépendance vis-à-vis des conditions de captivité ont également influé sur le choix. La stabulation est facile et requiert peu de moyens. Les rats

sont de race Sprague-Dawley. Ce sont des rats albinos, consanguins de type Outbred, donc non syngéniques. Le poids à l'âge adulte atteint 600 grammes pour les mâles et 450 grammes pour les femelles. Ils ont été préférés aux classiques rats Wistar pour leur caractère plus docile, leur meilleure adaptation à la captivité, leur coût inférieur et pour leur plus grande facilité de reproduction. Les souches Inbred ou syngéniques sont intéressantes car la similitude des génomes entre les individus permet de s'affranchir de la variable immunocompatibilité. Cependant, la consanguinité poussée à l'extrême de ce type de souche (une souche est considérée Inbred lorsqu'elle provient d'un croisement entre frère et sœur depuis plus de 20 générations) donne des individus de petite taille qui atteignent difficilement les 300 grammes pour les mâles et 200 grammes pour les femelles. De plus leur coût est très élevé et la maîtrise de la reproduction nécessite des infrastructures spécifiques.

Initialement, seuls les rats mâles sont sélectionnés pour l'étude. L'idée de départ était de choisir les rats les plus grands possibles afin de maximiser la taille des vaisseaux et la longueur du pédicule vasculaire. Le poids minimal est arbitrairement fixé à 500 grammes au début de l'étude, ce qui correspond à des animaux de plus de 12 semaines.

c. Choix du transplant

En tenant compte des prérequis (cf.§ 1) a.), le transplant est nécessairement un segment de membre. Le membre postérieur a été choisi en raison de la plus grande facilité de dissection par rapport au membre antérieur et de la plus grande longueur de pédicule disponible. Celui-ci est constitué par les vaisseaux iliaques primitifs. La dissection s'arrête au ras de l'aorte terminale et de la veine cave caudale. En effet, les vaisseaux fémoraux prélevés au ras du ligament inguinal sont de calibre correct mais ne donnent pas suffisamment de longueur de pédicule pour autoriser un branchement adéquat. La partie charnue du transplant

est représentée par la jambe et le pied. Le prélèvement est réalisé par désarticulation au niveau du genou. Les masses musculaires de la jambe sont conservées.

d. Choix du site receveur

La réimplantation orthotopique permet d'étudier la survie des tissus et la restauration des fonctions grâce aux anastomoses nerveuses et au rétablissement de la continuité osseuse et musculaire. Mais cette option n'a pas été retenue car elle aurait imposé une amputation de membre sain et un alourdissement du protocole chirurgical. La surveillance aurait dû être prolongée le temps de la repousse nerveuse, ce qui aurait rendu obligatoire un protocole d'immunosuppression. Le transplant serait devenu gênant pour l'animal avec risque d'automutilation.

Le site choisi est donc le cou. Les anastomoses sont réalisées au niveau ventral sur l'artère carotide commune et la veine jugulaire externe. Le transplant est fixé en position dorsale grâce à la longueur du pédicule, hors de portée de la morsure du rat. Les vaisseaux du cou sont de calibre comparable aux vaisseaux iliaques primitifs. Le pied sera fixé à la jambe afin de limiter les mouvements intempestifs et de ne pas retomber dans le champ de vision.

2) Etude préliminaire radio-anatomique

a. Protocole

Le but de cette étape est de vérifier une partie du postulat de départ avant étude sur sujet vivant. Quatre rats sont sacrifiés pour être disséqués. Les zones d'intérêt sont la région

du membre postérieur et son environnement vasculaire ainsi que la région cervicale pour le site de fixation du transplant et la zone des anastomoses.

Deux rats bénéficient d'une IRM en pondérations T1, T2 et séquence de flux. Les acquisitions sont réalisées sur un appareil de micro-IRM (figure 2) de puissance 7 Tesla (BRUKER® BioSpec 70/20 USR, Laboratoire d'imagerie du vivant, Lille). Le premier rat est passé sous anesthésie générale sans préparation et le deuxième après euthanasie et injection d'un mélange d'eau, de gélatine colorée et de Gadolinium à 10 %. Le transplant de membre postérieur est ensuite prélevé et placé en position cervicale telle qu'elle a été définie lors de la phase préclinique. Les acquisitions sont alors réalisées. Les séquences de flux montrent avec précision la vascularisation des deux régions d'intérêt, notamment grâce à la mise en évidence de la composante dynamique des tissus. Les pondérations T1 et T2 permettent l'étude de la musculature. Les images sont traitées grâce au logiciel OsiriX v3.9.4.

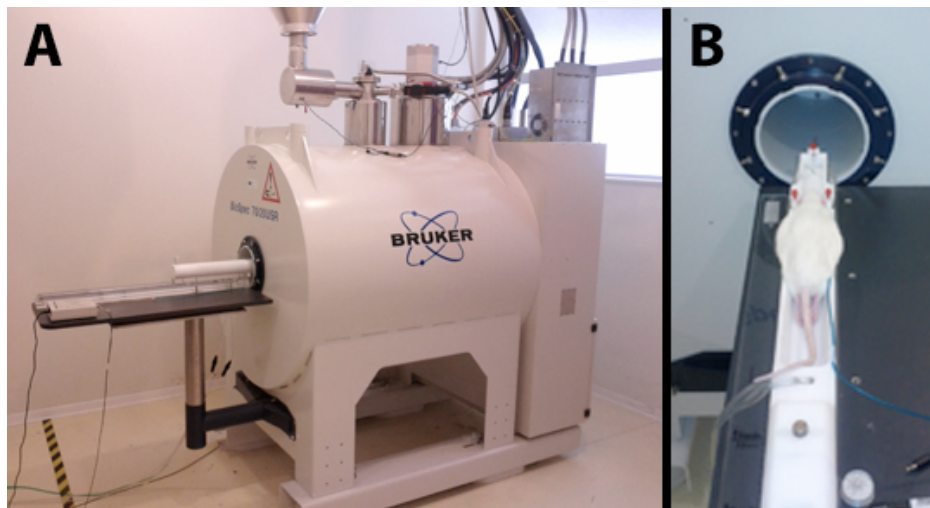


Figure 2 : Micro-IRM 7 Tesla. A : vue d'ensemble. B : lit et tunnel de chargement.

b. Membre postérieur

Le rat étant un mammifère, il présente de nombreuses similitudes anatomiques avec l'espèce humaine. Mais il est important de souligner certaines particularités.

La terminaison de l'aorte et de la veine cave caudale est une double bifurcation, d'abord en iliaque primitif droit et gauche puis, de chaque côté, en iliaque interne et externe. A l'endroit de ce deuxième carrefour, l'artère iliaque primitive donne une ou deux autres artérioles de calibre modeste tandis que la veine recueille beaucoup plus de petites collatérales. On en dénombre entre trois et sept, réparties en amont du carrefour, sur la veine iliaque primitive, et en aval, sur la veine iliaque externe. Aucune collatérale ne rejoint la veine iliaque interne à proximité immédiate de la bifurcation. Les vaisseaux iliaques externes cheminent jusqu'au ligament inguinal qu'ils franchissent après avoir donné le pédicule épigastrique inférieur profond que l'on suit par transparence dans la paroi abdominale ; ils deviennent alors les vaisseaux fémoraux. L'émergence des vaisseaux épigastriques superficiels est relativement éloignée du ligament inguinal et se fait par un tronc commun avec l'artère et la veine pudendales externes, qui partent en interne pour rejoindre la région pelvienne. L'artère profonde de la cuisse est de petit calibre, elle n'est d'ailleurs pas toujours individualisable parmi les autres branches à destinée musculaire. Au moment de plonger vers le canal du grand adducteur à la jonction du tiers moyen et du tiers distal de la cuisse, la veine fémorale donne la veine saphène interne qui est accompagnée d'une artère éponyme de diamètre quasi-équivalent à l'artère poplitée (figure 3). Le pédicule ainsi formé chemine à la superficie de la face médiale du genou et de la jambe et semble jouer un rôle important dans sa vascularisation. Une fois à la face postérieure de l'extrémité distale du fémur, l'artère poplitée donne de nombreuses collatérales à destinée périarticulaire avant de se diviser, caudalement à l'extrémité proximale du tibia, en artères tibiale antérieure, tibiale postérieure et fibulaire (figure 4). Sur l'ensemble de l'arbre vasculaire décrit, les artères sont situées latéralement aux veines.

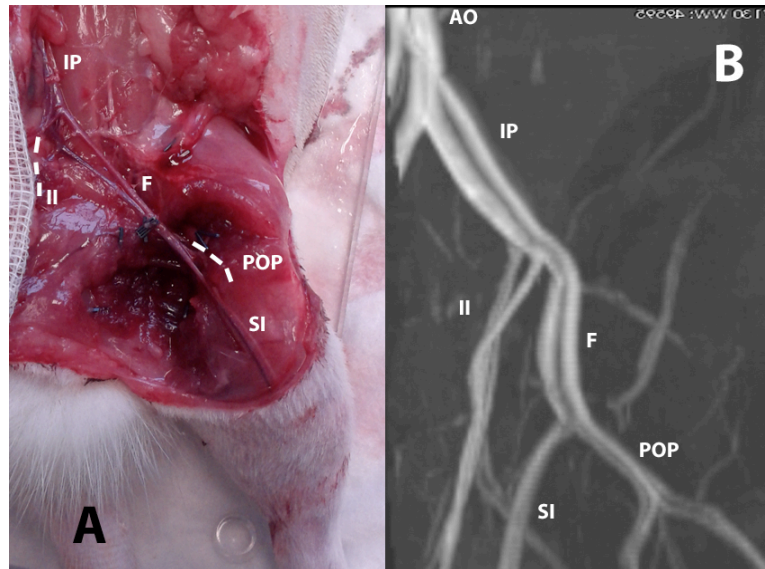


Figure 3 : Etude de la corrélation radioanatomique de la vascularisation du membre postérieur chez le rat. A : vue ventrale peropratoire. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). Vaisseaux AO : aorte, IP : iliaques primitifs, II : iliaque internes, F : fémoraux, POP : poplités, SI : saphènes internes.

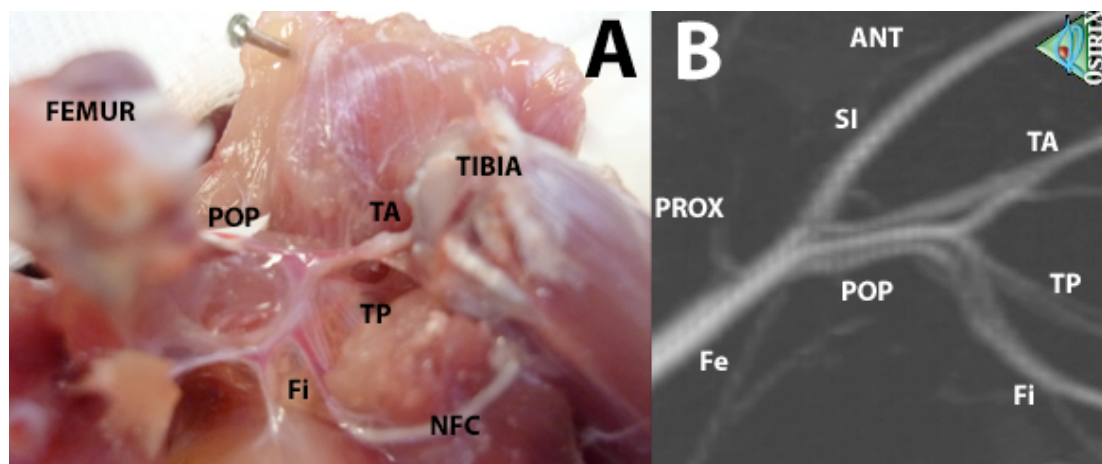


Figure 4 : Trifurcation des vaisseaux poplités chez le rat. A : vue latérale sur cadavre, genou disjoint. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). Vaisseaux Fe : fémoraux, SI : saphènes internes, POP : poplités, TA : tibiaux antérieurs, TP : tibiaux postérieurs, Fi : fibulaires. NFC : nerf fibulaire commun.

En raison de l'appui quadripodal du rat, la disposition des muscles de la cuisse est assez déconcertante pour qui est plus habitué à l'anatomie humaine. A la partie latérale, on remarque que l'insertion distale du muscle grand fessier s'étend sur toute la hauteur de la cuisse, jusqu'au genou. De façon similaire, le muscle biceps fémoral est disposé en un large éventail entre l'ischion en proximal et toute la hauteur de la fibula en distal (figure 5). Sur la

face médiale, on note le même aspect pour le muscle semi-membraneux tendu entre l'ischion et toute la face médiale du tibia.

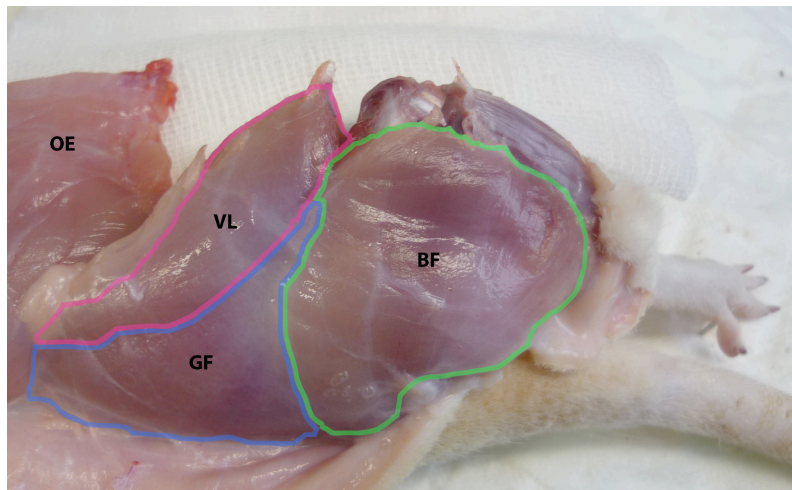


Figure 5 : Vue latérale de la musculature de la cuisse chez le rat. VL : muscle vaste latéral, GF : muscle grand fessier, BF : muscle biceps fémoral, OE : muscle oblique externe.

c. Région cervicale

L'anatomie musculaire de la face ventrale du cou est très proche de l'espèce humaine. Une fois le muscle peaucier franchi, les muscles sterno-cléido-mastoïdiens (SCM) sont les plus superficiels. Leurs bords médiaux forment un triangle isocèle à base crâniale et laissent entrevoir les muscles sterno-hyoïdiens qui tapissent la trachée. Après réclinaison des SCM, les muscles omo-hyoïdiens apparaissent, reconnaissables à leur trajet oblique caudalement et latéralement (figure 6). Leur importance est très variable, allant d'une simple bandelette grêle à un muscle épais, large et puissant occupant quasiment toute la hauteur de la gouttière jugulo-carotidienne.

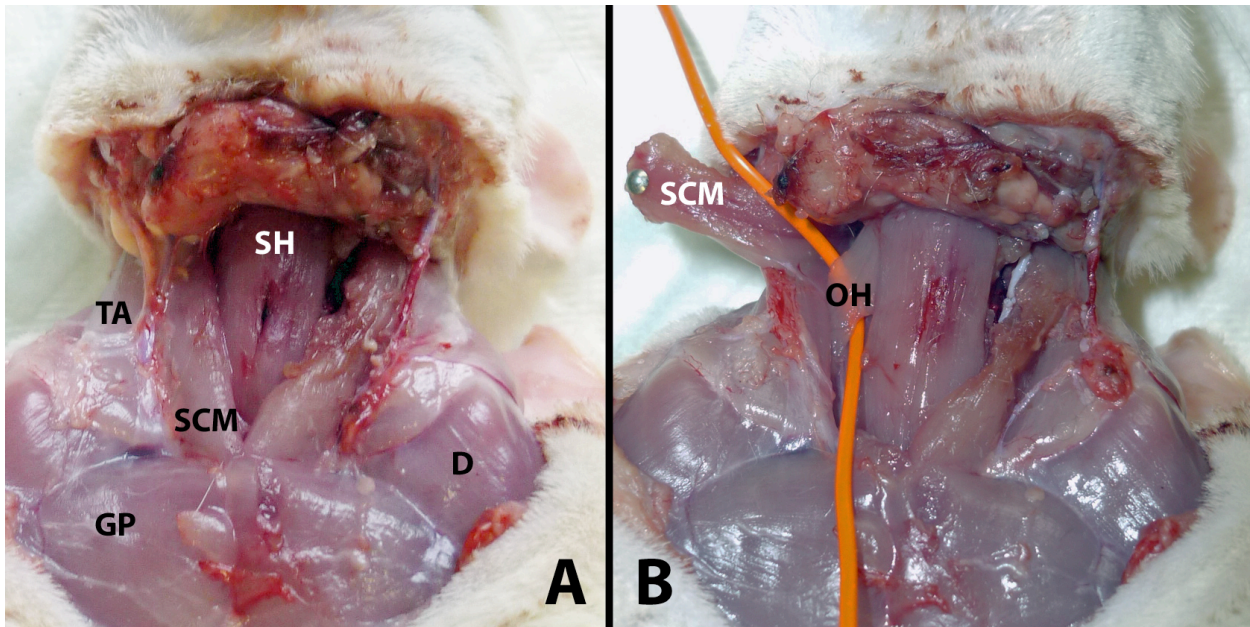


Figure 6 : Vue ventrale sur cadavre de la musculature cervicale du rat. A : les muscles sternohyoïdiens (SH) sont d'emblée visibles entre les muscles sternocléidomastoïdiens (SCM) dont l'insertion sur la clavicule répond au muscle grand pectoral (GP). Le chef antérieur du muscle trapèze (TA) s'insère en regard du muscle deltoïde (D). B : la réclinaison du SCM permet d'aborder le muscle omohyoïdien (OH) qui le croise obliquement vers l'arrière et le dehors.

La musculature dorsale est quant à elle très développée, permettant d'assurer, par son rôle de hauban musculaire, le maintien de la tête dans l'axe horizontal du rachis. Les processus épineux ne sont d'ailleurs pas palpables. La portion crâniale des muscles trapèzes est très étendue et recouvre toute la partie dorsale du cou. Les muscles rhomboïdes antérieurs et splénius donnent la partie la plus charnue de cette musculature. La disproportion entre les loges ventrale et dorsale est nettement mise en évidence sur les coupes axiales d'IRM en pondération T1 (figure 7).

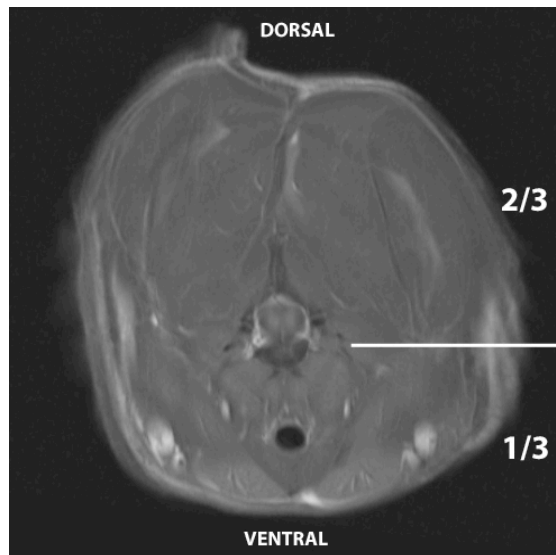


Figure 7 : Coupe axiale du cou en IRM séquence T1 chez le rat. Noter la prédominance de la musculature dorsale et l'enfouissement des processus épineux.

L'artère carotide commune a un trajet horizontal, logée dans la gouttière jugulo-carotidienne entre le SCM, le muscle omo-hyoïdien et le muscle sterno-hyoïdien. Elle donne une ou deux petites branches à son tiers moyen. Sa bifurcation en artères carotides interne et externe est très crâniale, juste avant la pénétration de la carotide interne dans la base du crâne. Le retour veineux est assuré de manière prépondérante par la veine jugulaire externe. Elle présente un diamètre important et sa position est variable latéralement. En général juchée sur le SCM, elle est parfois dissimulée sous le bord médial du muscle trapèze (figure 8). Elle recueille à son bord latéral une grosse collatérale drainant la glande salivaire submandibulaire. La jonction de ces deux veines se projette à une hauteur variable, pouvant aller de la veine faciale au confluent avec la veine subclavière. A l'inverse, la veine jugulaire interne, longeant l'artère carotide commune, est de calibre beaucoup plus modeste, voire absente sur un des rats disséqués. Le plus souvent, elle est accompagnée d'un riche réseau anastomotique de veinules entrelacées recouvrant les faces ventrale et latérale de l'artère carotide commune.

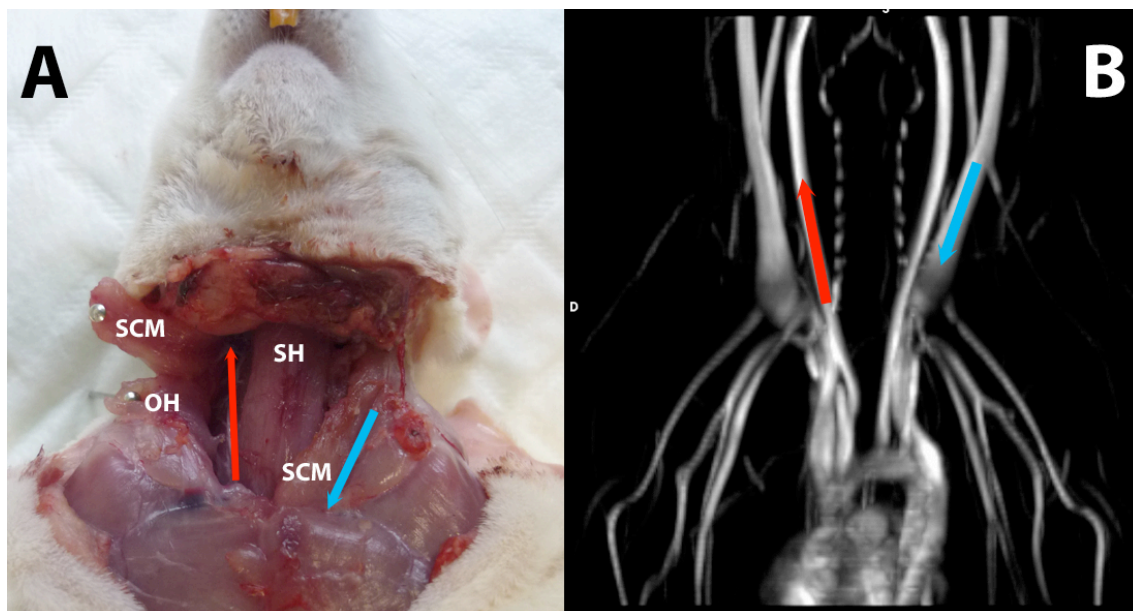


Figure 8 : Etude de la corrélation radioanatomique de la vascularisation cervicale chez le rat. A : vue ventrale sur cadavre. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). La flèche rouge matérialise l'artère carotide commune et la bleue la veine jugulaire externe. SCM : muscles sternocléidomastoïdiens, OH : muscle omohyoïdien, SH : muscles sternohyoïdiens.

d. Transplant en place

La compréhension de la musculature du cou du rat permet de déterminer le trajet idéal du pédicule à travers la loge dorsale. Afin de diminuer la longueur nécessaire des vaisseaux du transplant, ils doivent passer, en dorsal, entre les muscles rhomboïdes et splénius. En arrivant au niveau des apophyses transverses, la veine iliaque contourne le SCM en sous-cutané pour rejoindre la veine jugulaire externe tandis que l'artère plonge sous le muscle omohyoïdien jusqu'à l'artère carotide commune. Le passage entre les muscles trapèze et rhomboïde est également possible (figure 9).

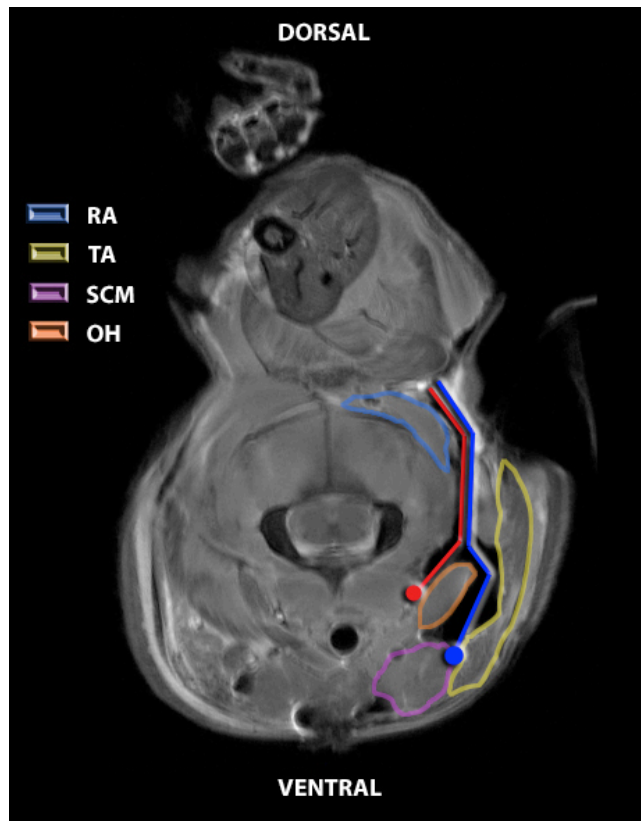


Figure 9 : Coupe axiale d'une IRM en pondération T1 chez un rat transplanté montrant le trajet de l'artère (trait rouge) et de la veine (trait bleu) du pédicule entre les muscles du cou. RA : muscle rhomboïde antérieur, TA : chef antérieur du muscle trapèze, SCM : muscle sternocléidomastoïdien, OH : muscle omohyoïdien.

3) Matériel et méthode

a. Avis du Comité d'Ethique

Un dossier de demande d'approbation du protocole a été soumis au Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Nord-Pas de Calais (Annexe 2). L'ensemble des procédures a reçu un avis favorable du Comité (Avis 042012, annexe 3).

b. Lieu de l'étude

L'étude a été menée dans les locaux du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE), dans l'enceinte du Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) de Lille.

La stabulation des animaux est assurée dans le secteur rongeur de l'animalerie, de type A1 (conventionnelle). Les rats sont placés en cages individuelles permettant une identification fiable et évitant les conflits entre congénères et les hétéromutilations. Les conditions environnementales sont normalisées et stables. La durée d'éclairage est de 10 heures sur le nyctémère, la température est de $20\pm 1^\circ\text{C}$ et l'hygrométrie de $50\pm 10\%$. De l'eau et des granulés standard sont fournis *ad libitum*.

Les procédures chirurgicales sont effectuées dans le bloc opératoire de microchirurgie. Quatre microscopes opératoires sont mis à disposition, ainsi que deux modules d'anesthésie gazeuse fonctionnant de façon indépendante (figure 10).

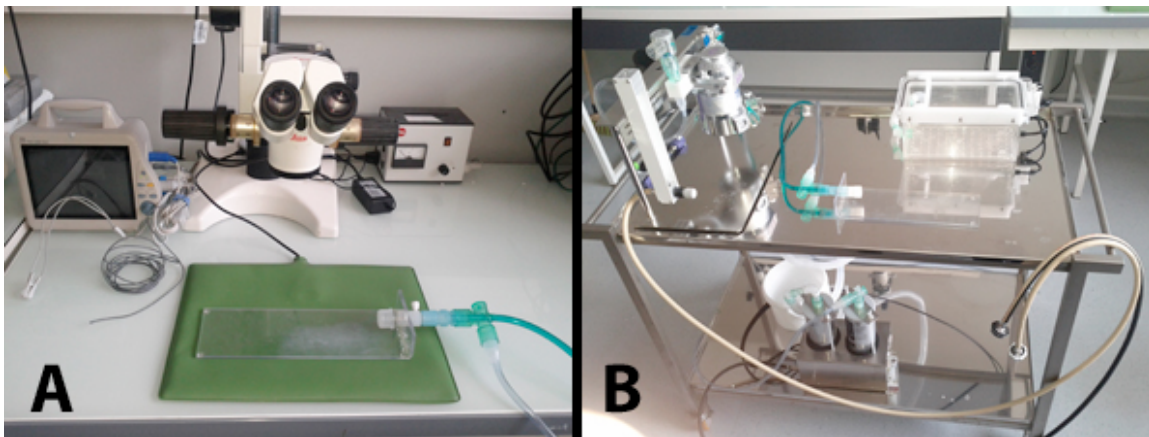


Figure 10 : Vue d'ensemble du poste de travail. A : zone chirurgicale avec le microscope opératoire, le tapis chauffant, le masque de ventilation et le module de monitoring. B : zone anesthésique avec sur le plateau supérieur le débitmètre, la cuve, le double circuit (vers le masque ventilatoire et vers la cage à induction) et sur le plateau inférieur le module d'extraction des gaz.

Les suites postopératoires immédiates (première nuit) sont assurées dans le bloc opératoire en cage individuelle sous lampe chauffante. Dès J1 les animaux réintègrent l'animalerie pour la surveillance ultérieure.

c. Protocole anesthésique et antalgique

L'intégralité des actes chirurgicaux est réalisée sous anesthésie générale. L'induction est obtenue par inhalation en cage à induction par de l'Isoflurane (AErrane®, Baxter) à 5 % dans de l'oxygène pur à un débit de 1 l/min. Une narcose suffisante pour la phase de préparation est obtenue en 5 à 10 minutes. Le rat est alors placé sous masque respiratoire avec le même mélange pour être préparé. Le site opératoire est largement tondu, une déterision est réalisée à l'alcool 70°. Le rat est ensuite placé sur une alèse recouvrant un tapis chauffant réglé à 42°C. La contention des membres est assurée par de petites bandes d'adhésif médical type Leukoplast® (BSN médical), aucune crucifixion n'a été réalisée. Le monitoring est mis en place : saturomètre sur un des membres non opérés donnant fréquence cardiaque et saturation du sang en oxygène et sonde thermique rectale. La désinfection à la Chlorhexidine alcoolique non colorée (Biseptine®, Bayer) constitue la dernière étape de la préparation.

L'entretien de l'anesthésie est assuré par inhalation d'Isoflurane dans de l'oxygène pur à 0,5 l/min. La délivrance des gaz se fait toujours en ventilation spontanée. Le mélange est dosé à la demande en fonction des signes cliniques de réveil et des informations du scope. C'est l'opérateur qui surveille et règle le mélange. Les valeurs sont classiquement comprises entre 0,5 et 2,5%. Le dosage doit être suffisamment fort pour éliminer les mouvements intempestifs et obtenir une fréquence respiratoire de l'ordre de 60 cycles par minute. Cependant il faut éviter tout surdosage, pourvoyeur d'apnées parfois fatales. Une fois l'acte chirurgical terminé, le rat est nettoyé et replacé dans sa cage pour la phase de réveil. Si la

narcose semble encore profonde, le monitoring et le tapis chauffant sont laissés en place quelques instants. Sinon, la cage est mise sous lampe infrarouge. La surveillance constante est assurée jusqu'à la reprise de la déambulation puis le rat est laissé seul jusqu'au lendemain.

La gestion de la douleur est une préoccupation constante en expérimentation animale. Celle-ci a été pensée dans le respect des règles éthiques en évitant les stimulations nociceptives inutiles et en insistant sur la prévention. Lors de la phase de préparation, une injection sous-cutanée de Buprénorphine (Vetergesic®, Sogeval) 0,1 mg/kg est administrée, y compris chez le rat donneur. La Buprénorphine possède également un effet potentialisateur de l'anesthésie générale et permet de diminuer la concentration d'Isoflurane pendant l'entretien. L'analgésie postopératoire n'a d'intérêt que chez le rat receveur, dans la mesure où le rat donneur est euthanasié après prélèvement des transplants. Elle est assurée par mise en place d'un dispositif transdermique de Fentanyl (Durogesic®, Janssen-Cilag) dosé à 100 µg/kg/h. Il est placé sur la peau abdominale préalablement tondu et il est maintenu par un adhésif fort, de type Elastoplaste® (BSN médical). Le patch est renouvelé toutes les 72 heures. Enfin l'analgésie est complétée par l'instillation locale de quelques gouttes de Bupivacaïne (Mylan) en fin d'intervention, juste avant la fermeture.

d. Protocole chirurgical

Le prélèvement des transplants débute par l'incision cutanée circulaire du membre postérieur au niveau du genou avec un refend jusqu'à la ligne médiane puis une large incision longitudinale sur la ligne blanche. Les lambeaux cutanés sont réclinés pour exposer les vaisseaux fémoraux, saphènes internes et le tronc pudendo-épigastrique qui est ligaturé et coupé. Les vaisseaux exposés sont protégés par une compresse humide puis la dissection remonte en direction de la paroi abdominale qui est fendue depuis la ligne blanche (également

ouverte) jusqu'au ligament inguinal en clippant et libérant les vaisseaux épigastriques profonds proches de leur naissance. Les viscères abdominaux sont contenus par des écarteurs fixes pour exposer les vaisseaux iliaques jusqu'à l'aorte et la veine cave caudale. La libération du pédicule commence par l'artère iliaque dont chaque branche est ligaturée et sectionnée. Sa position latérale à la veine et son élasticité intrinsèque font qu'elle va naturellement se déporter en dehors et améliorer l'exposition de la veine iliaque. Les petites collatérales veineuses sont prudemment disséquées, ligaturées et coupées aux alentours du carrefour iliaque jusqu'à ne laisser que la veine iliaque interne qui est cachée dorsalement à la veine iliaque externe (figure 11). Elle est isolée et mise sur lac pour être doucement tractée latéralement. Les ligatures sont passées indirectement en cravatant de part et d'autre de son émergence les veines iliaques primitive et externe afin d'éviter le passage d'instruments à l'aveugle sur ces veines particulièrement fragiles. Après section, la partie proximale du pédicule est entièrement libérée. Celui-ci reste bien entendu toujours attaché en amont.

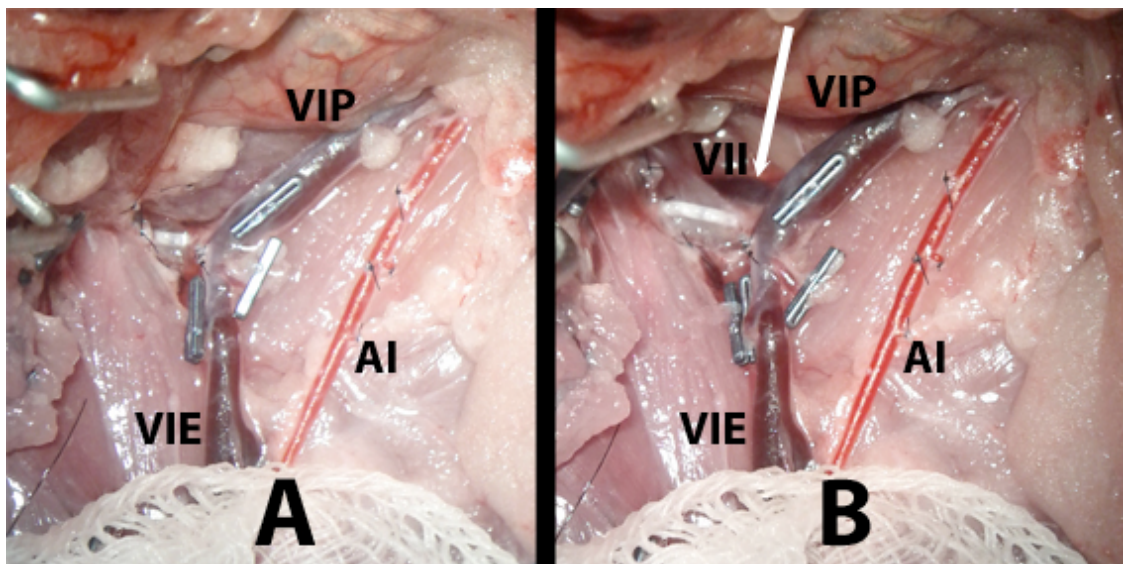


Figure 11 : Vue ventrale peropératoire du carrefour des veines iliaques chez le rat. A : la veine iliaque primitive (VIP) et la veine iliaque externe (VIE) masquent intégralement la veine iliaque interne. B : la veine iliaque interne (VII, flèche blanche) n'est visible qu'après réclinaison de la VIP et de la VIE. AI : artère iliaque.

Au-delà du ligament inguinal, la dissection est facile jusqu'à l'émergence des vaisseaux saphènes internes. Il est important toutefois de repérer les collatérales pour les muscles de la cuisse et les vaisseaux fémoraux profonds qui ont volontiers une origine cachée en profondeur. La transition entre vaisseaux fémoraux et saphènes internes n'est pas toujours évidente, c'est pourquoi il ne faut pas pousser la dissection d'emblée trop en distalité. Une fois la moitié de la cuisse atteinte, la préparation musculaire est nécessaire pour repérer l'artère poplitée et la remonter jusqu'à son origine. Ainsi, les insertions distales des muscles grand adducteur, gracilis et vaste médial sont sectionnées juste au-dessus du genou. La séparation des vaisseaux poplités et de la face caudale de la capsule articulaire est réalisée par voie antérieure. Les sections sont réalisées préférentiellement à la lame froide et concernent le tendon rotulien, l'insertion proximale du chef médial du muscle gastrocnémien, la partie crâniale de la capsule articulaire et les ligaments croisés. Ceux-ci sont atteints à l'aveugle et une grande prudence s'impose afin de ne pas léser la capsule caudale et les vaisseaux sous-jacents. Dès lors, les deux surfaces articulaires se disjoignent et ne demeurent unies que par la moitié caudale de la capsule qui se retrouve en tension. Il est alors plus aisé de la sectionner pas à pas en gardant un contrôle visuel sur les vaisseaux poplités qui sont réclinés. La coagulation des plus grosses branches se fait par clips, les plus petites sont négligées. La libération du genou s'achève par la section des autres muscles (semi-tendineux/semi-membraneux, chef latéral du gastrocnémien, biceps fémoral, grand fessier) à hauteur du genou en clippant les vaisseaux à la demande. Les éléments nerveux sont également coupés au même niveau. A ce stade le transplant est disséqué en îlot vasculaire pur sur les vaisseaux iliaques primitifs. L'artère et la veine iliaques sont séparées uniquement jusqu'à l'émergence du pédicule épigastrique profond.

La libération du transplant est réalisée par section après pose la plus proximale possible d'un clip (figure 12). Il faut impérativement épargner l'aorte et la veine cave caudale

pour préserver la vascularisation du membre controlatéral. Le rinçage est débuté dès la section du pédicule. L'artère est cathétérisée par dispositif souple 24 Gauge. Le soluté de rinçage est du sérum salé isotonique réfrigéré et additionné d'Héparine non fractionnée (Panpharma) pour une concentration finale de 100 UI/ml. Le membre est rincé jusqu'à obtention d'un retour veineux transparent. Puis il est stocké dans un flacon stérile, baignant dans le liquide de rinçage.

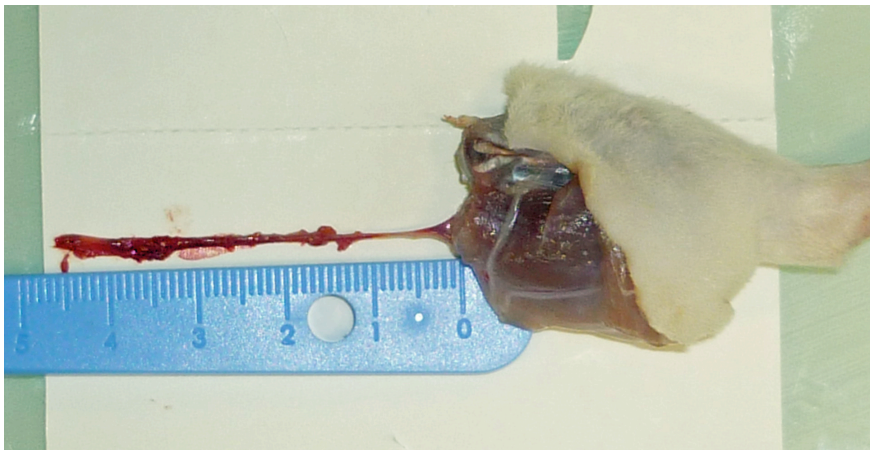


Figure 12 : Vue latérale d'un transplant de membre postérieur de rat fraîchement prélevé. Les muscles sont coupés au niveau du genou sans parage.

Le prélèvement du deuxième transplant est strictement superposable. Une fois les deux membres postérieurs prélevés, le rat est euthanasié avant le réveil par une injection intracardiaque de T61® (Intervet).

Le rat receveur est préparé et installé. L'abord des vaisseaux cervicaux se fait par une incision cervicale ventrale transversale. Les lambeaux cutanés sont réclinés et fixés. La glande submandibulaire peut masquer l'accès à la veine jugulaire externe et doit alors être retirée. Sa veine de drainage rejoint la veine jugulaire à une hauteur variable. Elle doit être préservée pour servir de veine de secours ou pour permettre le rinçage atraumatique de l'anastomose. Une fois visible, la veine jugulaire est libérée sur toute sa hauteur en ligaturant les petites veinules affluentes. Ensuite, le SCM est récliné par un écarteur pour exposer le muscle omo-

hyoïdien. En fonction de son importance, il sera sectionné ou simplement écarté pour aborder l'artère carotide commune. Elle sera libérée sur toute sa hauteur en prenant soin de préserver la veine jugulaire interne (dont certaines collatérales gênantes sont ligaturées/coupées) et le nerf vague qui est situé dorsalement et médialement à l'artère et donc caché dans cette voie d'abord. Une fois complètement libérés, l'adventicectomie des deux vaisseaux est réalisée à la partie la plus crâniale.

La préparation du site de fixation du transplant débute, en décubitus ventral, par une incision cervicale dorsale médiane longitudinale. Les muscles trapèzes et rhomboïdes sont séparés sur la ligne médiane puis la dissection longe la face profonde des rhomboïdes jusqu'au contact des SCM avant de retourner en surface dans l'incision ventrale pour le trajet de la veine et en profondeur vers la gouttière jugulo-carotidienne pour celui de l'artère. Dans certains cas, les muscles rhomboïdes sont difficilement individualisables et le pédicule passera juste sous le trapèze. Le corps d'une seringue de 2 cc est introduit de ventral en dorsal dans le tunnel ainsi créé (figure 13). Le pédicule du transplant est glissé dans ce guide, lesté

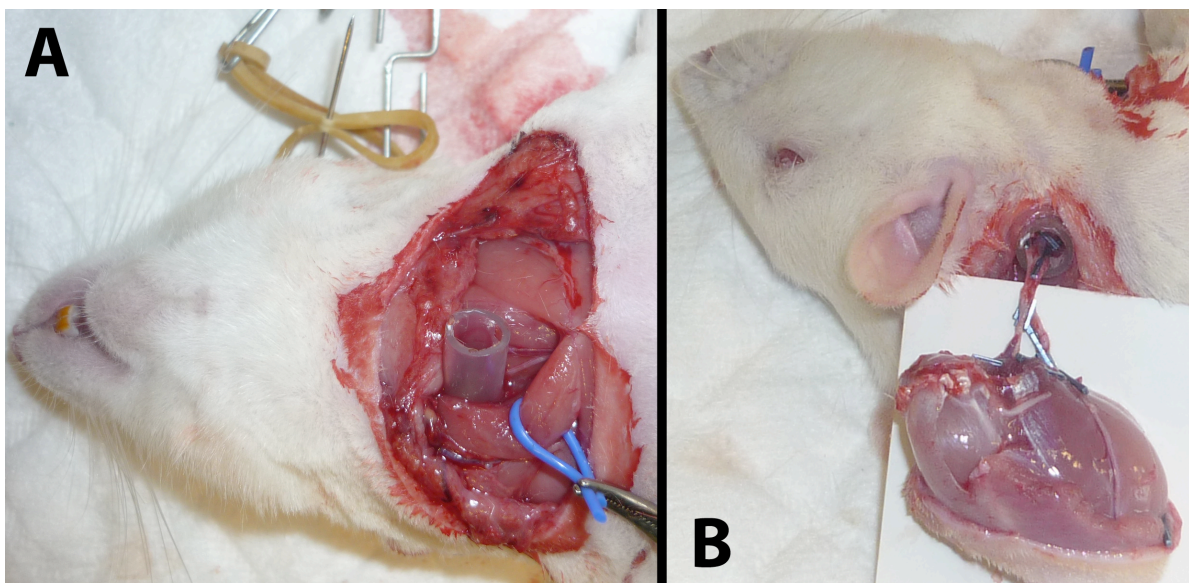


Figure 13 : Tunnelisation du pédicule entre les muscles cervicaux. A : vue ventrale, le muscle sternocléidomastoïdien est récliné par un lac. B : vue latérale avec le pédicule engagé dans l'extrémité dorsale.

Par un clamp de repérage. Sa progression est facilitée par un doux flushing au sérum physiologique en vérifiant l'absence de twist. Le transplant est fixé aux muscles trapèzes par deux points de fil résorbable 3-0 (Vicryl®, Ethicon). Il faut placer sa face médiale du côté de la réimplantation pour ne pas brider le pédicule via les vaisseaux saphènes internes. La peau dorsale est fermée par surjet simple de nylon 3-0 (Ehtilon®, Ehticon) et le pied est fixé à la jambe par un point simple du même fil pour limiter son amplitude de mouvement (figure 14). Le rat est remis en décubitus dorsal (en fait, de trois quarts à cause de la présence du transplant). Le guide est extrait du tunnel et le pédicule est placé en position pour les anastomoses. Les branchements sont réalisés en termino-terminal dans tous les cas. La veine est branchée en premier par points séparés de nylon 10-0 (Ehtilon®, Ehticon). Les points sont répartis par la méthode triangulation avec compléments en cas de fuite importante. L'artère est ensuite anastomosée selon la même technique. L'efficacité des anastomoses est vérifiée par la turgescence des vaisseaux et par la recoloration du transplant. Uniquement en cas de doute, un « patency test » est réalisé. La peau ventrale est suturée par un surjet simple de nylon 3-0.



Figure 14 : Vue de profil d'un rat receveur avec le transplant en position cervicale dorsale médiane. Noter la longueur de pédicule nécessaire pour un branchement cervical ventral.

e. Matériel spécifique

L'anesthésie est administrée par des cuves à Isoflurane standard branchées sur le flux d'O₂ pur en circuit ouvert. Les tubulures sont adaptées à partir de circuits pédiatriques humains. Le masque utilisé est de fabrication artisanale. En effet, les masques spécifiques pour les rongeurs disponibles dans le commerce sont trop volumineux et gênent les phases de dissection cervicale. La confection de ce matériel nécessite simplement un morceau de 5 cm de tubulure de circuit ventilatoire et une extrémité de doigt de gant d'examen en latex perforée à son sommet. Le gant est chaussé sur le tuyau et maintenu par un peu d'adhésif. Il fait office de membrane d'étanchéité et la perforation accueille juste les narines (le rat présente une respiration exclusivement nasale en condition normale). Le monitoring est assuré par des modules portables à usage vétérinaire (MEC-1200 vet[®], Mindray).

Les microscopes opératoires sont à variation d'optique discontinue, autorisant des grossissements de x6, x10, x16, x25 et x40. La totalité des procédures est réalisée sous grossissement faible (x6), et parfois modéré (x10 ou x16). La trousse d'ouverture/fermeture est composée d'instruments classiques. La boîte microchirurgicale est composée d'une pince type Dumont n°5 (extrémités pointues), une pince de type Rhoton (extrémités mousses), un porte-aiguille de type O'Brien et une paire de ciseaux de type Vanas. Des clamps à usage unique sont systématiquement utilisés. L'occlusion des vaisseaux est assurée par ligature au fil de nylon 10-0 pour les vaisseaux petits, fragiles ou d'accès difficile. Les vaisseaux plus gros et bien exposés sont clippés par pinces automatiques (Ligaclip[®], Ethicon), tandis que l'hémostase des plus grêles est réalisée par traction. Les écarteurs sont de confection artisanale. Ils sont composés de trombones dépliés puis repliés afin que la « pointe » mousse soit au contact des viscères sans les blesser. Ils sont maintenus par des élastiques eux-mêmes

fixés à l'alèse par des adhésifs. Il a été délibérément choisi de ne pas mettre de champ opératoire afin de ne pas gêner la surveillance peropératoire des animaux.

f. Mesure des paramètres peropératoires

En plus du monitoring, plusieurs paramètres sont évalués pendant les interventions chirurgicales. Ils concernent :

- Les animaux : sexe, poids.
- Le prélèvement : côté, calibre de l'artère et de la veine iliaques primitives, longueur du pédicule à partir de la bifurcation saphène interne, durée opératoire.
- La réimplantation : côté, calibre de l'artère carotide commune et de la veine jugulaire externe, durée opératoire.
- Les anastomoses (pour chaque artère et chaque veine) : nombre de tentatives, nombre de points sur la dernière tentative, résultat à 10 minutes.

g. Surveillance postopératoire

Les rats sont évalués quotidiennement par l'opérateur. A défaut, la surveillance peut être assurée par un personnel du DHURE habilité à la manipulation des rongeurs.

L'évaluation du rat est basée sur les éléments suivants :

- Signes de douleur : état de vigilance, faciès, réactions aux stimulations sonores, comportement exploratoire dans et hors de la cage.

- Examen neurologique : mobilité des quatre membres natifs, ouverture palpébrale, mouvements anormaux voire convulsifs, ataxie proprioceptive, syndrome vestibulaire ou cérébelleux.
- Fonction respiratoire : fréquence respiratoire, signes de tirage sus-sternal ou intercostal, respiration abdominale, toux, éternuements, saturation en oxygène (saturomètre).

Une fois que l'état général du rat est apprécié, le transplant est évalué à son tour :

- Aspect général : propreté, lésions cutanées, signes de morsure.
- Topographie : position, fixation du pied, mobilité intempestive.
- Vascularisation : coloration en zone glabre (plante du pied), temps de recoloration capillaire, saturation en oxygène comparée à un membre natif (figure 15).



Figure 15 : Surveillance du transplant par mesure de la saturation en oxygène.

h. Sortie de protocole

Cette surveillance est maintenue jusqu'au sixième jour postopératoire puis le rat est euthanasié par injection intracardiaque de T61® après induction anesthésique dans les mêmes conditions que précédemment. Ce délai volontairement court est le fruit d'un compromis entre la nécessité de plusieurs jours de recul pour affirmer le succès de la réimplantation et l'apparition des signes de rejet vers le dixième jour.

Les rats peuvent être euthanasiés plus précocement en cas de perte avérée du transplant ou d'affection somatique rendant leur maintien en vie contraire aux règles d'éthique en expérimentation animale.

i. Analyses statistiques

Une corrélation est recherchée entre, d'une part, le poids du rat et, d'autre part, le calibre de l'artère (donneuse ou receveuse), le calibre de la veine et la longueur du pédicule (pour le rat donneur). Elle est estimée par un test non paramétrique de Spearman en raison de la faible taille de l'échantillon. Le coefficient de Spearman est calculé selon le principe de corrélation des rangs entre la « variable » (le poids) et la « valeur » du paramètre correspondant. Sa formule peut s'écrire ainsi :

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n}$$

ρ est le coefficient de Spearman.

d_i est la différence entre le rang de la variable i et celui de sa valeur.

n est la taille de l'échantillon.

Le coefficient ρ est compris entre -1 et 1, inclus. Plus sa valeur se rapproche de 1 en valeur absolue, plus la corrélation est forte. Une valeur positive indiquera que la variable et sa valeur évoluent dans le même sens et vice versa. Un coefficient égal à 0 indique une absence de corrélation entre la variable et sa valeur.

Une fois ce coefficient calculé, sa significativité est testée en considérant l'hypothèse nulle H_0 et l'hypothèse alternative H_1 comme suit :

H_0 : il existe une corrélation entre le poids et le paramètre testé.

H_1 : le poids et le paramètre testé sont indépendants.

Il convient de déterminer si la corrélation retrouvée ($\rho \neq 0$, H_0 vérifiée) est le fruit du hasard. La distribution de ρ peut être estimée comme une loi t de Student à $n-2$ degrés de liberté, selon la formule suivante :

$$t = \rho \sqrt{\frac{n-2}{1-\rho^2}}$$

Le risque α de rejeter H_0 alors qu'elle est vraie est fixé à 5 %. Autrement dit, la corrélation calculée, quelque soit sa valeur, est considérée comme significative si la probabilité p issue du test de Student bilatéral est inférieure à 0,05.

Les calculs statistiques ont été confiés à la version 20.0 du logiciel SPSS. Le reste des données est traité par simple moyennage.

4) Résultats

a. Description de la cohorte

L'animalerie du DHURE, dont dépend le laboratoire de microchirurgie, possède une unité de reproduction interne qui a fourni la quasi-totalité des rats utilisés lors de l'étude.

Quinze rats sont prélevés, dont treize mâles et deux femelles. Ils permettent d'obtenir 22 transplants qui ont tous été réimplantés. Le poids moyen des rats donneurs est de 461 grammes pour un minimum de 330 g et un maximum de 670 g.

22 rats receveurs sont utilisés, dont 21 mâles et une femelle. Le poids moyen est de 427 g (min 350 g – max 670 g). Les deux premiers rats, à titre de test, sont prélevés d'un seul côté et réimplantés de façon autologue.

Deux intervenants ont pris part, en alternance, aux manipulations dans le cadre de cette étude. Cependant, toutes les séquences chirurgicales sont réalisées par un unique opérateur.

b. Evolutions de protocole

Les sept premiers rats sont réimplantés par tunnellisation du pédicule avec un taux d'échec de 100% : trois sont morts le jour ou le lendemain de l'intervention (deux d'hypothermie et un d'hypovolémie) et quatre sont euthanasiés entre J1 et J3 pour perte du transplant (deux par thrombose veineuse, un par thrombose artérielle et un par absence de retour veineux malgré des anastomoses perméables et des signes de revascularisation cutanée). Les quinze rats suivants sont réimplantés avec passage sous-cutané du pédicule par

prolongement de l'incision cervicale antérieure jusqu'à l'incision dorsale. La position finale du transplant est de ce fait légèrement modifiée avec une fixation légèrement paramédiane (figure 16). Cette deuxième série est considérée comme représentative du protocole et est utilisée pour les analyses statistiques, sauf mention contraire.



Figure 16 : Vue de 3/4 d'un rat receveur avec le transplant en position cervicale dorsale paramédiane.

Concernant l'analgésie, la délivrance des dispositifs transdermiques de Fentanyl étant dépendante de l'organisation de la pharmacie centrale du CHRU, l'approvisionnement a été discontinu. La solution alternative consiste en l'administration sous-cutanée biquotidienne de Buprénorphine à la dose de 0,1 mg/kg. Dans cette situation, une deuxième injection est réalisée en fin d'intervention, avant le réveil.

c. Analyse statistique des données des transplants

68% des transplants sont prélevés à gauche. Cette surreprésentation du côté gauche s'explique par un meilleur confort opératoire dans la configuration du laboratoire de microchirurgie. La durée moyenne de l'intervention est de 3,66 heures (max 5 h – min 2,5 h)

avec une courbe d'apprentissage évidente. La durée moyenne des sept premiers prélèvements est de 4,36 h contre 3,33 h pour les quinze derniers (figure 17).

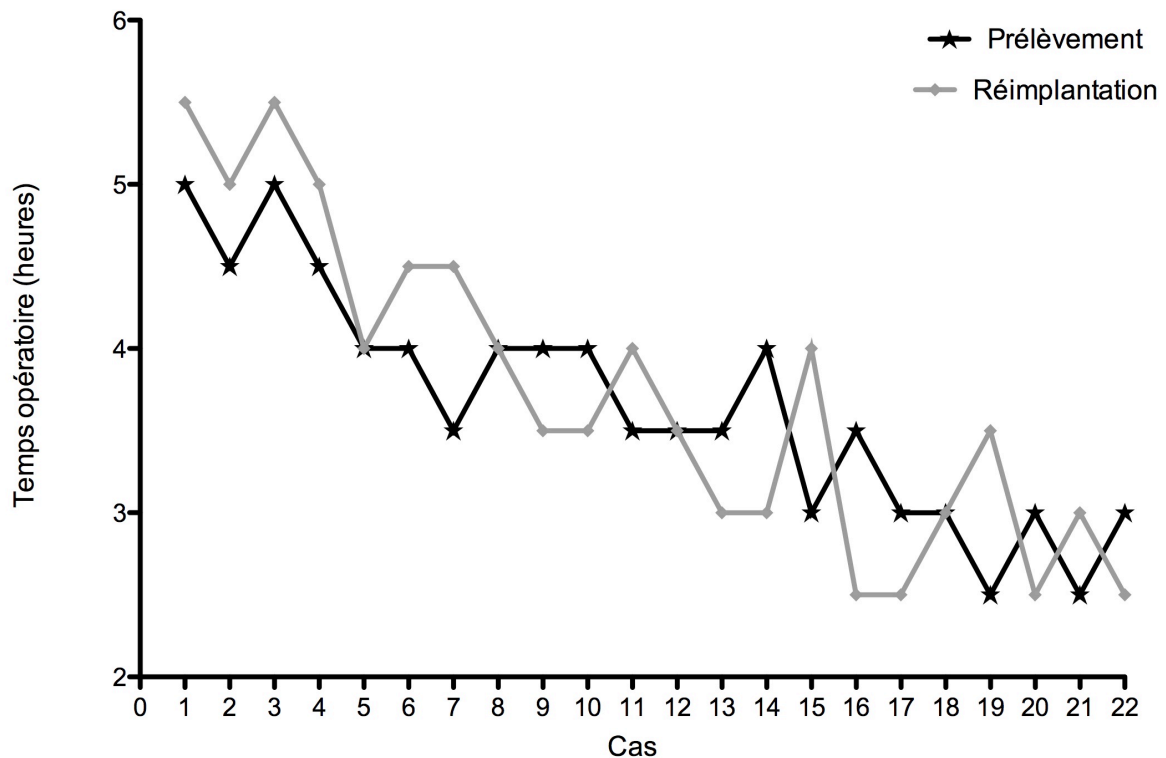


Figure 17 : Evolution des durées opératoires de prélèvement et de réimplantation au cours de l'étude. Le changement d'inclinaison de la courbe d'apprentissage se situe après le septième cas. C'est le nombre moyen de manipulations nécessaires pour obtenir des résultats fiables et reproductibles.

Le calibre de l'artère iliaque primitive est de 1,42 mm (min 1,1 – max 1,9) et celui de la veine 1,93 mm (min 1,3 - max 2,3). La longueur moyenne du pédicule est de 45,7 mm (min 42 – max 52) pour un prélèvement optimal.

Aucune des mensurations n'est corrélée au poids de l'animal (figure 18) :

- Artère : $\rho = 0,3846$; $p = 0,0772$
- Veine : $\rho = 0,4067$; $p = 0,0603$
- Longueur du pédicule : $\rho = 0,02234$; $p = 0,9214$

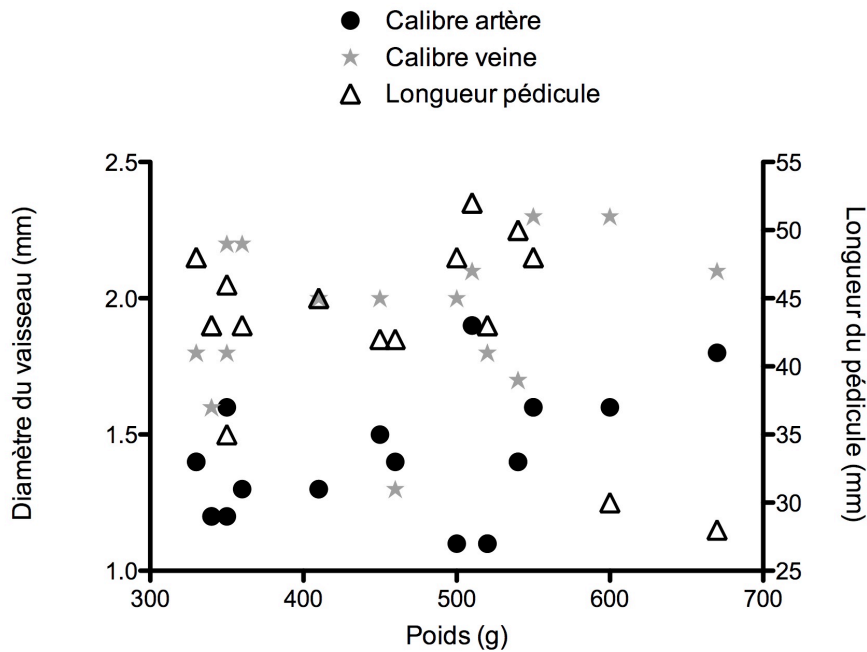


Figure 18 : Dispersion des valeurs de diamètre des vaisseaux et de longueur du pédicule du transplant en fonction du poids. Il n'y a pas de corrélation entre le poids et les autres paramètres.

d. Analyse statistique des données des anastomoses

La phase de réimplantation et de fixation du transplant est de durée globalement équivalente au prélèvement avec une moyenne de 3,73 heures pour les 22 tentatives (max 5,5 – min 2,5). Là encore la courbe d'apprentissage est importante avec 4,86 h en moyenne pour les sept premiers et 3,20 h pour les suivants (figure 17).

Le diamètre des vaisseaux du site receveur est en moyenne de 1,40 mm pour l'artère carotide commune (min 1,1 – max 1,8) et de 2,0 mm pour la veine jugulaire externe (min 1,5 – max 2,4). Il n'y a pas de corrélation avec le poids (figure 19) :

- Artère : $\rho = 0,2379$; $p = 0,2863$
- Veine : $\rho = -0,08866$; $p = 0,6948$

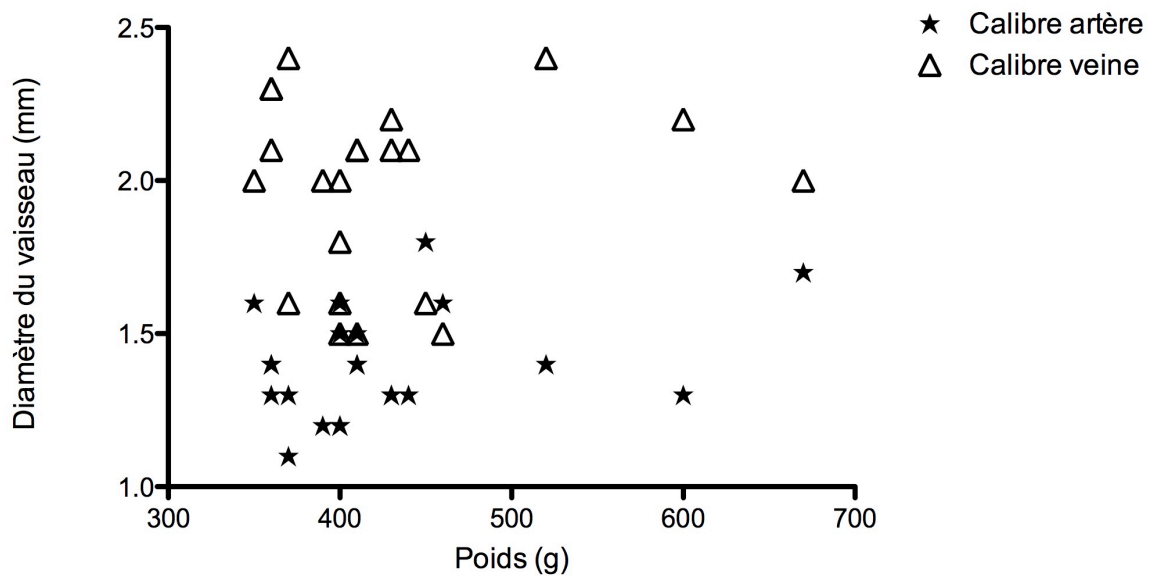


Figure 19 : Dispersion des valeurs de diamètre des vaisseaux cervicaux du rat receveur en fonction du poids. Il n'y a pas de corrélation entre le poids et les autres paramètres.

La réalisation technique des anastomoses varie également en fonction de l'avancée de l'étude. La première série de sept rats retrouve une moyenne de deux tentatives d'anastomose artérielle par intervention, un nombre de sept points et un taux de succès à dix minutes de 57%. Pour les anastomoses veineuses, trois tentatives sont réalisées en moyenne pour un nombre de points de 8,7 et un taux de succès de 29%. Dans la deuxième série, les artères sont anastomosées après 1,3 tentatives, 6,7 points et 100% de succès tandis que les veines passent après 1,8 essais, 8,1 points avec 87% de réussite.

e. Survie des transplants

Au cours de la surveillance, la position des transplants reste identique à celle choisie pendant la réimplantation. Il n'a pas été noté de mouvements intempestifs ni de signes d'automutilation. Aucun signe de rejet ni d'infection n'est constaté.

Sur les quinze rats réimplantés avec pédicule sous-cutané, trois transplants sont perdus avant la mort du rat, soit un taux d'échec de 20%. Deux échecs sont constatés en peropératoire par absence de retour veineux malgré des anastomoses perméables. Ces rats sont euthanasiés à J1 après confirmation de la perte du transplant. Le troisième rat est euthanasié à J3 pour nécrose de la patte survenue à J2. L'origine veineuse de cet échec ne fait pas de doute devant l'aspect congestif du transplant. De façon surprenante, l'anastomose veineuse de ce sujet est considérée comme non perméable à dix minutes mais a permis la survie du transplant avec un aspect satisfaisant pendant 48 heures, suggérant la reperméabilisation après fermeture et l'occurrence d'un deuxième épisode thrombotique.

Les douze autres transplants sont restés viables jusqu'à la mort de leur hôte. Un essai de diminution du volume du transplant par parage des muscles de la jambe est réalisé sur deux animaux. La peau en regard a complètement nécrosé mais le pied est resté viable jusque J6 (figure 20). Ces deux cas sont considérés comme des succès.

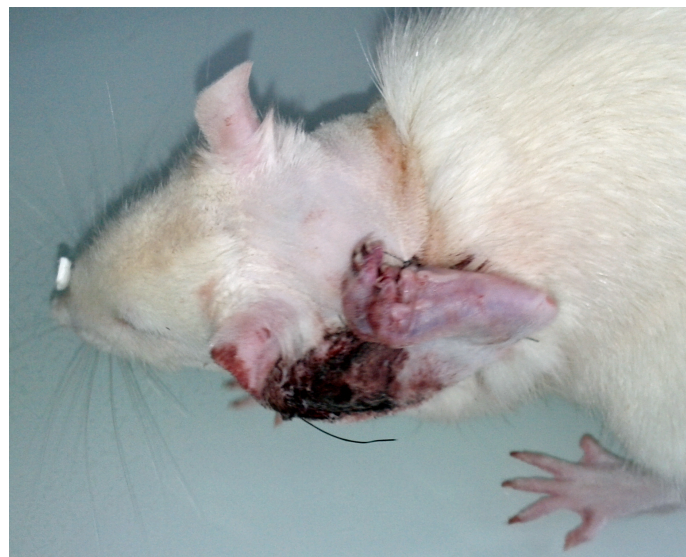


Figure 20 : Aspect à J3 d'un transplant avec parage musculaire extensif. Noter la nécrose cutanée de la jambe et la bonne vitalité du pied malgré un aspect transitoirement congestif des orteils.

f. Survie des rats

Sur les douze rats réimplantés avec succès, cinq (42%) atteignent la fin du protocole et sont euthanasiés à J6. Les sept autres sont morts spontanément entre J0 et J5 postopératoire. La médiane de survie après transplantation réussie est de 4,5 jours. Un rat est mort quelques heures après intervention par probable surdosage en héparine dû à une erreur de proportions dans le liquide de rinçage. Trois sont morts à J4 et J5 après avoir présenté des signes respiratoires évocateurs de paralysie laryngée : stridor et hypersialorrhée. Cependant, aucun signe de détresse respiratoire ni de désaturation n'a été noté lors de la surveillance, ce qui aurait imposé une euthanasie précoce. Les trois derniers rats sont morts de cause inconnue à J1, J3 et J4 sans symptomatologie préliminaire.

Sur le plan général, aucun signe de douleur postopératoire n'est repéré, que ce soit sous Fentanyl transdermique ou sous Buprénorphine sous-cutanée. Le comportement exploratoire du rat reste actif. Un signe de Claude Bernard Horner (myosis, ptosis supérieur, énophtalmie) est noté dès le réveil dans 91% des cas (figure 21). Aucune autre symptomatologie d'origine neurologique n'est répertoriée.

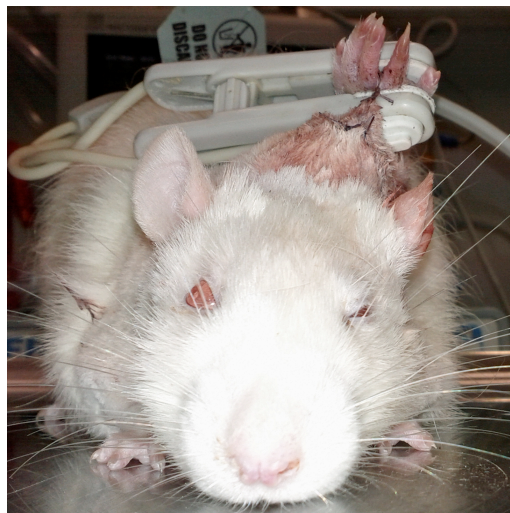


Figure 21 : Signe de Claude-Bernard-Horner gauche à J1 d'une réimplantation : énophtalmie et ptosis. Le myosis n'est pas visible sur la photo.

5) Discussion

a. Les animaux

La confrontation au postulat de départ révèle une bonne concordance avec le cahier des charges mis en place lors de la phase préclinique.

Cependant, le poids des rats n'est statistiquement corrélé ni au calibre des vaisseaux donneurs et receveurs ni à la longueur du pédicule vasculaire. D'autre part, plus les rats sont gros, plus la dissection du transplant et du site receveur est compliquée par la présence de graisse. Il n'y a donc pas d'intérêt à se pourvoir d'individus de poids supérieur à 300 grammes. Selon cette même hypothèse de départ, des rats mâles ont été choisis dans l'idée de travailler sur des sujets plus gros. Mais en fin d'étude, un problème d'approvisionnement en animaux nous a conduit à opérer des femelles. La dissection des vaisseaux iliaques est grandement facilitée par l'absence des vésicules séminales, très développées chez le rat mâle. L'abord du cou est strictement identique. Il nous paraît donc intéressant à l'avenir de sélectionner des rats de 250 à 350 grammes et de prélever les transplants sur des femelles, la réimplantation pouvant être assurée indifféremment sur un mâle ou une femelle.

Malgré le taux de mortalité spontanée de 45% sur les 22 animaux de l'étude, le choix du rat en espèce animale n'est pas remis en cause. En effet le lapin semble plus fragile (57), les souris et rongeurs de taille équivalente ont des vaisseaux trop petits et les espèces animales plus grandes sont plus coûteuses et posent des problèmes de stabulation. Les études chez le rat avec manipulations microchirurgicales montrent des taux de mortalité de l'ordre de 20 à 25% avec des procédures opératoires moins longues et plus simples (43,54).

b. Le transplant

Toutes les phases du protocole chirurgical peuvent être réalisées par un seul opérateur. Cependant, la présence d'un aide permet une meilleure sécurisation de certaines étapes critiques de la dissection du transplant et de sa réimplantation. Il s'agit notamment de la ligature/section de la veine iliaque interne et de la libération du genou. Concernant le premier point, le risque de plaie vasculaire est important pour deux raisons. Premièrement la veine iliaque interne est cachée à la vue de l'opérateur dans la voie d'abord choisie. Deuxièmement les veines rétropéritonéales du rat sont d'une grande fragilité à cause de la quasi-absence de média. Il en résulte des plaies veineuses pour des traumatismes mineurs avec hémorragie difficilement contrôlable. Deux rats sont morts pendant le prélèvement du deuxième transplant pour cette raison. Sur un autre rat, le pédicule a dû être raccourci de 20 mm après la pose d'un clip en masse pour stopper un saignement veineux au niveau du carrefour iliaque. Au vu de l'ensemble de ces éléments, cette étape est sans conteste la plus délicate et doit être réalisée en premier. La libération du genou est difficile pour un opérateur seul en raison des problèmes d'exposition des vaisseaux poplités en début de dissection et de traction sur le pédicule vers la fin. En effet, une contrainte intempestive sur les vaisseaux nourriciers par le poids du transplant peut donner des lésions intimes irréversibles, sources de thrombose lors de l'anastomose. En dehors de ces deux phases délicates, les temps opératoires ne présentent pas de piège particulier.

Deux essais de réduction de volume du transplant sont réalisés, par désinsertion distale des muscles de la cuisse en respectant les vaisseaux principaux. Mais la terminaison de ces muscles sur le tibia ou la fibula descend très bas sur la jambe en raison de la position quadripodale du rat. Les dégâts occasionnés sur la vascularisation cutanée ont conduit à une

nécrose complète de la peau de la jambe après réimplantation malgré une bonne vascularisation du pied. Cette option n'a donc pas été retenue.

Le patron vasculaire de ce lambeau est idéal car il s'agit d'un système clos nourri par un seul axe proximal. Cette caractéristique permet un rinçage facile et homogène du transplant, indépendamment des territoires vasculaires adjacents comme cela peut être le cas pour les lambeaux à contingent cutané prédominant. De plus la présence des portions osseuses, tendineuses et articulaires est un argument décisif dans la confirmation du choix du segment de membre par rapport aux transplants composites de tissus mous car il représente plus fidèlement la nature des transplants digitaux partiels qui seront utilisés à terme. Lors des études précédentes, les protocoles utilisés ne respectent pas toujours ce principe. Si le transplant le plus fidèle est indéniablement celui de Guimberteau (57), la récupération de doigts humains pour réimplantation sur une autre espèce pose des problèmes de disponibilité pour les études à grande échelle. Trois autres auteurs intègre un transplant à composante ostéoarticulaire. Huang, avec les réserves déjà évoquées, a tenté l'allotransplantation de segment de doigt congelés chez l'Homme (52). Cependant, il s'agit d'une série de cas cliniques et non d'un modèle expérimental. Buncke utilise, lors de sa première publication, des genoux vascularisés enfouis sous la peau inguinale (54). Le fait que les transplants soient cachés rend leur surveillance compliquée et l'adaptation de la peau à la cryopréservation ne peut pas être évaluée. Pour sa deuxième publication, il conserve des segments de queue pour transplantation orthotopique (55). Les deux précédents points négatifs sont supprimés mais il manque les informations concernant le cartilage, la membrane synoviale et les tendons.

c. Le site receveur

Les veines cervicales ont une média épaisse et donc se spasmant très facilement. Pour autant, le calibre mesuré avant dissection est équivalent à celui de la veine iliaque. Le spasme systématiquement présent au moment de l'anastomose donne l'impression d'une incongruence importante (figure 22) qui disparaît après levée du spasme. L'abord

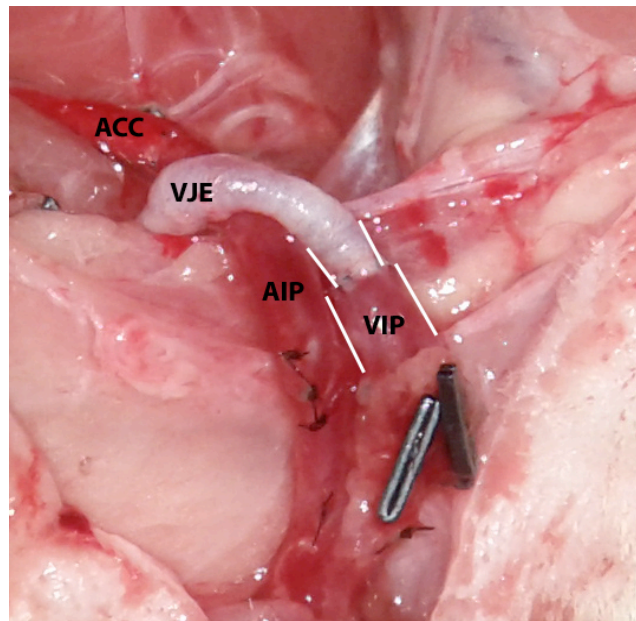


Figure 22 : Vue ventrale au grossissement x16 de la différence de calibre et de consistance entre la veine jugulaire externe (VJE) spasmée et la veine iliaque primitive (VIP) après anastomose chez le rat. ACC : artère carotide commune, AIP : artère iliaque primitive.

de l'artère carotide commune nécessite parfois la section du muscle omohyoïdien quand il est très recouvrant. Outre la grêle veine jugulaire interne, l'artère est recouverte d'un entrelacs de nerfs qui sont présents sur toutes ses faces. La dissection de la carotide doit être complète pour pouvoir la dérouter sans contrainte mais doit respecter le maximum de filets nerveux. Cela peut être difficile chez certains animaux dont la disposition anatomique n'est pas favorable. Le nerf vague, accolé à la face dorsomédiale de l'artère (i.e. caché lors de la dissection), doit être respecté (figure 23). Nous pensons que les quelques signes neurologiques mineurs (syndrome de Claude Bernard Horner) présentés par les rats et les

morts par probable paralysie laryngée sont dus à des lésions à ce niveau plutôt qu'à une atteinte centrale. La suppléance vasculaire cérébrale est assurée par le polygone de Willis. Celle-ci est très performante chez le rat, comme en témoigne l'absence de déficit neurologique majeur, notamment d'hémiplégie, après ligature d'une artère carotide commune chez l'ensemble des animaux transplantés.

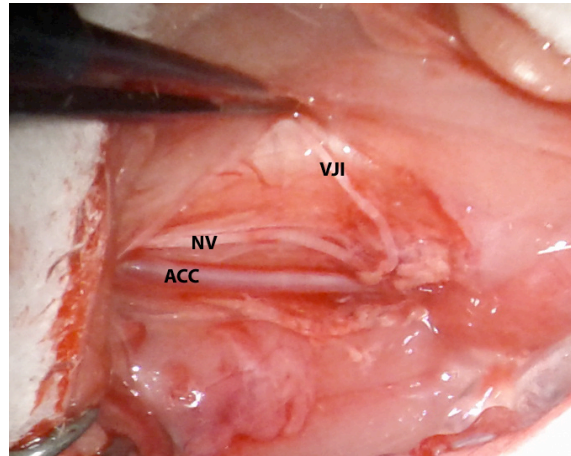


Figure 23 : Vue ventrale au grossissement x10 des rapports entre l'artère carotide commune (ACC) et le nerf vague (NV) chez le rat. VJI : veine jugulaire interne (réclinée).

En raison du grand nombre d'échec lors des sept premières transplantations, la tunnellation du pédicule entre les muscles cervicaux est abandonnée car les phénomènes de twist et de chevalet ne sont pas maîtrisés (figure 24). Le passage sous-cutané oblige parfois à placer le transplant en position paramédiane et légèrement oblique. Cette position ne gêne ni la surveillance, ni la survie du greffon, ni le comportement du rat. Mais le transplant ne peut être fixé en position définitive qu'après achèvement des sutures vasculaires. La sécurisation des anastomoses lors de la mise en place finale est ardue, surtout en cas d'opérateur unique. De la même façon que pour la libération du genou, la présence d'un aide s'avère précieuse pour éviter les tractions sur le pédicule et les fragiles sutures.

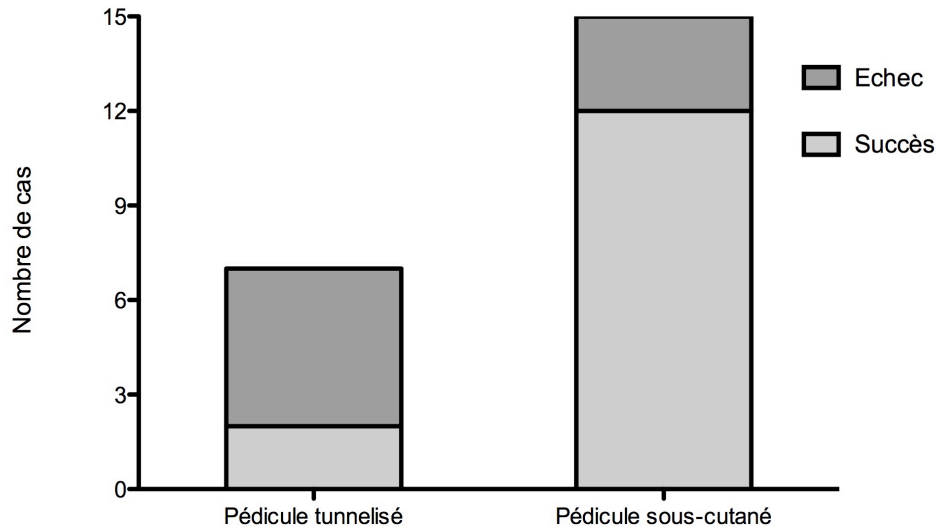


Figure 24 : Résultat de revascularisation immédiate du greffon en fonction de la position du pédicule vasculaire. Le passage sous-cutané du pédicule donne de meilleures chances de succès.

d. La survie des rats et des greffons

Nous avons pu confirmer la facilité de la surveillance du greffon qui est inhérente à sa position. Ce placement permet également une prévention efficace des automutilations. Aucune mobilité excessive ne vient empiéter le champ de vision de l'animal et la tolérance du greffon est excellente. Des études utilisant des greffes orthotopiques de membre postérieur chez le rat utilisent des sprays répulsifs ou des colliers élisabéthains avec plusieurs cas d'automutilation malgré les mesures préventives (63,64). Certains animaux ont été sortis de ces études en raison de l'importance des lésions.

Le taux de succès de revascularisation de 80% est jugé satisfaisant en comparaison des données de la littérature. Surtout en considérant le fait que la surveillance des rats est discontinuée et que les conditions expérimentales ne permettent pas les révisions chirurgicales. En effet, les études sur les complications des lambeaux libres microchirurgicaux chez l'Homme montrent des taux de complication microchirurgicale majeure (thrombose artérielle

ou veineuse, saignement majeur compromettant la vitalité du lambeau) d'environ 20% (73,74). Cependant, le taux d'échec de ces lambeaux libres en pratique clinique est nettement inférieur (5 à 7%) en raison d'une surveillance postopératoire continue et de reprises chirurgicales immédiates quand elles sont nécessaires. Quant au nombre de rats morts prématurément, il est limité par les précautions de dissection de l'artère carotide déjà décrites. La médiane de survie des rats, en dehors de cas d'euthanasie précoce pour perte du transplant est de 4,5 jours. Il n'y a pas eu de signe de souffrance du transplant sur les rats morts prématurément. En tout état de cause, il n'y a pas eu de perte de transplant au-delà de J2 et dans ces cas l'échec était prévisible dès J0 avec des signes de non-revascularisation (absence de retour veineux) ou J1 avec des signes de souffrance veineuse. Nous considérons donc qu'une survie à J3 du rat et du transplant est suffisante pour récupérer le transplant pour analyse histologique des dommages tissulaires dus à la cryopréservation. Dans ces conditions, 83% des transplants viables auraient été utilisés pour analyse anatomopathologique, ce qui correspond à 67% des animaux réimplantés. Cela ne remet pas en cause l'objectif initial de survie jusqu'au sixième jour mais cela ne représentera pas une condition impérative pour l'inclusion des transplants dans l'analyse des données histologiques.

Les signes de rejet aigu de transplantation sont classiquement décrits à partir de dix jours. Cependant, il semblerait que cette valeur de référence subisse de grandes variations en fonction de facteurs qui ne sont que partiellement connus et maîtrisés. Les valeurs trouvées dans le cadre des allotransplantations de tissus composites comportant de la peau chez le rat s'échelonnent de 12,8 jours (63) à 5,7 jours (64,66) dans le cadre de transplantation entre races différentes. L'absence de contingent cutané dans les transplants allonge de façon significative le délai avant rejet (63). Quoiqu'il en soit, les transplants de l'étude n'ont pas montré de signe de rejet aigu, y compris pour les rats qui ont atteint le sixième jour. Ce résultat peut en partie être attribuable au fait que les rats sont tous de la même race et qu'ils

proviennent de l'unité de reproduction de l'animalerie avec un certain degré de consanguinité, sans pour autant atteindre la définition des souches Inbred. L'objectif de maintien en vie jusqu'au sixième jour postopératoire est donc confirmé.

e. Les conditions de l'étude

La réalisation de ce protocole est peu contraignante sur le plan logistique, surtout si l'animalerie d'accueil dispose d'une unité de reproduction. De plus, l'objectif d'un coût limité est atteint : du matériel de base est amplement suffisant pour mener à bien les procédures décrites, que ce soit pour l'anesthésie, le microscope ou les instruments chirurgicaux. Les consommables employés sont d'utilisation courante, facilement disponibles et peu onéreux.

La phase d'apprentissage au cours de cette étude est relativement longue. Il a fallu sept rats avant d'observer les premiers résultats favorables. Ce délai est imputable à l'acquisition progressive de la maîtrise des difficultés techniques lors des séquences opératoires, mais également à un défaut de conception initiale du modèle concernant le cheminement du pédicule du transplant. Grâce aux améliorations techniques apportées et aux mises en garde détaillées plus haut, la courbe d'apprentissage devrait être nettement raccourcie pour les équipes qui envisageraient d'utiliser ce modèle.

CONCLUSION

Un nouveau concept de traitement chirurgical des séquelles de traumatisme de la main est en passe de voir le jour avec l'utilisation d'allotransplants composites de petite taille. Si l'effort de recherche est actuellement centré sur l'immunosuppression et ses contraintes, de plus en plus d'équipes travaillent sur la cryopréservation de tels transplants dans l'espoir de créer des banques de tissus disponibles pour les reconstructions à froid. Le modèle présenté permettra, s'il se généralise, une uniformisation des protocoles d'étude ciblés sur cet objectif. L'extrapolation et la comparaison des résultats entre les différents centres seront facilitées et permettront une répartition des tâches rendue nécessaire par la multiplicité des paramètres à prendre en considération. L'objectif de ce travail est l'étude de faisabilité et la mise au point technique d'un modèle animal d'allotransplantation de tissus composites.

Au total, le protocole idéal intègre un transplant partiel de membre postérieur prélevé par désarticulation au niveau du genou sur rat femelle de 250 à 300 grammes. Le pédicule vasculaire doit être prolongé jusqu'à l'émergence des vaisseaux iliaques primitifs. La réimplantation est réalisée sur rat mâle ou femelle de 300 g par anastomose au niveau de l'artère carotide commune et de la veine jugulaire externe. Le transplant est fixé en position cervicale dorsale après passage sous-cutané du pédicule via un prolongement de l'incision ventrale. La surveillance est maintenue jusqu'au sixième jour postopératoire mais, dès le troisième jour, les transplants viables sont exploitables pour étude histologique des dommages causés par la cryopréservation. Dans ces conditions, le taux de succès primaire est de 80%. 83% des transplants viables sont exploitables pour analyse histologique, soit 67% du total. Pour la phase d'étude de cryopréservation, nous fixons donc le nombre minimal d'animaux par bras à cinq afin de disposer d'au moins trois transplants exploitables par groupe. Si des

résultats encourageants se dégagent de l'utilisation d'un protocole donné, le poids modeste des rats syngéniques (environ 300 g) ne sera pas un obstacle à leur inclusion pour l'étude de la survie des transplants à long terme.

Afin de rendre le modèle transmissible, ce travail a permis la rédaction d'un article (Annexe 4). Le modèle sera par ailleurs utilisé pour la prochaine étape de ce projet, lors des travaux de congélation. Le DMSO sera utilisé comme cryoprotecteur et les programmes de descente et remontée en température seront comparables à ceux publiés pour la conservation d'ovaires entiers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ylipe. Textes sans parole. Paris: Le Dilettante; 2001
2. Hodin E, Martinot V, Patenotre P, Mortier P, Pellerin P. Reconstructions des pertes de substance du nez par greffe composite auriculaire. A propos de 30 cas. *Ann Chir Plast Esthet.* 1996;41(3):284–94
3. Hallock GG. Simultaneous transposition of anterior thigh muscle and fascia flaps: an introduction to the chimera flap principle. *Ann Plast Surg.* 1991;27(2):126–31
4. Foucher G, Merle M, Maneaud M, Michon J. Microsurgical free partial toe transfer in hand reconstruction: a report of 12 cases. *Plast Reconstr Surg.* 1980;65(5):616–27
5. Guimberteau JC, Baudet J, Panconi B, Boileau R, Potaux L. Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a preliminary report and 1-year follow-up of two cases. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(6):1135–47
6. Kann BR, Furnas DW, Hewitt CW. Past, present, and future research in the field of composite tissue allotransplantation. *Microsurgery.* 2000;20(8):393–9
7. Guthrie C. Applications of blood vessels surgery. In: Arnold E, editor. *Blood vessel surgery.* New York: Longman green; 1912. p. 113-31
8. Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News.* 1964;5:20
9. Hofmann GO, Kirschner MH. Clinical experience in allogeneic vascularized bone and joint allografting. *Microsurgery.* 2000;20(8):375–83
10. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med.* 2001;344(22):1676–9
11. Francois CG, Breidenbach WC, Maldonado C, Kakoulidis TP, Hodges A, Dubernard JM, et al. Hand transplantation: comparisons and observations of the first four clinical cases. *Microsurgery.* 2000;20(8):360–71
12. Jones TR, Humphrey PA, Brennan DC. Transplantation of vascularized allogeneic skeletal muscle for scalp reconstruction in renal transplant patient. *Transplant Proc.* 1998;30(6):2746–53
13. Petruzzo P, Dubernard JM. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. *Clin Transpl.* 2011;247–53
14. Diefenbeck M, Wagner F, Kirschner MH, Nerlich A, Mückley T, Hofmann GO. Outcome of allogeneic vascularized knee transplants. *Transpl Int.* 2007;20(5):410–8
15. Devauchelle B, Badet L, Lengelé B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet.* 2006;368(9531):203–9

16. Shanmugarajah K, Hettiaratchy S, Butler PEM. Facial transplantation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;20(4):291–7
17. Jiang HQ, Wang Y, Hu XB, Li YS, Li JS. Composite tissue allograft transplantation of cephalocervical skin flap and two ears. *Plast Reconstr Surg.* 2005;115(3):31e–35e
18. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet.* 2003;361(9376):2173–6
19. Hu W, Lu J, Zhang L, Wu W, Nie H, Zhu Y, et al. A Preliminary Report of Penile Transplantation. *Eur Urol.* 2006;50(4):851–3
20. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology.* 2004;48(2):157–78
21. Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys J.* 1981;36(3):653–75
22. Pegg DE, Diaper MP. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J.* 1988;54(3):471–88
23. Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber K-J, König K, et al. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg.* 2006;81(3):918–26
24. Karlsson JO, Cravalho EG, Borel Rinkes IH, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophys J.* 1993;65(6):2524–36
25. Karlsson JO. A theoretical model of intracellular devitrification. *Cryobiology.* 2001;42(3):154–69
26. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949;164(4172):666
27. Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology.* 1991;28(5):467–73
28. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology.* 1986;23(1):1–13
29. Ioannou A, Dalle Lucca J, Tsokos GC. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage. *Clin Immunol.* 2011;141(1):3–14
30. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med.* 1996;184(3):1155–60
31. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg.* 2005;19(4):572–84
32. Pegg DE. The preservation of tissues for transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2006;7(4):349–58
33. Ketheesan N, Kearney JN, Ingham E. The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogeneic cardiac valves. *Cryobiology.* 1996;33(1):41–53

34. Ingham E, Matthews JB, Kearney JN, Gowland G. The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin grafts. *Cryobiology*. 1993;30(5):443–58
35. Hirase Y, Kojima T, Takeishi M, Hwang KH, Tanaka M. Transplantation of long-term cryopreserved allocutaneous tissue by skin graft or microsurgical anastomosis: experimental studies in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1993;91(3):492–501
36. Lamb LS Jr, Willoughby JB, Willoughby WF. Morphologic and functional characteristics of alveolar macrophages following cryopreservation. *Cryobiology*. 1995;32(4):344–57
37. Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, Ganz R, Leunig M. Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(8):1420–9
38. Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the cryopreserved tracheal allograft in growing rabbits. *J Pediatr Surg*. 2003;38(12):1707–11
39. Hirase Y, Kojima T, Takeishi M, Matsui M, Terao Y. Long-term cryopreserved allogeneic nervous and vascular tissue transfers in monkeys. *Microsurgery*. 1996;17(6):301–5
40. Juhász A, Szilágyi A, Mikó I, Altorjay I, Kecskés G, Altorjay A. Esophageal replacement using cryopreserved tracheal graft. *Dis Esophagus*. 2008;21(5):468–72
41. Duquesnoy RJ. Is histocompatibility testing needed for composite tissue transplantation? *Transplant Proc*. 1998;30(6):2724–8
42. Donnez J, Dolmans M-M. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(4):787–96
43. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1165–72
44. Courbiere B, Caquant L, Mazoyer C, Franck M, Lornage J, Salle B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2697–706
45. Onions VJ, Webb R, McNeilly AS, Campbell BK. Ovarian endocrine profile and long-term vascular patency following heterotopic autotransplantation of cryopreserved whole ovine ovaries. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2845–55
46. Temmerman L, Vral A, Meire M, Verbeeck RM, Deschepper E, Dermaut LR, et al. Pulpal regeneration and root development after subcutaneous transplantation of cryopreserved immature teeth in rats. *Cryobiology*. 2012;64(2):81–90
47. Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol*. 2004;49(1):59–69
48. Izumi N, Yoshizawa M, Ono Y, Kobayashi T, Hamamoto Y, Saito C. Periodontal regeneration of transplanted rat teeth subcutaneously after cryopreservation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007;36(9):838–44
49. Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank. A preliminary study. *Cryobiology*. 2005;51(3):322–9

50. Rousvoal A. Réflexions sur l'utilisation d'allotransplants tendineux et ostéo-tendineux cryopréservés pour la reconstruction des doigts longs. *Th D Méd. Bordeaux* 2; 2006
51. Foucher G, Braun F, Merle M, Michon J. La technique du "doigt banque" dans les traumatismes complexes de la main. *Ann Chir.* 1980;34(9):693–8
52. Huang SL, Hou MZ, Yan CL. Reconstruction of the thumb by a free pedal neurovascular flap and composite phalanx-joint-tendon homograft: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg.* 1985;1(4):299–303
53. Dubert T. Etude de la conservation et des transferts de lambeaux inguinaux cryoconservés et revascularisés chez le rat. *Mémoire DU microchirurgie.* Paris 6; 1986
54. Meuli-Simmen C, Kehrer S, Eiman T, Schiestl R, Griffey S, Placik O, et al. Microvascular transplantation of cryopreserved knee joints. *Ann Plast Surg.* 1995;35(2):184–90
55. Zhang F, Attkiss KJ, Walker M, Buncke HJ. Effect of cryopreservation on survival of composite tissue grafts. *J Reconstr Microsurg.* 1998;14(8):559–64
56. Cui X, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Rinker B. Cryopreservation of composite tissues and transplantation: preliminary studies. *Cryobiology.* 2007;55(3):295–304
57. Guimberteau J-C, Bakhach J, Casoli V. Experimental and clinical experience with small composite tissue allotransplants and cryopreservation techniques. *Semin Plast Surg.* 2007;21(4):250–8
58. Ulusal BG, Ulusal AE, Ozmen S, Zins JE, Siemionow MZ. A new composite facial and scalp transplantation model in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(5):1302–11
59. Schoofs M, Cariou JL, Amarante J, Panconi B, Bovet JL, Baudet J. Microvascular free bone transfer: experimental technique on rat's femur. *Microsurgery.* 1984;5(1):19–23
60. Eduardo Bermúdez L, Santamaría A, Romero T, Calderó DF. Experimental model of facial transplant. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(5):1374–5
61. Bovet JL, Schoofs M, Baudet J. Etude expérimentale de la transplantation du péroné par anastomoses microchirurgicales chez le chien. *Ann Chir Plast.* 1982;27(3):279–83
62. Höhnke C, Russavage JM, Subbotin V, Llull R, Starzl TE, Sotereanos GC. Vascularized Composite Tissue Mandibular Transplantation in Dogs. *Transplant Proc.* 1997;29(1-2):995
63. Nazzal JA, Johnson TS, Gordon CR, Randolph MA, Lee WPA. Heterotopic limb allotransplantation model to study skin rejection in the rat. *Microsurgery.* 2004;24(6):448–53
64. Perez-Abadia G, Laurentin-Perez L, Gorantla VS, Francois CG, Vossen M, Brouha PCR, et al. Low-dose immunosuppression in a rat hind-limb transplantation model. *Transpl Int.* 2003;16(12):835–42
65. Shirbacheh MV, Ren X, Jones JW, Breidenbach WC, Jevans AW, Fernandez-Botran GR, et al. Pharmacokinetic advantage of intra-arterial cyclosporin A delivery to vascularly isolated rabbit forelimb. I. Model development. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(3):1185–90
66. Radu CA, Horn D, Kiefer J, Rebel M, Gebhard MM, Ryssel H, et al. Donor-derived transplant acceptance-inducing cells in composite tissue allotransplantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65(12):1684–91

67. Siemionow M, Klimczak A. Advances in the development of experimental composite tissue transplantation models. *Transpl Int.* 2010;23(1):2–13
68. Jones JW Jr, Üstüner ET, Zdichavsky M, Edelstein J, Ren X, Maldonado C, et al. Long-term survival of an extremity composite tissue allograft with FK506-mycophenolate mofetil therapy. *Surgery.* 1999;126(2):384–8
69. Kuo Y-R, Sacks JM, Lee WPA, Wu W-S, Kueh N-S, Yao S-F, et al. Porcine heterotopic composite tissue allograft transplantation using a large animal model for preclinical studies. *Chang Gung Med J.* 2006;29(3):268–74
70. Lee WP, Rubin JP, Cober S, Ierino F, Randolph MA, Sachs DH. Use of swine model in transplantation of vascularized skeletal tissue allografts. *Transplant Proc.* 1998;30(6):2743–5
71. Ren X, Shirbacheh MV, Ustüner ET, Zdichavsky M, Edelstein J, Maldonado C, et al. Osteomyocutaneous flap as a preclinical composite tissue allograft: swine model. *Microsurgery.* 2000;20(3):143–9
72. Üstüner ET, Zdichavsky M, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, Ray M, et al. Long-term composite tissue allograft survival in a porcine model with cyclosporine/mycophenolate mofetil therapy. *Transplantation.* 1998;66(12):1581–7
73. Handschel J, Burghardt S, Naujoks C, Kübler NR, Giers G. Parameters predicting complications in flap surgery [In Press]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212440312015209. consulté le 14 janvier 2013
74. Pohlenz P, Klatt J, Schön G, Blessmann M, Li L, Schmelzle R. Microvascular free flaps in head and neck surgery: complications and outcome of 1000 flaps. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(6):739–43

ANNEXE 1 : Données brutes

Rats donneurs		Date	Sexe	Poids	Côté	Durée op	Calibre A	Calibre V	Longueur pédicule	Commentaires
N°										
1		24.02.2011	M	600	G	5	1,6	2,3	30	Test, prélèvement fémoral
2		23.03.2011	M	670	G	4,5	1,8	2,1	28	Test, prélèvement fémoral
3		27.02.2012	M	550	D	5	1,6	2,3	48	
4		27.02.2012	M	550	G	4,5	1,6	2,3	48	
4		28.02.2012	M	460	G	4	1,4	1,3	42	Mort lors du 2e prélèvement
5		05.03.2012	M	520	D	4	1,1	1,8	43	
5		05.03.2012	M	520	G	3,5	1,1	1,8	43	
6		03.04.2012	M	410	D	4	1,3	2,0	45	
6		03.04.2012	M	410	G	4	1,3	2,0	45	
7		16.04.2012	M	510	D	4	1,9	2,1	52	
7		16.04.2012	M	510	G	3,5	1,9	2,1	52	
8		18.04.2012	M	330	D	3,5	1,4	1,8	48	
8		18.04.2012	M	330	G	3,5	1,4	1,8	48	
9		21.04.2012	M	540	D	4	1,4	1,7	50	
9		21.04.2012	M	540	G	3	1,4	1,7	50	
10		24.04.2012	M	340	D	3,5	1,2	1,6	43	
10		24.04.2012	M	340	G	3	1,2	1,6	43	
11		15.11.2012	M	360	G	3	1,3	2,2	43	Mort lors du 2e prélèvement
12		20.11.2012	M	450	G	2,5	1,5	2,0	42	
13		29.11.2012	M	350	G	3	1,6	2,2	35	Prélèvement iliaque externe (faute technique)
14		04.12.2012	F	350	G	2,5	1,2	1,8	46	
15		08.01.2013	F	500	G	3	1,1	2,0	48	

Rats receveurs																				
N°	N° don	Date	Sexe	Poids	Côté	Durée op	Calibre A	Tentatives A	Points A	Résult A	Calibre V	Tentatives V	Points V							
1	1	24.02.2011	M	600	G	5,5	1,3	1	5+2	OK	2,2	3	8+1							
2	2	23.03.2011	M	670	D	5	1,7	3	7+1	THR	2,0	2	8+2							
3	3D	27.02.2012	M	460	D	5,5	1,6	3	6+0	THR	1,5	7	6+2							
4	3G	27.02.2012	M	520	G	5	1,4	2	5+2	OK	2,4	3	8+1							
5	4	28.02.2012	M	440	G	4	1,3	1	6+1	OK	2,1	1	7+2							
6	5D	05.03.2012	M	400	D	4,5	1,2	2	5+2	OK	1,5	3	6+1							
7	5G	05.03.2012	M	430	G	4,5	1,3	2	6+1	THR	2,2	2	8+1							
8	6D	03.04.2012	M	410	D	4	1,4	3	7+0	OK	2,1	2	7+2							
9	6G	03.04.2012	M	360	G	3,5	1,4	1	5+2	OK	2,3	4	8+1							
10	7D	16.04.2012	M	370	D	3,5	1,3	2	6+1	OK	1,6	1	8+0							
11	7G	16.04.2012	M	390	G	4	1,2	2	5+1	OK	2,0	1	7+0							
12	8D	18.04.2012	M	410	D	3,5	1,4	1	6+0	OK	1,5	3	6+1							
13	8G	18.04.2012	M	430	G	3	1,3	1	6+0	OK	2,1	1	7+2							
14	9D	21.04.2012	M	370	D	3	1,1	1	5+0	OK	2,4	2	7+3							
15	9G	21.04.2012	M	400	G	4	1,6	2	6+1	OK	2,0	5	8+0							
16	10D	24.04.2012	M	450	D	2,5	1,8	1	6+0	OK	1,6	1	7+1							
17	10G	24.04.2012	M	360	G	2,5	1,4	1	6+0	OK	2,1	1	6+2							
18	11	15.11.2012	M	360	G	3	1,3	1	6+0	OK	2,3	1	8+0							
19	12	20.11.2012	M	400	G	3,5	1,2	1	6+1	OK	1,6	2	8+0							
20	13	29.11.2012	M	400	G	2,5	1,5	1	5+0	OK	1,8	1	8+0							
21	14	04.12.2012	F	350	G	3	1,6	1	6+0	OK	2,0	1	7+0							
22	15	08.01.2013	M	410	G	2,5	1,5	1	6+1	OK	2,1	1	8+0							

	Résult V	Survie greffon	Décès rat	Commentaires
OBST	1	spont J1	test, autogreffe, pas tapis chauffant	
OBST	0	spont réveil	test, autogreffe, pas tapis chauffant	
OBST	0	eutha J1	hypovascularisé	
THR	2	eutha J3	veineux	
OK	1	euthaJ2	pas de retour veineux, twist ?	
OK	1	spont J1	cause ?, greffon veineux	
THR	0	eutha J1	hypovascularisé	tunnel sous-muscu
OK	4	spont J4	cause ?	ouverture sous-cut
OK	6	eutha J6	greffon position latérale, fin de protocole	
OK	6	eutha J6	parage musculaire extensif, nécrose cutanée jambe, pied vascularisé, fin de protocole	
OK	6	eutha J6	parage musculaire extensif, nécrose cutanée jambe, pied vascularisé, fin de protocole	
THR	1	spont J1	cause ?	
OK	3	spont J3	cause ?	
OK	0	eutha J1	pas de retour veineux	
OBST	2	eutha J3	veineux	
OK	4	spont J4	troubles respiratoires	
OK	6	eutha J6	fin de protocole	
OK	5	spont J5	troubles respiratoires	
OK	0	eutha J1	pas de retour veineux, moins de rinçage	
OK	0	spont réveil	surdosage héparine ?	
OK	4	spont J4	troubles respiratoires	
OK	6	eutha J6	fin de protocole	

ANNEXE 2 : Dossier de demande d'approbation du Comité d'Ethique

COMITE D'ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE NORD-PAS-DE-CALAIS

DEMANDE D'APPROBATION D'UN PROTOCOLE D'UTILISATION DE VERTEBRES VIVANTS

Titre du projet : ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA CRYOPRÉSERVATION
D'ALLOTRANSPLANT PARTIEL DE MEMBRE : MISE AU POINT D'UN MODELE ANIMAL
CHEZ LE RAT

Personne responsable de l'étude :

Nom, prénom : Dr Pierre Guerreschi
Adresse et Nom du Laboratoire ou de l'Unité : DHURE
Faculté de Médecine - Pôle Recherche
Place de Verdun
59045 Lille Cedex
Tél : 03.20.44.49.03 Fax : 03.20.44.54.25
N° d'autorisation NIVEAU 1 : 59 35 0251 en date du 27/07/11

Autorisation de pratique de chirurgie (si nécessaire) oui X non

Etablissement d'expérimentations animales :

Nom du Directeur du Laboratoire : Dr Thomas Hubert
Adresse : Faculté de Médecine - Pôle Recherche
Place de Verdun
59045 Lille Cedex
Téléphone : 03 20 62 34 63 Fax :
Email: thubert@univ-lille2.fr
N° autorisation : 59 35 0129 en date du 03/06/09

Autorisation de pratique de chirurgie (si nécessaire) oui X non

Techniciens titulaires d'un niveau 2 :

- Nom : Arnold DIVE
- Nom : Michel POTTIER

Personnes non formées : collaborateurs externes ou personnel récemment intégré

- Nom : Adrien Bonnet sous la responsabilité de Nom : Dr Pierre Guerreschi (1)

Remplaçant(s) du responsable de l'étude :

	Remplaçant ⁽¹⁾
Nom	Dr Pierre Fayoux
Adresse	Hôpital Jeanne de Flandre Avenue Eugène Avinée 59000 LILLE Cedex
Téléphone	03 20 44 47 10
fax	
E-mail	
N° d'autorisation (niveau 1)	59 35 0252 en date du 13/10/11

⁽¹⁾ Personne assurant effectivement l'encadrement au moment de la manipulation des animaux

Lieu et conditions d'hébergement des animaux :

Pour rappel, le lieu d'hébergement des animaux doit correspondre à une animalerie ayant l'agrément des services vétérinaires :

Institution : Animalerie conventionnelle du DHURE
 Adresse : Faculté de Médecine – Pôle Recherche
 Place de Verdun
 59045 Lille Cedex

N° d'agrément de l'Etablissement en Expérimentations Animales: B59-35010 en date du 6 mai 2010

Responsable de l'animalerie : Dr Thomas Hubert
 N° d'autorisation: 59 35 0129 en date du 3 juin 2009

I. IDENTIFICATION (Items 1-3).**1/ Objectif du dépôt de ce dossier:**

A/ Dossier concernant une étude ponctuelle : oui non
 B/ Dossier concernant un protocole standard : oui non
 C/ Renouvellement d'un dossier en cours (donnez le n°)* : oui non
 Si OUI, un comité délégué a t'il apporté des aménagements oui non
 D/ Amendement d'un dossier existant (donnez le n°):
 D.1/ Ce document remplace le dossier accepté oui non
 D.2/ Ce document est une addition à un dossier accepté oui non

*renouvellement tous les 3 ans

2/ Objectif de l'utilisation d'animaux :

A/ X Recherche
 Enseignement
 Production
 Etude réglementaire ⁽¹⁾
 Autres: expliquez.

⁽¹⁾ Indiquer la référence du texte réglementaire (ligne directrice UE, OCDE, AFNOR...)

B/ Existe-t-il des méthodes *in vitro* préalable à l'expérimentation proposée? Expliquez. NON : évaluation d'une technique chirurgicale, pas de modèle ex-vivo disponible

C/ Justification de l'utilisation animale. Confirmez le fait que les activités concernées ne constituent pas des répétitions non justifiées d'études antérieures en cochant un des points suivants:

- X Ces études n'ont jamais été réalisées.
Les études antérieures furent non concluantes (justifiez) :
Bien que semblables à d'autres expériences, ces études augmentent le niveau de connaissance à leur sujet (justifiez) :
Les animaux seront utilisés à des fins d'enseignement.

3/ Date estimée de début/de fin de l'utilisation d'animaux ou de période de validité d'un protocole général?

3.1 protocole d'une étude ponctuelle
Début proposé : Janvier 2013
Durée estimée : 2 ans

3.2 protocole standard : période de validité
Début :
Durée estimée:

II. DESCRIPTION DES ANIMAUX (Items 4-9).

4/ Espèce, souche : Rats Sprague Dawley

5/ Origine des animaux : unité de reproduction interne à l'animalerie

- 6/** A/ Sexe : mâles
B/ Age approximatif : 8 à 12 semaines, suffisamment pour un poids mini de 350g
C/ Conditions spéciales de stabulations :
 - Eclairage 10 heures par jour
 - Température 20 +/- 1°C
 - Hygrométrie 50 +/- 10%
 - Régime alimentaire : eau et granulés standards ad libitum

7/ Statut sanitaire des animaux

- SPF
 SOPF
X Conventionnel

8/ Nombre d'animaux utilisés

X nombre d'animaux par groupe expérimental : 15 rats donneurs, 30 receveurs
X nombre de lots prévus (fourchette) 1

9/ Méthode d'identification des animaux :

Cages individuelles annotées

10/ Devenir des animaux en fin d'étude :

Euthanasie par injection intracardiaque de T61 sous anesthésie générale

III. RESUME ET OBJECTIFS DU TRAVAIL (Item 10)

10/ Décrivez succinctement l'étude proposée, ses objectifs et les retombées scientifiques attendues. Donnez un descriptif précis de toutes les procédures, méthodes et protocoles concernant l'utilisation animale, ou les échantillons collectés.

OBJECTIF :

La cryopréservation des tissus composites permettra de créer des banques de petits segments de membre, de type complexe articulaire interphalangien ou tendon digital fléchisseur vascularisé, afin d'optimiser la reconstruction des doigts par des procédures d'allotransplantation.

La coexistence de tissus de nature très diverse (peau, muscle, os vaisseaux, ...) dans ce type de transplant représente un défi dans l'élaboration d'un protocole de cryopréservation.

Pour étudier les effets de la congélation, il est indispensable de disposer d'un modèle animal fiable et reproductible. Par ailleurs, celui-ci doit être validé et publié afin d'être utilisé par d'autres centres de recherche.

Nous proposons dans cette étude la validation du protocole suivant chez le rat : prélèvement chez un rat donneur de la partie distale des deux membres postérieurs. Le pédicule vasculaire permet le rinçage des transplants par diverses solutions (héparine, cryoprotecteur, ...). Chaque transplant est immédiatement réimplanté chez un rat receveur, au niveau des vaisseaux cervicaux. L'étude de la survie du transplant est limitée à 6 jours afin d'éviter l'apparition des phénomènes de rejet.

Une fois le modèle validé, l'essai des protocoles de congélation fera l'objet d'études ultérieures. Les procédures techniques spécifiques seront facilement intercalées entre le prélèvement et la réimplantation des transplants.

PROTOCOLE :

1) J0

- Prélèvement sous anesthésie générale par Isoflurane d'un segment distal des 2 membres postérieurs chez un rat donneur euthanasié avant le réveil. Intervention sur tapis chauffant, monitoring cardiorespiratoire continu. Analgésie préventive réalisée dès l'induction anesthésique par injection sous-cutanée de Buprénorphine 0,1 mg/kg.
- Réimplantation sous anesthésie générale chez 2 rats receveurs :
Anesthésie générale par Isoflurane, installation sur tapis chauffant avec monitoring de la température, de la fréquence cardiaque, respiratoire et de la saturation.
Les anastomoses vasculaires se font par voie antérieure au niveau de l'artère carotide primitive et de la veine jugulaire externe et le greffon est fixé en cervical dorsal en dehors du champ visuel pour prévenir l'automutilation. La circulation cérébrale est préservée via le polygone de Willis.
Durée de l'intervention environ 3 heures par rat.
- Analgésie préventive réalisée dès l'induction anesthésique. En début d'intervention : injection sous-cutanée de Buprénorphine 0,1 mg/kg et pose d'un patch de Fentanyl 100 microg/kg/h. En fin d'intervention : instillation locale de Bupivacaïne.
- Monitoring continu pendant l'intervention jusqu'au réveil complet.

2) J1 à J5

- Maintien en cage individuelle pour éviter l'hétéromutilation.
- Boissons et alimentation ad libitum.
- Surveillance clinique quotidienne du rat : comportementale (vigilance, réactions aux stimulations sonores, exploration de son environnement), neurologique (mobilité des quatre membres natifs, ouverture palpébrale, mouvements anormaux ou épileptique, ataxie proprioceptive, syndrome vestibulaire ou cérébelleux), respiratoire (fréquence respiratoire, signes de tirage, toux, éternuements)
- Surveillance clinique quotidienne du greffon : aspect général (propreté, lésion cutanées, signes de morsure), disposition (position, fixation du pied, mobilité)

intempestive), coloration, temps de recoloration capillaire, saturation en oxygène (saturomètre, comparaison à un membre natif).

- Changement du patch de Fentanyl au 3^e jour.
- Enthanasie au 6^e jour par injection intrapéritonéale de T61.

REMARQUE : Pas de protocole immunosuppresseur car évaluation de la survie du greffon à court terme, avant la survenue des signes de rejet aigu de greffe.

IV. PREVENTION ET TRAITEMENT DE LA DOULEUR ET/OU DU STRESS (Items 11-13).

11/ Prévention de la douleur et du stress.

Expliquez ce qui sera mis en œuvre pour prévenir la douleur et le stress

Cages individuelles

Analgesie per- et post-opératoire systématique : En début d'intervention : injection sous-cutanée de Buprénorphine 0,1 mg/kg et pose d'un patch de Fentanyl 100 microg/kg/h. En fin d'intervention : instillation locale de Bupivacaïne. Changement du dispositif transdermique tous les 3 jours.

Pas de manipulation douloureuse en dehors de l'intervention chirurgicale, durée approximative 3 heures

Choix du site de transplantation sans perturbation du champ de vision

12/ Douleur potentielle et stress liés à l'utilisation des animaux.

- A/ Aucune douleur, aucun stress (passez à l'item 14).
- B/ Toute douleur ou stress occasionné sera minime et momentané (Justifiez et passez à l'item 14).
- C/ Prévention des douleurs et stress éventuels: les médications appropriées ou autres méthodes (y inclus l'euthanasie) seront utilisées pour prévenir ou supprimer tous les stress ou douleurs significatifs (passez à l'item 13A).
- D/ Non prévention et traitement de la douleur et du stress :
 - aucune méthode n'est disponible pour supprimer la douleur ou le stress (passez à l'item 13B),
 - les méthodes disponibles interfèrent avec l'étude (passez à l'item 13B)

13. A/ Moyens utilisés pour supprimer la douleur ou le stress.

Donnez une liste des médications contenant les doses, voie, durée et fréquence d'utilisation des molécules qui seront utilisées pour soulager la douleur et le stress.

Anesthésique: Isoflurane 5% dans O₂ en induction
Isoflurane 1 à 2% dans O₂ continu en entretien

Analgesique: Buprénorphine 0,1mg/kg SC, dose unique en début d'intervention
Fentanyl 100 µg/kg/h patch en début d'intervention, changement à 3 j
Bupivacaïne en instillation locale en fin d'intervention

Anti-inflammatoire: 0

Euthanasie:

Méthode : injection intracardiaque de 3 ml de T61 sous anesthésie générale par inhalation d'Isoflurane

Classement de la validité (selon CNRS juin 2000) : 4

Autres mesures (environnement physique, social, ...) : cages individuelles, environnement stable

13. B/ Pas d'alternative aux procédures entraînant de la douleur ou du stress.

- Justifiez cette absence
 - Indiquez la durée de la douleur et du stress.
- Autorisation préfectorale oui non

V. PRECISEZ SI LES PROCEDURES SUIVANTES SONT ENVISAGEES (Item 14)

14/ Vérifiez chacune des procédures proposées, ensuite répondez aux points correspondants aux procédures que vous avez sélectionnées.

A/ Contention chimique. oui non

Si OUI : Justification de cette dernière.

Intervention chirurgicale

Donnez la liste des médicaments, doses, voies, fréquence et durée.

Isoflurane 5% dans O2 par voie respiratoire en induction (15 minutes)

Isoflurane 1,5% voie respiratoire en entretien (+/- 3 heures), inhalation continue

B/ Prélèvement . oui non

Si OUI :

Nature du prélèvement :

Mode de prélèvement :

Lieu :

Fréquence :

Volume :

Moyens de contention (si nécessaire) :

Agent d'anesthésie (éventuel) :

C/ Inoculation Injection. oui non

Si OUI :

Voie d'administration

Adjuvants

Excipients

Méthode d'euthanasie (ou références si disponibles).

Fréquence

Volume (ml/kg)

D/ Cathétérisation ou instrumentation. oui non

Si OUI : Décrivez la technique (ou références si disponibles).

E/ Chirurgie (si non applicable passez au point F) . oui non

Si OUI :

Une chirurgie terminale est planifiée.

X Une seule intervention est planifiée.

Plusieurs interventions mineures sont planifiées.

Plusieurs interventions majeures sont planifiées.

1/ Description en annexe de la procédure (y compris durée prévue de l'intervention et de l'anesthésie), joindre références si disponibles.

2/ Chirurgie conservatrice, soins et monitoring.

Utilisez la check-list suivante pour décrire les soins et le plan de suivi. Indiquez ce qui sera fait, sa fréquence et durée.

Soins et monitoring pré-chirurgicaux.

- FC (fréquence cardiaque), FR (fréquence respiratoire), T°, état général 1 fois dans les 24h précédant l'anesthésie.
- X Inspection visuelle de l'état général 1 fois dans les 24h avant l'anesthésie.
- X Retrait de l'alimentation et de la boisson 12 à 24h avant l'anesthésie.
- Prémédication. Donnez les noms, doses, voies, fréquences et durées.
- Autre(s). Spécifiez:

Soins et monitoring durant la chirurgie.

- X Conditions aseptiques : tonte large de la zone opératoire, déterision à l'alcool à 70° et désinfection cutanée par Chlorhexidine alcoolique non colorée afin de ne pas modifier la surveillance postopératoire
- X Anesthésiques (donnez en annexe les noms, doses, voies, fréquences et durées) : cf chapitre IV item 13 A
- Fluidothérapie.
- X FC, FR, saturation en continu pendant la procédure.
- X Prise de température en continu pendant la procédure.
- X Autre(s). Spécifiez : intervention réalisée sur tapis chauffant

Soins et monitoring postopératoires.

- X Prise de température en continu pendant la phase de réveil.
- X Durée de réveil : 20 minutes
- X Douleur postopératoire : prévention systématique par morphiniques
- X Analgésique : cf chapitre IV item 13 A
- Autre(s). Spécifiez :

3/ Analgésie postopératoire.

- X Une analgésie postopératoire sera systématiquement administrée.
- Une analgésie postopératoire sera administrée lorsque des signes de douleur ou de stress seront présentés.
- Une analgésie postopératoire ne sera donnée en aucune occasion. Justifiez

4/ Nombreuses chirurgies majeures.

Si de multiples procédures majeures sont nécessaires, donnez (en annexe) au Comité les arguments suffisants pour l'acceptation de cette dérogation aux législations en ce domaine :

F/ Stress d'ordre nutritionnel.

oui non X

Si OUI, Indiquez :

- la nature :
- la durée du stress :
- la justification scientifique :

G/ Exposition à des agents toxique, physique (radioéléments) ou biologique.

Les animaux seront-ils exposés à des dangers biologique, physique ou chimique ? oui non X

Précisez leur nature.

Agent(s):

Dose et voie d'administration:

Fréquence et durée d'exposition:

Durée de la conservation des animaux après l'exposition:

Effets sur l'animal: connus oui / non, si oui lesquels

Suivi et fréquence des observations et des soins:

Gestion de la douleur et/ou du stress provoqués:

H/ Etudes comportementales induisant douleur, souffrance, inconfort ou dommage durable.

oui non

Si OUI, indiquez :

la nature :

la durée du stress :

la justification scientifique :

VI. SIGNATURES.

Signatures et date.

Cette signature suppose que le responsable de l'étude et le directeur de laboratoire, ou la personne responsable de l'utilisation des animaux, reconnaissent leur pleine responsabilité et leur accord avec les procédures décrites ci-dessus. Si à un moment quelconque de cette étude, un changement dans l'utilisation des animaux doit être apporté, ils acceptent de soumettre un amendement au dossier pour analyse à la commission d'éthique. Les signataires, en signant ce document, confirment que les personnes impliquées dans cette étude possèdent une formation adéquate en ce qui concerne les conditions de maintenance et d'expérimentation animale.

Signatures :

Responsable de la demande : P. GUERRESCHI

Date: 17 décembre 2012

ANNEXE : procédure chirurgicale

RAT DONNEUR : durée estimée 3h

- 1) Anesthésie générale par Isoflurane en inhalation
- 2) Tonte et désinfection cutanée
- 3) Injection sous-cutanée de Buprénorphine
- 4) Installation en décubitus dorsal
- 5) Prélèvement des 2 membres postérieurs par désarticulation au genou et section des muscles à la partie distale de la cuisse
- 6) Dissection du pédicule artérioveineux jusqu'à l'aorte et la veine cave dont on récupère un manchon
- 7) Euthanasie avant réveil

PREPARATION DES GREFFONS : durée estimée 30 minutes

- 1) Rinçage des 2 membres au sérum héparine par le manchon aortique jusqu'à obtention d'un liquide clair par la veine cave
- 2) Parage musculaire des muscles de la cuisse
- 3) Séparation des 2 pattes, le pédicule définitif correspond à l'iliaque commune

RATS RECEVEURS : 2 individus (1 greffon par individu), durée estimée 3h par rat

- 1) Anesthésie générale par Isoflurane en inhalation
- 2) Tonte et désinfection cutanée
- 3) Mise en place du monitoring et du tapis chauffant
- 4) Injection sous-cutanée de Buprénorphine et mise en place du patch de Fentanyl fixé par adhésif sur le ventre
- 5) Installation en décubitus dorsal
- 6) Incision cervicale ventrale transversale, repérage et mise sur lac de l'artère carotide commune et de la veine jugulaire externe du côté opposé à la patte réimplantée
- 7) Anastomoses microchirurgicales par voie ventrale : terminoterminal de l'artère iliaque commune sur le moignon d'amont de l'artère carotide commune et terminoterminal de la veine iliaque commune sur le moignon d'aval de la veine jugulaire externe
- 8) Installation en décubitus latéral
- 9) Incision cervicale latérale et dorsale dans le prolongement de l'incision antérieure,
- 10) Fixation du greffon en cervical dorsal par points musculaires profonds et points séparés cutanés. Le pied est fixé à la jambe pour éviter les mouvements intempestifs et la présence du greffon dans le champ de vision qui pourrait induire une automutilation
- 11) Instillation locale de Bupivacaïne
- 12) Fermeture de la voie d'abord par points séparés cutanés
- 13) Retrait du monitoring et du tapis chauffant après réveil complet
- 14) Surveillance quotidienne du rat et du greffon pendant 7 jours

ANNEXE 3 : Avis du Comité d'Ethique en Expérimentation Animale

CEEA NORD PAS-DE-CALAIS

Tél. : 03.20.87.79.67. – Fax : 03.20.87.73.60

e-mail : ceea.npdc@univ-lille2.fr

Dr David Dombrowicz
Inserm U1011
Université Lille - Nord de France
Institut Pasteur de Lille
1, rue du Professeur Calmette BP245
59019 LILLE Cedex

Monsieur Pierre Guerreschi
DHURE
Faculté de Médecine
Université Lille 2.

Lille, le 21 janvier 2013,

Cher Collègue,

J'ai le plaisir de vous informer que le comité d'éthique a émis un avis favorable sur le protocole CEEA 042012: "ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA CRYOCONSERVATION D'ALLOTRANSPLANT PARTIEL DE MEMBRE : MISE AU POINT D'UN MODELE ANIMAL CHEZ LE RAT." sous réserve des modifications suivantes.

- p5, item 10 Revoir les conditions d'anesthésie/analgsie du rat donneur. En effet, même si le rat donneur est amené à être euthanasié, une simple anesthésie à l'isoflurane sans administration d'aucun analgsique paraît peu adaptée au prélèvement des 2 membres postérieurs comme indiqué. Il est indispensable d'utiliser un analgsique puissant lors de la réalisation de cet acte d'une durée de 3 heures.
- Indiquer avec précision les paramètres de « Surveillance quotidienne du rat et du greffon pendant 7 jours ».
- p7, item 13.A : préciser les doses de T61 injectées ;
- p8, item 14.B : non renseigné ;
- p9, item 14.E : préciser les conditions d'asepsie ;
- La personne non formée M A Bonnet ne pourra pas pratiquer le geste chirurgical sur l'animal, pour cela il lui faut impérativement les formations réglementaires.

Cordialement



David Dombrowicz

ANNEXE 4 : Article correspondant (sans figure)

MISE AU POINT D'UN MODELE ANIMAL CHEZ LE RAT POUR L'ETUDE DE LA CRYOPRESERVATION DES TISSUS COMPOSITES

A. BONNET¹, P. GUERRESCHI¹, V. DUQUENNOY-MARTINOT¹, M. SCHOOFS³

1. Service de Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique,
Hôpital Roger Salengro, CHRU Lille,
2 avenue Oscar Lambret
59037 Lille Cedex, France
2. SOS mains et doigts
Clinique Lille Sud,
96, rue Gustave Delory
59810 Lesquin, France

Auteur correspondant :

A. BONNET
TEL : 06.09.02.07.54
FAX : 03.20.44.54.25
MAIL : adrien_bonnet@msn.com

RESUME

La cryoconservation des tissus composites permettra de créer des banques de petits segments de membre supérieur, de type complexe articulaire interphalangien ou tendon fléchisseur vascularisé, afin d'optimiser la reconstruction des doigts par procédures d'allotransplantation. La coexistence de tissus de nature diverse dans ce type de transplant représente un défi dans l'élaboration d'un protocole de cryoconservation. Pour étudier les effets de la congélation, il est indispensable de disposer d'un modèle animal fiable. Il doit en outre être reproductible et transmissible car la multiplicité des paramètres à étudier impose un travail multicentrique.

Nous proposons l'évaluation prospective d'un modèle d'étude chez le rat, basé sur un transplant de segment distal de membre postérieur prélevé sur individu secondairement sacrifié. Ce segment est réimplanté sur un rat receveur au niveau du cou. La surveillance est assurée jusqu'au 6^e jour postopératoire puis l'animal est euthanasié avant apparition des phénomènes de rejet. Le transplant peut alors être utilisé pour analyse histologique.

22 transplants sont prélevés sur 15 rats donneurs et réimplantés sur 22 rats receveurs. La durée moyenne de prélèvement est de 3,66 heures et de réimplantation de 3,73 heures. La longueur du

pédicule vasculaire est en moyenne de 46 mm. Le calibre des vaisseaux donneurs et receveurs est comparable, respectivement 1,42 et 1,40 mm pour les artères, 1,93 et 2,0 mm pour les veines. Après une courbe d'apprentissage de 7 réimplantations, le taux de succès primaire est de 80% et 83% des transplants viables sont disponibles pour analyse anatomo-pathologique.

La généralisation de ce modèle est intéressante car elle permettra une uniformisation des études de la cryoconservation des tissus composites et facilitera la comparaison et l'extrapolation des résultats.

Mots-clés : modèle animal, rat, microchirurgie, allotransplantation tissus composites, cryoconservation

INTRODUCTION

Grâce aux progrès des traitements immunosuppresseurs, l'allotransplantation de tissus composites, envisagée depuis longtemps dans le cadre de la recherche (1,2), a connu un essor récent dans le cadre de la reconstruction de la face et du membre supérieur (3–7). En raison des difficultés logistiques d'un prélèvement frais sur don d'organe, cette technique est confinée à l'heure actuelle aux séquelles de macroamputation du membre supérieur (7), aux pertes de substances laryngées (8) et aux délabrements importants de la face dont la reconstruction par techniques « conventionnelles » nécessiterait de nombreuses interventions pour un résultat médiocre (3). Cependant, des cas sporadiques sont reportés dans de nombreux autres domaines (1). Dans le cadre de la chirurgie de la main, les indications d'allotransplantation de tissu composite sont potentiellement très nombreuses et concernent principalement les arthroplasties et les reconstructions de l'appareil fléchisseur des doigts (9). Le caractère purement fonctionnel d'un tel type de prise en charge et la disproportion entre la lourdeur d'une transplantation à l'état frais et le bénéfice escompté représente le principal frein au développement de ces techniques. Cela impose de s'affranchir des contraintes de la transplantation immédiate. Une des solutions consisterait à créer une banque de tissus cryoconservés, composée de segments de doigts : articulations interphalangiennes, tendon fléchisseur, appareil extenseur, ... avec leur pédicule vasculaire (10,11).

La principale difficulté technique de ce projet est l'élaboration d'un protocole de cryoconservation qui n'interférerait pas avec les impératifs fonctionnels de la reconstruction envisagée. Les méthodes actuelles de cryoconservation ont prouvé leur efficacité sur les contingents tissulaires homogènes (12). Celle-ci est évaluée par le pourcentage de survie des tissus après remise en température. Dans le cas des tissus composites, il s'agit de trouver le meilleur compromis en terme de survie cellulaire et de reprise de fonction entre des contingents tissulaires hétérogènes qui présentent des réactions différentes aux processus de congélation (13). Peu d'études sur la cryoconservation des tissus composites sont disponibles (14–21). Les différents essais de cryoconservation de tissu composite disponible dans la littérature sont encourageants mais n'ont pas encore permis de définir un protocole optimal. De plus l'extrapolation des résultats des différentes études est rendue difficile en raison de la grande disparité méthodologique entre les équipes (tableau 1). L'espèce animale utilisée est majoritairement le rat. Deux équipes ont utilisé le lapin (14,20), une autre a publié les résultats d'emblée chez l'Homme (16). En revanche, la nature du transplant varie beaucoup : doigts humains, segment de membre, lambeau épigastrique, lambeau inguinal, gonade femelle et mâle, queue. De même, le nombre de cas et les durées de congélation et de surveillance sont très disparates. A l'inverse des publications pour l'évaluation des protocoles d'immunosuppression (22), aucune étude ne propose de modèle animal spécifique à l'étude des effets de la cryoconservation des tissus composites. Nous proposons, afin de combler cette lacune, un modèle animal fiable et reproductible pour l'étude de la cryoconservation des tissus composites.

MATERIEL ET METHODE

L'ensemble du protocole d'étude a été approuvé par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale.

Le cahier des charges du modèle est élaboré en amont, incluant les éléments suivants : espèce animale facilement disponible et robuste, tissus prélevés représentatifs des transplants qui seront utilisés in fine (os, muscle, peau, graisse, vaisseaux, nerfs, cartilage), système clos axé sur un seul pédicule de calibre comparable à ceux des transplants finaux et suffisant pour qu'il ne représente pas une barrière technique, site receveur facile d'accès et permettant une surveillance aisée et indolore pour l'animal, vaisseaux receveurs de calibre équivalent au pédicule, positionnement du transplant compatible avec une vie de relation normale de l'animal, interposition facile de la phase de cryoconservation, utilisation de matériel standard avec un coût global limité.

Une étude préliminaire a été réalisée sur quatre rats. Deux ont été disséqués après euthanasie afin de vérifier la faisabilité technique sur des critères purement morphologiques (taille et longueur des pédicules, site de transplantation). Deux autres rats ont bénéficié d'une IRM (micro-IRM 7T : BRUKER BioSpec 70/20 USR, Laboratoire d'imagerie du vivant, Lille). Les images sont traitées grâce au logiciel OsiriX v3.9.4. Le premier, anesthésié pour les besoins de l'examen, a permis de compléter l'étude vasculaire et musculaire du transplant et du site receveur au niveau cervical (figure 1). Le deuxième a été perfusé d'un mélange de gélatine et de Gadolinium puis sacrifié. Le transplant a ensuite été disséqué et placé en position finale. L'IRM a permis de mieux préciser le trajet intramusculaire du pédicule au niveau cervical.

Le modèle élaboré initialement utilise des rats Sprague-Dawley mâles d'au moins 500 grammes, pour augmenter la taille et la longueur du pédicule. L'ensemble des manipulations chirurgicales est réalisé sous anesthésie générale induite et maintenue par Isoflurane en inhalation au masque. L'animal est installé sur tapis chauffant, un monitoring de la fréquence cardiaque, de la saturation et de la température est mis en place. L'analgésie est assurée, en début d'intervention, par une injection sous-cutanée de Buprénorphine 0,1 mg/kg et pose d'un dispositif transdermique de Fentanyl 100 µg/kg/h (renouvelé au 3^e jour). En fin d'intervention, une instillation locale de Bupivacaïne complète l'analgésie. Le transplant est un segment distal de membre postérieur prélevé par désarticulation au niveau du genou en conservant l'ensemble des tissus de la jambe et du pied, incluant les masses musculaires. Le pédicule artérioveineux est disséqué jusqu'en iliaque primitif, au ras de l'aorte abdominale et de la veine cave caudale. Le transplant est rincé manuellement par 40 à 50 ml d'un mélange de sérum salé isotonique et d'Héparine à 100 UI/ml. Le rat donneur est euthanasié par injection intracardiaque de T61 après prélèvement des deux membres postérieurs. Sur un rat receveur, un transplant est positionné de façon hétérotopique en cervical dorsal médian, le pied et la jambe du transplant étant solidarités (figure 2), afin de ne pas perturber le champ de vision et le comportement exploratoire du rat, de le protéger des automutilations et d'être immédiatement accessible au contrôle visuel et tactile. Le pédicule est tunnalisé entre les muscles du cou jusqu'en cervical ventral pour être anastomosé en termino-terminal sur l'artère carotide commune et la veine jugulaire externe du même côté que le prélèvement du transplant pour optimiser la longueur de pédicule. En cours d'étude, le cheminement du pédicule est modifié pour être strictement sous-cutané.

En postopératoire, les rats sont placés en cages individuelles. La surveillance est assurée quotidiennement par l'opérateur. Elle est prolongée jusqu'au 6^e jour postopératoire puis les rats sont euthanasiés par injection intracardiaque de T61 sous anesthésie générale. L'animal peut être euthanasié plus précocement en cas de perte avérée du transplant ou d'affection somatique rendant son maintien en vie contraire aux règles d'éthique en expérimentation animale. L'absence d'immunosuppression est délibérément choisie afin de ne pas augmenter les manipulations douloureuses et dans la mesure où les phénomènes de rejet aigu des transplants apparaissent entre 7 et 10 jours.

Le critère de surveillance principal est la durée de survie du transplant. Elle est évaluée sur animal vigile par les points suivants : couleur, chaleur et temps de recoloration capillaire de la plante

du pied, saturation en oxygène du transplant comparée à un membre postérieur natif. Les critères secondaires concernent les conditions opératoires du prélèvement (durée, calibre et longueur des vaisseaux), les conditions opératoires de la réimplantation (durée, calibre des vaisseaux receveurs, résultat immédiat des anastomoses) et les conditions de survie du rat receveur (état et comportement général du rat, douleur, signes d'affection somatique, aspect global du transplant et de son positionnement). L'étude de corrélation statistique des données est traitée grâce au logiciel SPSS version 20.0, par un test de corrélation non paramétrique de Spearman. La significativité du coefficient est évaluée avec un risque α fixé à 5 %. Le reste des données est traité par moyennes.

RESULTATS

La cohorte de rats donneurs comporte 15 individus, dont 13 mâles et 2 femelles. 22 transplants sont prélevés et tous sont réimplantés. Les deux premiers rats, à titre de test, sont prélevés d'un seul côté et réimplantés sur le même animal. Le poids moyen est de 461 grammes pour un minimum de 330 g et un maximum de 670 g.

Les transplants sont prélevés à 68% du côté gauche, procurant un meilleur confort opératoire dans la configuration de notre laboratoire. La durée du prélèvement est en moyenne de 3,66 heures (max 5 h – min 2,5 h) avec une courbe d'apprentissage évidente : 4,36 heures en moyenne pour les sept premiers rats et 3,33 pour les quinze derniers (figure 3). Le calibre moyen de l'artère iliaque primitive est de 1,42 mm (min 1,1 mm – max 1,9 mm) et celui de la veine 1,93 mm (min 1,3 mm – max 2,3 mm). La longueur du pédicule est en moyenne de 45,7 mm (min 42 mm – max 52 mm) quand le prélèvement est réalisé de façon optimale. Ni le calibre des vaisseaux ni la longueur du pédicule ne sont corrélés au poids de l'animal.

22 rats ont reçu un transplant, dont 21 mâles et 1 femelle. Le poids moyen est de 427 grammes (min 350 g – max 670 g). La durée moyenne de réimplantation, incluant la mise en place du transplant est de 3,73 heures (min 2,5 h en fin d'étude – max 5,5 h en début d'étude) (figure 3). Le calibre moyen de l'artère carotide est de 1,40 mm, celui de la veine jugulaire externe de 2,0 mm. Il n'y a également pas de corrélation avec le poids.

7 rats sont réimplantés avec tunnellisation du pédicule : 3 sont morts le jour ou le lendemain de l'intervention (deux d'hypothermie et un d'hypovolémie) et 4 sont euthanasiés entre J1 et J3 pour perte du transplant (deux pour thrombose veineuse, un pour thrombose artérielle et un pour absence de retour veineux malgré des signes de revascularisation cutanée). Sur les 15 rats transplantés avec pédicule sous-cutané, nous avons déploré trois pertes de transplant (20 %). Deux échecs (13,3 %) de réimplantation sont constatés en peropératoire par absence de retour veineux malgré des anastomoses perméables. Ces rats sont euthanasiés à J1. Un autre rat est euthanasié à J3 pour perte du greffon par thrombose veineuse survenue à J2. Les 12 autres transplants sont viables, 5 rats sont euthanasiés en fin de protocole à J6. Les 7 restants sont morts spontanément : un quelques heures après le geste par surdosage en héparine, trois entre J4 et J5 après avoir présenté des signes respiratoires évoquant une paralysie laryngée (stridor, hypersialorrhée) et trois de cause inconnue entre J1 et J4. La médiane de survie est de 4,5 jours après transplantation réussie. Un essai de diminution du volume du transplant par parage des muscles de la jambe est réalisé sur deux transplants : le pied reste vascularisé jusque J6 malgré une nécrose cutanée complète de la jambe dans les deux cas.

Aucune infection du site opératoire ni aucune automutilation n'est répertoriée. Aucun signe de douleur n'est décelé lors de la surveillance. Le comportement exploratoire du rat n'est pas modifié et il n'est pas noté de trouble neurologique en dehors d'un signe de Claude Bernard Horner du côté de la réimplantation, quasi systématique.

DISCUSSION

Contrairement au postulat de départ, le poids des rats n'est statistiquement corrélé ni au calibre des vaisseaux donneurs et receveurs ni à la longueur du pédicule vasculaire. D'autre part, plus les rats sont gros, plus la dissection du transplant et du site receveur est compliquée par la présence de graisse. Il n'y a donc pas d'intérêt à se pourvoir d'individu de poids supérieur à 400 grammes. Selon cette même hypothèse de départ, des rats mâles ont été choisis dans l'idée de travailler sur des sujets plus gros. Mais en fin d'étude, un problème d'approvisionnement en animaux nous a conduit à opérer des femelles. La dissection des vaisseaux iliaques est grandement facilitée par l'absence des vésicules séminales, très développées chez le rat mâle. L'abord du cou est strictement identique. Il nous paraît donc intéressant à l'avenir de sélectionner des rats de 300 à 400 grammes et de prélever les transplants sur des femelles, la réimplantation pouvant être assurée indifféremment sur un mâle ou une femelle.

Toutes les phases du protocole chirurgical peuvent être réalisées par un seul opérateur, ce qui a été le cas pendant cette étude. Cependant, la présence d'un aide permet une meilleure sécurisation de certaines étapes critiques de la dissection du transplant et de sa réimplantation. Lors du prélèvement des transplants, deux difficultés majeures sont rencontrées. La dissection du carrefour des veines iliaques est délicate car de nombreuses collatérales mineures, entre 3 et 7, rejoignent le bord médial des veines iliaques externe et primitive. La veine iliaque interne est entièrement cachée par les deux précédentes et se termine par un trajet vertical sur la face dorsale du tronc principal (figure 4). Il est donc impératif de ligaturer puis sectionner toutes les collatérales artérielles, qui sont facilement accessibles, et les collatérales veineuses mineures avant de pouvoir aborder la veine iliaque interne. Sa ligature est malaisée car elle part d'emblée dans la profondeur du site opératoire. Cette étape est encore compliquée par la fragilité des veines rétro-péritonéales qui n'ont quasiment pas de média. Deux rats donneurs sont morts pendant le prélèvement du deuxième transplant à cause d'une plaie de la veine iliaque interne et un pédicule a dû être raccourci de 20 mm à cause d'une plaie du carrefour. En raison de sa difficulté, cette étape doit être réalisée en premier. Par ailleurs, l'abord de la veine iliaque interne par un opérateur seul n'est raisonnablement faisable qu'après section complète de la paroi abdominale. Le deuxième point délicat est la séparation entre les vaisseaux poplités et l'extrémité distale du fémur. Ces deux éléments sont intimement liés et la dissection doit être très prudente. La section cutanée doit être d'emblée circulaire à hauteur du genou. Le muscle vaste médial est désinséré du genou pour exposer les vaisseaux fémoraux jusqu'au canal du grand adducteur, puis le tendon rotulien et la capsule articulaire antérieure sont coupés. Les ligaments croisés sont prudemment sectionnés « à l'aveugle » à la lame froide en prenant garde de ne pas léser la capsule postérieure qui protège les vaisseaux poplités. Celle-ci est mise en tension par la disjonction du fémur et du tibia, ce qui permet de la sectionner prudemment en maintenant à l'écart le pédicule sous-jacent, qui est maintenant visible. Dès lors les muscles de la cuisse sont sectionnés un à un à hauteur du genou avec ligatures vasculaires à la demande jusqu'à libération complète du transplant (figure 5). L'artère et la veine saphène interne sont de calibre équivalent aux vaisseaux poplités et doivent être respectés. Le contrôle visuel permanent des vaisseaux nourriciers et de la position du segment distal doit être une obsession lors de cette étape car la simple traction sur le pédicule par le poids de la patte pourrait entraîner des dégâts irréversibles. Lors de la libération des muscles de la cuisse, la tentation est grande de les désinsérer distalement pour réduire le volume du transplant. Nous l'avons réalisé sur deux transplants. L'insertion distale des muscles de la cuisse au niveau du tibia ou de la fibula descend très bas sur la jambe en raison de la position quadripodale du rat. Les dégâts occasionnés sur la vascularisation cutanée ont conduit à une nécrose complète de la peau de la jambe après réimplantation malgré une bonne vascularisation du pied. Nous avons donc abandonné cette étape. Les autres phases de dissection sur le rat donneur concernent des éléments superficiels et ne posent pas de problème particulier.

En dépit de sa relative difficulté comparée au prélèvement de transplant composite de tissus mous (15,18,19), nous maintenons le choix du segment de membre car il répond à la nécessité de disposer de matériel osseux, articulaire et tendineux pour l'analyse histologique. De plus, il s'agit d'un système clos dont la vascularisation se fait par un seul axe proximal. Cette caractéristique permet une

diffusion homogène des produits de rinçage, indépendamment des territoires vasculaires adjacents comme cela peut être le cas pour les lambeaux à contingent cutané prédominant.

La dissection du site receveur et les anastomoses microchirurgicales ne sont pas très difficiles mais certains points méritent une attention particulière. L'accès à la veine jugulaire externe peut nécessiter l'ablation de la glande salivaire submandibulaire quand elle est volumineuse. Cependant, il est important d'en garder la veine de drainage. Elle est à peine plus petite que la jugulaire et peut servir de branchement de secours. Elle est également très utile pour rincer l'anastomose après déclampage. Les veines cervicales ont une média épaisse et donc se spasment très facilement. Pour autant, le calibre mesuré avant dissection est équivalent à la veine iliaque. Le spasme systématiquement présent au moment de l'anastomose donne l'impression d'une incongruence importante qui disparaît après levée du spasme. L'abord de l'artère carotide commune nécessite parfois la section du muscle omohyoïdien quand il est très recouvrant. Outre la grêle veine jugulaire interne, l'artère est recouverte d'un entrelacs de nerfs qui sont présents sur toutes ses faces. La dissection de la carotide doit être complète pour pouvoir la dérouter sans contrainte mais doit respecter le maximum de filets nerveux. Cela peut être difficile chez certains animaux dont la disposition anatomique n'est pas favorable. Le nerf vague, accolé à la face dorsomédiale de l'artère (i.e. caché lors de la dissection), doit être respecté. Nous pensons que les quelques signes neurologiques mineurs (syndrome de Claude Bernard Horner) présentés par les rats et les morts par probable paralysie laryngée sont dus à des lésions à ce niveau plutôt qu'à une atteinte centrale. La suppléance vasculaire cérébrale est assurée par le polygone de Willis. Celle-ci est très performante chez le rat, comme en témoigne l'absence de déficit neurologique majeur, notamment d'hémiplégie, après ligature d'une artère carotide commune chez l'ensemble des animaux transplantés. En raison du grand nombre d'échec pour les sept premières transplantations, la tunnellation du pédicule entre les muscles cervicaux est abandonnée car les phénomènes de twist et de chevalet ne sont pas maîtrisés (figure 6). Le passage sous-cutané oblige à placer le greffon en position paramédiane et légèrement oblique. Cette position ne gêne ni la surveillance, ni la survie du greffon, ni le comportement du rat. Un des points négatifs d'une réimplantation cervicale avec passage du pédicule en sous-cutané est la difficulté de sécurisation des anastomoses lors de la mise en place finale du greffon, surtout en cas d'opérateur unique.

Le taux de succès de revascularisation de 80% est jugé satisfaisant en comparaison des données de la littérature (23,24). Surtout en considérant le fait que la surveillance des rats est discontinuée et que les conditions expérimentales ne permettent pas les révisions chirurgicales. En effet, les études sur les complications des lambeaux libres microchirurgicaux montrent des taux de complication microchirurgicale majeure (thrombose artérielle ou veineuse, saignement majeur compromettant la vitalité du lambeau) d'environ 20 %. Cependant, le taux d'échec de ces lambeaux est nettement inférieur (5 à 7 %) en raison d'une surveillance postopératoire continue et de reprises chirurgicales immédiates quand elles sont nécessaires. Quant au nombre de rats morts prématurément, ils sont limités par les précautions de dissection de l'artère carotide déjà décrites. La médiane de survie des rats, en dehors de cas d'euthanasie précoce pour perte du greffon est de 4,5 jours. Il n'y a pas eu de signe de souffrance du greffon sur les rats morts prématurément. En tout état de cause, il n'y a pas eu de perte de greffon au-delà de J2 et dans ces cas l'échec était prévisible dès J0 avec des signes de non-revascularisation (absence de retour veineux) ou J1 avec des signes de souffrance veineuse. Nous considérons donc qu'une survie à J3 du rat et du greffon est suffisante pour récupérer le greffon pour analyse histologique des dommages tissulaires dus à la cryopréservation. Dans ces conditions, 83 % des greffons viables auraient été utilisés pour analyse anatomopathologique. Cela ne remet pas en cause l'objectif initial de survie jusqu'au sixième jour, ni le choix du rat en espèce animale. En effet le lapin semble plus fragile (14), les souris et rongeurs de taille équivalente ont des vaisseaux trop petits et les espèces animales plus grandes sont plus coûteuses et posent des problèmes de stabulation.

Dans notre étude, la courbe d'apprentissage est assez lente : il a fallu sept protocoles complets avant d'apporter les évolutions nécessaires au fonctionnement du modèle. En tenant compte des précisions apportées, ce nombre peut aisément être réduit à cinq voire moins pour un opérateur

autonome en microchirurgie. Nous souhaitons développer ce modèle expérimental pour que l'étude de la cryoconservation des tissus composites soit coordonnée de façon multicentrique et que les données recueillies puissent être facilement comparées et intégrées à un programme de recherche global aboutissant dans un futur proche à la validation de protocoles de congélation et décongélation optimaux.

REFERENCES

1. Tobin GR, Breidenbach III WC, Ildstad ST, Marvin MM, Buell JF, Ravindra KV. The History of Human Composite Tissue Allotransplantation. *Transpl Proc.* 2009;41(2):466–71
2. Peacock EE Jr. Restoration of finger flexion with homologous composite tissue tendon grafts. *Am Surg.* 1960;26:564–71
3. Devauchelle B, Badet L, Lengelé B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet.* 2006;368(9531):203–9
4. Francois CG, Breidenbach WC, Maldonado C, Kakoulidis TP, Hodges A, Dubernard JM, et al. Hand transplantation: comparisons and observations of the first four clinical cases. *Microsurgery.* 2000;20(8):360–71
5. Guimberteau JC, Baudet J, Panconi B, Boileau R, Potaux L. Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a preliminary report and 1-year follow-up of two cases. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(6):1135–47
6. Petit F, Lantieri L, Guimberteau JC, Hannouche D, Lee WPA. Allotransplantation de tissus composites en chirurgie reconstructrice: premières applications cliniques. *Ann Chir Plast Esthet.* 2002;47(3):222–31
7. Petruzzo P, Dubernard JM. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. *Clin Transpl.* 2011;247–53
8. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med.* 2001;344(22):1676–9
9. Schoofs M. Perspectives de l'allotransplantation de tissus composites en chirurgie réparatrice des membres, en particulier de la main. *Ann Chir Plast Esthet.* 2007;52(5):436–50
10. Rousvoal A. Réflexions sur l'utilisation d'allotransplants tendineux et ostéo-tendineux cryopréservés pour la reconstruction des doigts longs. *Th D Méd. Bordeaux 2;* 2006
11. Guimberteau J-C, Panconi B, Bakhach J, Casoli V. Pourquoi avoir pensé à l'allotransplantation tendineuse en chirurgie de la main en 1989. *Ann Chir Plast Esthet.* 2007;52(5):414–23
12. Pegg DE. The preservation of tissues for transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2006;7(4):349–58
13. Guimberteau J-C, Bakhach J, Casoli V. Experimental and clinical experience with small composite tissue allotransplants and cryopreservation techniques. *Semin Plast Surg.* 2007;21(4):250–8
14. Bakhach J. Xenotransplantation of cryopreserved composite organs on the rabbit. *Organogenesis.* 2009;5(3):127–33
15. Hirase Y, Kojima T, Takeishi M, Hwang KH, Tanaka M. Transplantation of long-term cryopreserved allocutaneous tissue by skin graft or microsurgical anastomosis: experimental studies in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(3):492–501
16. Huang SL, Hou MZ, Yan CL. Reconstruction of the thumb by a free pedal neurovascular flap and composite phalanx-joint-tendon homograft: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg.* 1985;1(4):299–303
17. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1165–72
18. Rinker B, Cui XD, Fink BF, Gao DY, Vasconez HC. Cryopreservation of composite tissue flaps: experimental studies in the rat. *Ann Plast Surg.* 2007;58(6):656–60
19. Zhang F, Attkiss KJ, Walker M, Buncke HJ. Effect of cryopreservation on survival of composite tissue grafts. *J Reconstr Microsurg.* 1998;14(8):559–64
20. Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the cryopreserved tracheal allograft in growing rabbits. *J Pediatr Surg.* 2003;38(12):1707–11
21. Dubert T. Etude de la conservation et des transferts de lambeaux inguinaux cryoconservés et revascularisés chez le rat. *Mémoire DU microchirurgie.* Paris 6; 1986
22. Siemionow M, Klimczak A. Advances in the development of experimental composite tissue transplantation models. *Transpl Int.* 2010;23(1):2–13

23. Handschel J, Burghardt S, Naujoks C, Kübler NR, Giers G. Parameters predicting complications in flap surgery [In Press]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212440312015209. consulté 14 janv 2013
24. Pohlenz P, Klatt J, Schön G, Blessmann M, Li L, Schmelzle R. Microvascular free flaps in head and neck surgery: complications and outcome of 1000 flaps. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(6):739–43

TABLEAUX

Tableau 1 : différences de modèle expérimental dans les études sur la cryoconservation de tissus composites

Auteurs	Année	Espèce animale	Type de transplant	Site receveur
Huang et al.	1985	Homme	Phalanges, articulation interphalangienne et tendons du pouce	Orthotopique
Dubert	1986	Rat	Lambeau inguinal	Orthotopique
Hirase et al.	1993	Rat	Lambeau inguinal	Orthotopique
Zhang et al.	1998	Rat	Lambeau de muscle gracilis, lambeau inguinal, queue	Orthotopique
Tanaka et al.	2003	Lapin	Trachée	Orthotopique
Yin et al.	2003	Rat	Gonades mâles et femelles	Aorte et veine cave sous-rénales
Rinker et al.	2007	Rat	Lambeau épigastrique	Orthotopique
Bakhach et al.	2007	Lapin	Doigt humain	Vaisseaux cervicaux

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : étude de la corrélation radioanatomique de la vascularisation du membre postérieur chez le rat. A : vue ventrale chez le cadavre. B : image superposable d'IRM en séquence de flux (reconstruction MIP). AO = aorte, IP = vaisseaux iliaques primitifs, II = vaisseaux iliaque internes, F = vaisseaux fémoraux, POP = vaisseaux poplités, SI = vaisseaux saphènes internes.

Figure 2 : vue de profil d'un rat receveur avec le transplant en position cervicale dorsale médiane. Noter la longueur de pédicule nécessaire pour un branchement cervical ventral.

Figure 3 : évolution des durées opératoires au cours de l'étude pour les phases de prélèvement et de réimplantation.

Figure 4 : vue ventrale peropératoire du carrefour des veines iliaques. A : la veine iliaque primitive (VIP) et la veine iliaque externe (VIE) masquent intégralement la veine iliaque interne. B : la veine iliaque interne (VII, flèche blanche) n'est visible qu'après réclinaison de la VIP et de la VIE. AI = artère iliaque.

Figure 5 : vue latérale d'un transplant fraîchement prélevé. Les muscles sont coupés au niveau du genou sans parage.

Figure 6 : résultat de revascularisation immédiate en fonction de la position du pédicule vasculaire. La position sous-cutanée donne plus de chances de succès.

AUTEUR : Nom : BONNET-TORRES

Prénom : Adrien

Date de Soutenance : 3 mai 2013

Titre de la Thèse : MISE AU POINT D'UN MODELE ANIMAL CHEZ LE RAT POUR LA CRYOPRESERVATION DES TISSUS COMPOSITES

Thèse - Médecine - Lille 2013

Cadre de classement : *DES chirurgie générale*

Mots-clés : modèle animal, rat, microchirurgie, allotransplantation tissus composites, cryopréservation

Résumé :

La cryoconservation des tissus composites permettra de créer des banques de petits segments de membre supérieur, de type complexe articulaire interphalangien ou tendon fléchisseur vascularisé, afin d'optimiser la reconstruction des doigts par procédures d'allotransplantation. La coexistence de tissus de nature diverse dans ce type de transplant représente un défi dans l'élaboration d'un protocole de cryoconservation. Pour étudier les effets de la congélation, il est indispensable de disposer d'un modèle animal fiable. Il doit en outre être reproductible et transmissible car la multiplicité des paramètres à étudier impose un travail multicentrique.

Nous proposons l'évaluation prospective d'un modèle d'étude chez le rat, basé sur un transplant de segment distal de membre postérieur prélevé sur individu secondairement sacrifié. Ce segment est réimplanté sur un rat receveur au niveau du cou. La surveillance est assurée jusqu'au 6^e jour postopératoire puis l'animal est euthanasié avant apparition des phénomènes de rejet. Le transplant peut alors être utilisé pour analyse histologique.

22 transplants sont prélevés sur 15 rats donneurs et réimplantés sur 22 rats receveurs. La durée moyenne de prélèvement est de 3,66 heures et de réimplantation de 3,73 heures. La longueur du pédicule vasculaire est en moyenne de 46 mm. Le calibre des vaisseaux donneurs et receveurs est comparable, respectivement 1,42 et 1,40 mm pour les artères, 1,93 et 2,0 mm pour les veines. Après une courbe d'apprentissage de 7 réimplantations, le taux de succès primaire est de 80% et 83% des transplants viables sont disponibles pour analyse anatomopathologique.

La généralisation de ce modèle est intéressante car elle permettra une uniformisation des études de la cryoconservation des tissus composites et facilitera la comparaison et l'extrapolation des résultats.

Composition du Jury :

Président : Madame le Professeur Duquennoy-Martinot

Assesseurs : Monsieur le Professeur Marchetti

Madame le Professeur Auquit-Auckbur

Monsieur le Docteur Guerreschi

Monsieur le Docteur Schoofs

Monsieur le Docteur Wavreille

Adresse de l'auteur :



