HAL
open science

Implantation et évaluation de micro-implants vasculaires (< 2mm), à base d'alcool polyvinylique

Michaël Atlan

▶ **To cite this version:**

Michaël Atlan. Implantation et évaluation de micro-implants vasculaires (< 2mm), à base d'alcool polyvinylique. Autre. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD035 . tel-01895806

HAL Id: tel-01895806

https://theses.hal.science/tel-01895806v1

Submitted on 15 Oct 2018

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

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

THESE DE SCIENCES

ECOLE DOCTORALE GALILEE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline :

Sciences de l'Ingénieur, Mention Génie Biologique et Médical

Implantation et évaluation de micro-implants vasculaires (< 2mm), à base d'alcool polyvinylique.

Présentée et soutenue publiquement par

MICHAEL ATLAN , le 21 Janvier 2016

Directeur de thèse Didier LETOURNEUR
Co Directeur: Marc CHAOUAT

Membres du jury:

Pr Franck DUTEILLE Rapporteur

Pr Martine BEN AMAR Rapporteur

Pr Anne PELLE Examinateur

Pr Laurent LANTIERI Examinateur

REMERCIEMENTS

Didier Letourneur, Directeur du Laboratoire LVTS

Je te remercie sincèrement d'avoir accepté ma présence, dans ton unité, dont l'excellence n'est plus à démontrer. Dans des moments de découragements, tu as toujours eu les paroles pour me relancer, et aujourd'hui, même si tout est perfectible, je présente ce travail qui je l'espère te fera honneur. J'espère pouvoir continuer plus tard à collaborer au sein du LVTS et soit assuré de ma plus profonde admiration.

Pr Marc Chaouat

Je vous remercie de vos conseils sages et avisés et surtout de m'avoir permis, de poursuivre vos travaux, qui ont été une base de réflexion importante.

En dehors de cela soyez gratifié de mon plus grand respect, pour votre travail scientifique mais aussi chirurgical, et votre dévouement envers notre spécialité.

Laurent Corte

Je regrette de ne pas avoir pu t'intégrer dans mon jury, pour des raisons de calendrier, et je te remercie de ta compréhension. Nous serons évidemment associés dans des futurs travaux, et ta contribution à ce travail lui donne une grande valeur ajoutée notamment sur la partie d'étude biomécanique et le vieillissement du matériel. Ta disponibilité et ta capacité d'analyse ont été d'une grande aide.

Pr Laurent Lantiéri

Je suis honoré de votre présence, à ma soutenance qui est le résultat de 4 ans de travail et je l'espère le début d'autres projets .Vous savez toute l'admiration que je vous porte, et vous restez un modèle chirurgical, d'audace et de fiabilité microchirurgicale.

Je suis fier de compter parmi vos élèves et à ce titre de votre soutien dans mon parcours.

Pr Franck Duteille

Je vous remercie d'avoir accepté cette lourde responsabilité de rapporteur mais votre expérience et votre expertise en microchirurgie m'ont fait vous choisir. Votre dynamisme, votre envie de changer les choses dans notre spécialité m'a immédiatement conquis et j'ai hâte que nous collaborions plus encore. Merci de votre aide et soutien

Martine Ben Amar

Je suis très honoré, que vous ayez accepté d'être rapporteur de ce travail, et je sais que votre curiosité donnera un éclairage, particulier à ce travail. De la théorie et la modélisation mathématique à la pratique clinique, les frontières sont parfois plus ténues que ce l'on pense et nous l'avons prouvé. Je vous remercie vivement pour tout !

Anne Pellé :

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail, qui je l'espère t'interessera, au titre de ton expertise et tes activités de recherche en chirurgie vasculaire. J'espère que les projets amorcés nous réunirons bientôt.

Avec tout mon respect et mon amitié.

Julia Ino

Je suis arrivé comme un chien dans un jeu de quilles dans l'unité et pendant ta dernière année de thèse, mais je pense que nous en tirons tous les deux beaucoup de souvenirs et d'avancées. Je te souhaite bon courage, dans ta carrière.

Rachida Aid, Liliane Louedec, Cécilia Delattre

Sans vous je n'aurais jamais pu terminer, ni même commencer, ce travail et je vous dédie à toutes les trois, cette thèse car votre aide de tous les instants et votre accueil bienveillant, parfois taquin, ont été pour beaucoup dans le plaisir que j'ai eu à travailler à LVTS.

Les débuts furent difficiles, mais ca en valait la peine. Rachida tu as été un support de tous les instants pendant ces dernières années, tu m'as aidé, orienté, conseillé tant que tu as pu, ce travail est aussi le tien.

Vincent Hunsiger

Je suis ravi que tu ais pu faire ton clinicat avec un de mes maitres, et que tu ais pu développer tes dons exceptionnels de microchirurgien. J'ai pu diriger ton master II lors de ma thèse et je suis très fier de ce que tu as produit. Que ta nouvelle carrière soit remplie des succès que tu mérites.

A mes amis et élèves qui m'ont soutenu et tenu « la maison » dans ces moments d'écriture et de recherche.

Maia, ma compagne et Sasha, Solal, et Abel

Je te remercie de tout mon cœur, d'avoir supporté les week ends et mes soirées avec les rats …et d'avoir patiemment supporté mon « stress. » Je suis très chanceux de t'avoir auprès de moi , ta patience et ta complicité m'ont beaucoup aidé.Je te rendrai ce temps volé.

Sois assurée de mon amour.

A mon frère Anthony, et Alexandra dont je suis tres fier.

A mon père qui me manque, à ma mère pour son amour inconditionnel.

A INTRODUCTION

I Histoire de la microchirurgie et applications

II Problèmatique du remplacement de vaisseaux de petits calibres

III Travaux et expérience de l'unité LVTS 1148 sur le PVA

B TRAVAUX DE THESE

I Micro prothèses vasculaires à bases d'alcool polyvinylique comme modèle d'entrainement à l'anastomose microchirurgicale.

II Intérêt de l'angiographie par résonance magnétique nucléaire, avec séquence (TIME OF FLIGHT=TOF), en temps de vol, 2D-3D dans l'exploration des vaisseaux de petits diamètres. Validation in vivo, et application clinique.

III Enhancing the permeability of Poly Vinyl Alcohol based tubes, for microvascular arterial replacement: PVA-heparin and PVA-Gelatin hybrids.

C) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

D) BIBLIOGRAPHIE ET ANNEXES

A) INTRODUCTION

I) Histoire de la microchirurgie et applications

La microchirurgie est une discipline exigeante, qui a ouvert des voies inédites, et des horizons nouveaux en reconstruction. Le pronostic vital et fonctionnel, de nombreuses pathologies s'en sont trouvés révolutionnés. Pour exemple , en cancérologie, l'agressivité de la tumeur, oblige à ne pas seulement enlever la lésion, mais aussi une marge de sécurité , et donc une quantité importante de tissus sains. L'impossibilité technique, de réaliser la reconstruction de pertes de substances aussi importantes, était un frein à la chirurgie du cancer, et certaines tumeurs étaient considérées comme inextirpables, par absence de solution de reconstruction adaptée. En effet les séquelles d'une chirurgie sans reconstruction, étaient tells, qu'elles entrainaient une perte de qualité de vie inacceptable. Avant l'avènement de la microchirurgie, et de la nouvelle conceptualisation de l'anatomie micro-vasculaire, les reconstructions étaient basées sur des lambeaux pédiculés de voisinage, emportant souvent du muscle, qui permettaient de combler les pertes de substances, mais pas toujours de la manière la plus adaptée. Or la microchirurgie vasculaire a permis de s'amender du caractère locorégional de la reconstruction, et a permis de sélectionner à la demande, à distance de la perte de substance, le tissu le plus adapté par ses qualités (surface, volume, surface, résistance à l'infection…), tout en épargnant des structures fonctionnellement importantes. Pour exemple, la microchirurgie pour la reconstruction mammaire utilise le ventre, les cuisses, ou les fesses (figure 1 et 2) sans emporter de muscle ce qui a permis de meilleurs résultats esthétiques tout en diminuant les séquelles liées au prélèvement du muscle(1–4) comme des techniques plus anciennes (TRAM) .Enfin en traumatologie la réimplantation de membres, ou d'unités faciales, a permis à des patients de recouvrir une qualité de vie bien supérieure aux

techniques de reconstruction conventionnelles.

De nombreuses disciplines impliquées en reconstruction ont recours aux techniques de microchirurgie : les anastomoses microchirurgicales artérielles, veineuses, lymphatiques et nerveuse, qui demandent des qualités techniques et des compétences pointues .

La fiabilité est une qualité essentielle pour un micro-chirurgien, car l'échec d'une anastomose est source de morbidités , avec un retentissement majeur sur le devenir fonctionnel et cosmétique de la reconstruction. De plus les « sauvetages » d'anastomoses, thrombosées sont difficilement rattrapables.

I Histoire de la microchirurgie et applications(5,6)(7)

Alexis Carrel, est un pionnier d'origine française, de la chirurgie vasculaire. En effet dès 1902, au cours de ses travaux sur la faisabilité des transplantations d'organes, ce qui impliquait de réaliser des anastomoses vasculaires, de petites tailles. La percée technique le plus importante fut la description de la méthode de suture vasculaire par triangulation, encore utilisée aujourd'hui , pour laquelle il reçut, plus tard le prix Nobel de médecine en 1912.

Figure 1 : Dr Alexis Carrel en couverture du Time Magazine

Par la suite Alexis Carrel réalisa en 1908 la première transplantation de rein chez l'animal. Dans le meme temps, l'introduction de l'anticoagulation était l'une des avancées de la chirurgie vasculaire. L'héparine a été découverte en 1916 par Jay McLean , un étudiant en médecine à l'Université Johns Hopkins .

La capacité de contrôler la coagulation du sang était une étape essentielle dans le développement de cette chirurgie.

La microchirurgie n'est pas que « vasculaire ».

En 1921, Carl Olof Nylen, de l'École de médecine Karolinska de Stockholm, avec le soutien de son supérieur Pr Gunnar Hölmgren, en Suède, sera le premier à laisser rentrer un microscope monoculaire au bloc opératoire , pour une chirurgie du rocher. Il l'adaptera progressivement en vision binoculaire, plus confortable , et qui permet une profondeur de champ.

En 1946 Richard Perrit, ophtalmologue, contre l'avis de son chef de service, l'utilisa dans le traitement de la cataracte. En neurochirurgie le microscope a ainsi permis ,en 1957, la première exérèse de neurinome de l'acoustique, assistée par microscope chez un enfant de 4 ans.

Au début de années soixante, dans le Vermont, Julius Jacobson étudiait l 'effet de la dénervation carotidienne, sur le chien. Il devait pour cela emporter une section de la carotide et du tissu environnant, et ré-anastomoser les 2 extrémités. L'anastomose des vaisseaux de 3mm, de type termino-terminale, n'était pas encore envisageable à l'époque. Jacobson qui était ORL, utilisa le microscope, pour réaliser ces anastomoses, qu'il réussit au bout de quelques essais et lui fera dire, que « la main est capable d'une bien plus grande précision que ce qui est fait dans la pratique chirurgicale courante, mais que l'échec est lié à l'incapacité de l'œil à guider, la main. Jacobson et Suarez vont présenter leurs résultats et utiliseront le terme de « Microsurgery » pour la première fois. À la fin de la présentation, le chef de chirurgie vasculaire de Cleveland prend la parole : « C'est un très beau travail, mais il serait tout simplement ridicule d'amener un microscope dans un bloc opératoire».

Mais en 1960, lors du Congrès national américain de chirurgie, il y avait un autre chirurgien, déçu d'avoir vu sa communication orale refusée. Ce chirurgien plasticien de Californie, proposait de présenter son travail sur les anastomoses vasculaires pour des vaisseaux de diamètres compris entre 1 et 2 mm. Il avait réalisé ces anastomoses sans microscope mais sans succès, mais il souhaitait partager son expérience. Malheureusement, la publication de résultats négatifs (souvent sources d'informations et de partages d'expériences importantes), était déjà difficile. L'opiniâtre, Harry Buncke assista à la présentation de Jacobson et Suarez, et saisit immédiatement l'intérêt du microscope, dans sa quête d'anastomose de vaisseaux petits calibres. La genèse de cette idée, commença lors de son passage chez Thomas Gibson en Ecosse, qui traitait les disfigurations, des soldats de la 2 ème guerre mondiale. La technique de reconstruction la plus répandue, à l'époque, consistait en des lambeaux cutanés tubulés migrateurs qui « voyageaient » de la peau saine, à la zone à reconstruire de la face avec de nombreuses étapes non dénuées, de complications et de perte de longueur de la peau transférée (en raison nécroses cutanées). Gibson lui – même reconnaissait la limite de ces techniques: "si seulement quelqu'un pouvait brancher ces vaisseaux, cela éviterait tous ces mois de traumatisme, de souffrance et de complications… » confia t-il à son élève.

Il se posa alors la question de brancher les vaisseaux de ces lambeaux évitant des étapes intermédiaires sources de morbidités et d'échecs. Il commença dans son garage, des essais de ré-implantations d'oreilles de lapins. Ses essais se poursuivirent ;6 ans avec de rares succès peu reproductibles. Mais à l'arrivée du microscope, les résultats furent constants après une période d'adaptation, et Harry Buncke commença alors sa carrière de « transplanteur » et devint une référence en réimplantation des membres .Il fut ainsi le premier en 1964 à réussir des anastomoses vasculaires sur des vaisseaux de diamètre inférieurs à 2 mm sur des oreilles de lapin qu'il présenta officiellement lors d'un congrès du conseil de recherche en chirurgie plastique américain.

Figure 2 : Pr Harry BUNCKE

Si au début des années 1960 les premières réimplantations de bras (Malt & McKhann 1962) et d'avant-bras ont été possibles grâce aux progrès de la microchirurgie, il faudra attendre 1968 pour la première reimplantation de pouce par Komatsu & Tamai, dans les suites des travaux expérimentaux réalisés par Buncke en 1965.. Parmi les tissus transplantés l'épiploon par Harry Buncke en 1960 puis par Maclean et Buncke en 1972, du tissu cutanéo- graisseux par Daniel et Taylor en 1973, d'os par le même chirurgien en 1975, musculocutané par le Pr Baudet…furent utilisés comme lambeaux libres ou auto-transplantations.

Les études sur la vascularisation cutanée se développèrent et amènent même en 1989 avec Koshima et Soeda à utiliser des tissus vascularisés par de toutes petites branches, inférieures à 1mm avec de faibles morbidités (les dissections sont limitées, sans prélèvement musculaire) (figure 4) de la zone donneuse ,tout en permettant des prélèvement tissulaire importants pour combler d'importantes pertes de substance.

C'est l'avènement des lambeaux perforants, dont le DIEP popularisé en France, par le Pr Lantiéri en reconstruction mammaire(Figure 3).

Figure 3 : reconstruction mammaire secondaire, cancer du sein droit apres radiothérapie. Reconstruction par DIEP libre, (lambeau cutanéo graisseux de l'abdomen) anastomosé sur l'artère mammaire interne (Figure 5)

FIGURE 4 : Sarcome radio induit de l'avant bras/traitement par exerese large, et reconstruction par lambeau antérolatéral de cuisse(sans prelevement musculaire, lambeau fascio cutané) anastomosé en terminolatéral sur l'artère radiale.

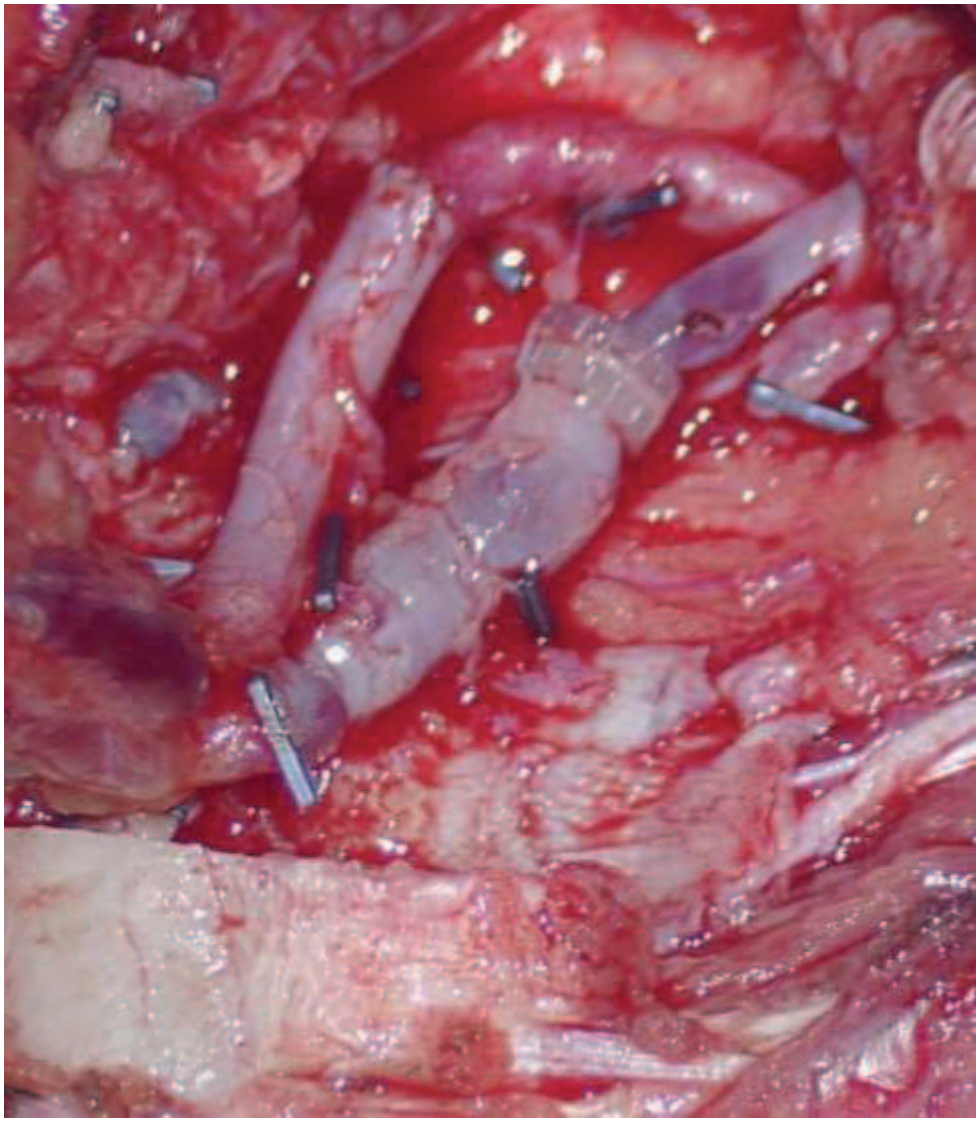


FIGURE 5: Anastomose termino-terminale de l'artère mammaire interne et de l'artère épigastrique inférieure profonde d'un lambeau DIEP (Deep Inferior Epigatric Perforator Flap) par suture en points séparés 10/0 / Anastomose termino–terminale de la veine mammaire interne par coupler-systeme automatique d'anastomose 2.5mm.

Plus tard, pour pallier aux insuffisances fonctionnelles ou esthétiques, des moyens conventionnels de reconstruction de structures complexes de la face, Dubernard et Devauchelle sur le triangle nez mention, d'abord, puis Lantiéri avec plus de 9 greffes à son actif, réalisèrent les premières allotransplantations, utilisant ces principes de microchirurgie. Beaucoup d'autres equipes, suivirent avec des greffes faciales de plus en plus complètes.

Koshima (8–11)a aussi développé les techniques d'anastomoses **inframillimétriques** notamment dans la chirurgie du traitement du lymphoedème(12,13), faisant passer la microchirurgie à l'ultramicrochirurgie ,ou supramicrochirurgie . Bien que ces appellations d'ultra/supra puissent « agacer », le seuil du millimètre pour la lumière des vaisseaux reste une prouesse. Ces développements sont utilisés en chirurgie du lymphoedème, notamment dans les anastomoses lymphaticoveineuses ou des anastomoses lympho-lymphatiques(14) , apportant au moins un début de solution à cette pathologie, qui est restée sans traitement curatif.

I I) Problématique du remplacement vasculaire de petits calibres

Situations de « dépletion » vasculaire

En chirurgie reconstructrice , les vaisseaux les plus souvent utilisés ,sont et ou de la main ont des diamètres , proches de 2 mm : l'artère mammaire interne(15), artère thoraco dorsale artère thyroïdienne supérieure, branche descendante de l'artère circonflexe fémorale latérale…

Leurs qualités intrinsèques, jouent évidemment dans la réussite de l'intervention. Ainsi l'irradiation, l'athérosclérose, les facteurs d'hypercoagulabilité et de thrombose sont des éléments défavorables à la réussite de l'anastomose à court et moyen terme. Il arrive dans certaines situations, de chirurgie reconstructrice, que la zone receveuse,aucun vaisseau de qualité ou de taille suffisantes soit retrouvé en raison de:

- vaisseaux de mauvaise qualité
- soit clipés ou ligaturés (iatrogènie de curages ganglionnaires)
- les échecs de chirurgie reconstructrice par lambeau libre ayant déja utilisé les vaisseaux receveurs
- les chirurgies cervicales, multi-operées avec de la fibrose
- les séquelles de radiothérapie
- certains traumatismes.

Le remplacement vasculaire consiste alors en des vaisseaux de remplacement, artériels ,mais le plus souvent veineux ou par des pontages permettant d'atteindre des zones riches en vaisseaux de bonne qualité. La perméabilité de l'anastomose est cruciale pendant les premières semaines ; car l'hypoxie relative des berges des lambeaux cutanés (par rapport aux regions proche du vaisseau) transférés par microchirurgie stimule, des facteurs angio-géniques et permet la

création d'un réseau vasculaire qui permet dans des délais courts quelques semaines , c'est « l'autonomisation» du lambeau.

En d'autres termes ,après ce délai, si les vaisseaux nourriciers du lambeau sont sectionnés, lambeau ne nécrosera pas, grâce à la vascularisation développée avec son environnement après seulement quelques semaines.

En chirurgie cardiaque, l'artère mammaire interne est utilisée pour les pontages coronariens, avec succès avec un très bon taux de perméabilité mais il n'existe pas à l'heure actuelle d'autres solutions, que des greffons veineux dont le taux de perméabilité est moins bon, quand les mammaires internes ont été utilisées ou se sont thrombosées ou en cas de multiples pontages.

La dégénérescence tardive de greffons veineux est considérée comme un effet secondaire dû au développement d'une sténose hyperplasique ou fibroblastique au niveau de l'anastomose

La prolifération cellulaire, surtout de cellules musculaires lisses, résulte en partie de la différence d'élasticité entre la veine saphène et l'artère receveuse (16)

Actuellement, les seuls matériaux utilisés dans les prothèses vasculaires sont élaborés à partir de deux polymères principaux : le Teflon et le Dacron.

Ces matériaux se sont imposés en raison de leur caractère bio-inerte (pas de décomposition dans l'organisme, propreté chimique du polymère, pas de contaminants de synthèse). Ils ne sont pas pour autant biocompatibles, car il n'y a pas de cellularisation du matériau par des cellules fonctionnelles, ce qui explique le potentiel thrombogène.

Prothèses en polytétrafluoroéthylène (PTFE) (Figure 9)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) ou Teflon® est un polymère linéaire thermoplastique qui possède des propriétés remarquables en particulier une grande inertie chimique. C'est un matériau facilement déformable, semi-cristallin, hydrophobe et son allongement est aisé. Il présente un coefficient de friction bas et reste stable à des températures élevées (327°C). De plus, il peut être transformé par frittage (densification sous des pressions élevées) pour la fabrication de tubes ou de canaux.

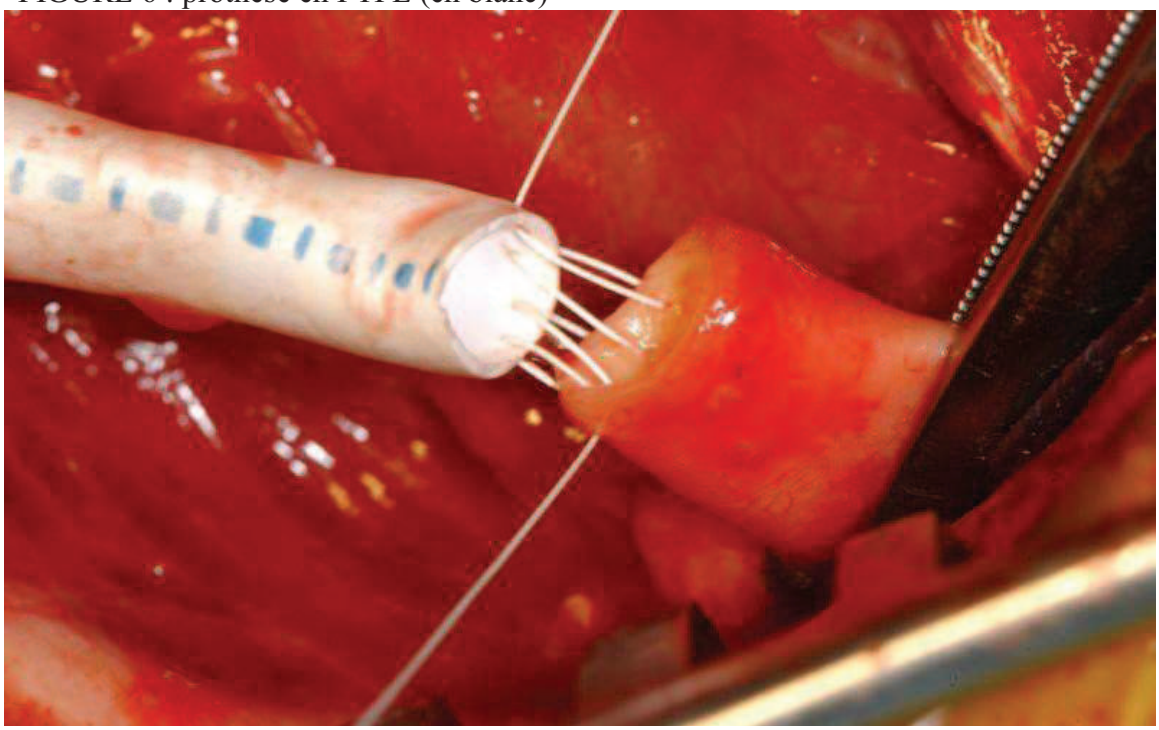
Ces propriétés, associées à sa neutralité et sa biocompatibilité lui confèrent une valeur élevée comme matériau d'implantation. Son utilisation dans le domaine médical a débuté au cours des années 60 pour les valves cardiaques artificielles. Sa surface est électronégative ce qui minimise sa réactivité avec les éléments figurés du sang (17,18). Cependant, il faut noter que l'hydrophobie du PTFE empêche l'adhésion des cellules endothéliales ce qui constitue un handicap pour la substitution des vaisseaux de petit calibre. Malgré ce handicap, le PTFE reste

le matériel synthétique le plus utilisé pour les pontages fémoro-poplités et axillo-fémoraux. Aujourd'hui, quand il est implanté comme substitut aortique, on observe un taux de perméabilité à cinq ans de 91 à 95%, alors qu'en pontage fémoro-poplité, le taux n'est que de 45% à cinq ans .Comparativement, une veine autologue permet d'obtenir un taux de perméabilité à 5 et 10 ans , respectivement de 36-41% et 28% -36% à 10 ans(16).

Pour pallier le caractère thrombogène lié à l'hydrophobie, des modifications de la surface interne du substitut ont été proposées :

- le recouvrement par une fines couche de carbone pour augmenter le caractère électronégatif de la surface : ce traitement a montré une nette amélioration de la perméabilité sur une période de deux ans comparativement au ePTFE standard.
- le revêtement ou le greffage d'agents anticoagulants ou anti-thrombotiques, en particulier la fixation d'héparine avec des résultats prometteurs chez l'animal (17)(18)

- FIGURE 6 : prothèse en PTFE (en blanc)



Prothèses en polytéréphtalate d'éthylène (PET)

Le polyéthylène téréphtalate (PET) ou Dacron®(17,19) est un polyester dur et rigide. Les premières prothèses réalisées dans ce matériau ont été implantées en 1957. Il présente un taux de perméabilité à dix ans de 49% pour des pontages fémoroaortiques chez des patients jeunes(20,21) .Il se présente sous la forme textile tricotée ou tissée. Les prothèses vasculaires en Dacron® ont suivi plusieurs évolutions. L'amélioration des techniques d'élaboration (tissage) a modifié favorablement les propriétés de ces prothèses. En effet, les premières présentaient une faible porosité quiralentissait la colonisation cellulaire et la cicatrisation, tandis que les prothèses à porosité élevée présentaient une faible stabilité mécanique. L'incorporation de fibres texturées a permis d'améliorer la cicatrisation grâce à une meilleure encapsulation externe et à un meilleur ancrage tissulaire. Par la suite, la généralisation des tricots chaînés et des structures tissées a permis d'améliorer leur résistance mécanique, tout en révélant une excellente capacité de cicatrisation. Les prothèses Dacron® sont actuellement utilisées comme substituts des artères de gros et moyens calibres (pontages aorto-iliaques), en raison de leur perméabilité à long terme (97%) à cinq ans mais demeurent inutilisables pour la substitution des vaisseaux de petit calibre (< 6 mm).

En dépit de certaines études anciennes ayant montré un dépôt de plaquettes notamment pour des vaisseaux < 4mm (18,22,23)et une activation du complément plus faible sur les prothèses en PTFE que sur les prothèses en Dacron, les taux de perméabilité de ces deux types de substituts sont semblables Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence sur la perméabilité à cinq ans, entre des prothèses en Dacron ou en Téflon utilisées en pontage fémoro-poplité(17,19,24).

Donc, pour des vaisseaux de 6 mm et plus, les prothèses textiles donnent encore des résultats satisfaisants, mais pous les artères de petits calibres < 3mm(25) ces mêmes substituts donnent de mauvais résultats, par thromboses et hyperplasie intimale.

Ainsi la nécessité de prothèses vasculaires de petits diamètres 2mm, du fait des développements de la microchirurgie, se fait de plus en plus nécessaire, et la quête d'un matériel idéal, reste à un challenge à relever.

La micro-prothèse vasculaire idéale

L'implant vasculaire idéal, conduirait à une endothélialisation *in situ*, gage d'une interface sang- vaisseau saine et pérénne.

Elle devrait

- avoir le comportement biologique et biomécanique, le plus proche possible d'un vaisseau natif avec une marge de sécurité suffisante.
- être d'une grande praticité
- et idéalement d'un cout autorisant un accès facile à la technologie

Une prothèse complètement biocompatible devrait être constituée par une matrice favorisant l'attachement des cellules ou de leurs progéniteurs, leur prolifération et avoir donc la capacité à incorporer des facteurs inductifs pour améliorer la croissance du tissu néoformé.

Le matériau de la prothèse doit être biocompatible:

-non-thrombogène

-anti-inflammatoire et générer une réaction optimale du tissu environnant permettant la guérison et non la formation d'une capsule fibreuse;

-non-immunogène ;

-ne nécessite pas de recours à des traitements adjuvants tels des traitements anticoagulants ou antiagrégants ;

- être facilement manipulable, flexible et facile à suturer;

- être disponible en de nombreux diamètres et tailles et être facile à stériliser;

- Si elle n'est pas résorbable, elle doit garder ses caractéristiques biologiques et mécaniques tout au long de son utilisation. Si elle est résorbable, elle doit être remplacée et réhabitée grâce la formation d'un néo vaisseau identique au vaisseau naturel, et ses produits de dégradation doivent alors être métabolisés ou éliminés sans effet secondaire y compris au-delà de son utilisation.

III Travaux et expérience de l'unité Inserm 1148

PVA et Remplacement vasculaire de petit calibre

Les implants ou prothèses micro vasculaires utilisés dans ce travail sont à base d'un polymère synthétique: l'alcool polyvinylique (PVA). L'unité 1148, dirigée par Didier Letourneur, a développé une expertise sur les biopolymères, en particulier sur l'alcool polyvinylique, après les travaux de Julia Ino et Marc Chaouat.

Ce polyalcool linéaire a pour motif élémentaire: [CH2-CH(OH)]

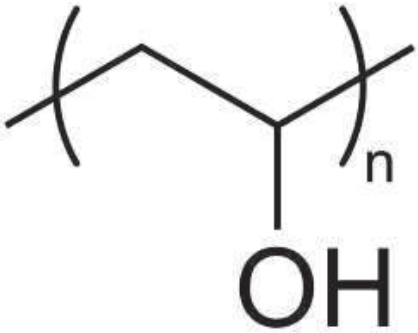


FIGURE 7: Molécule d'alcool Polyvinylique

Il est obtenu par hydrolyse partielle d'un ester polyvinylique, l'acétate de polyvinyle. Nous désignerons par le terme « alcool polyvinylique » l'ensemble des produits d'hydrolyse, même s'ils contiennent encore des groupements esters en quantités significatives.

Le PVA est utilisé dans de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques: lentilles de contacts, gastroprotection de médicaments, orthopédie…Des hydrogels peuvent être obtenus par réticulation chimique (glutaraldéhyde, formaldéhyde, dimethylsulfoxyde), par irradiations gamma, ou bien physiquement par des cycles de congélation/décongélation, ou par polymerisation UV(26) . La biocompatibilité des matériaux en PVA ,associée à ses propriétés mécaniques bien supérieures à celles des matériaux d'origine naturelle (collagènes, polysaccharides), en font un bon candidat pour l'ingénierie de vaisseaux sanguins synthétiques de petit calibre. Cette voie de recherche a été initiée au sein de l'Inserm U1148 au cours de la thèse de science, effectuée par Marc Chaouat sous la direction du Pr. Frédéric Chaubet. Par une méthode de réticulation originale, utilisant le trimétaphosphate de sodium (STMP) comme agent réticulant, il a été possible d'obtenir des films de PVA souples et résistants. Le STMP, agent réticulant utilisé dans l'agro-alimentaire, est, non toxique au contraire du glutaraldehyde, ou du dimethylsulfoxyde ou à d'autres nécessaires à la photopolymérisation UV((26)

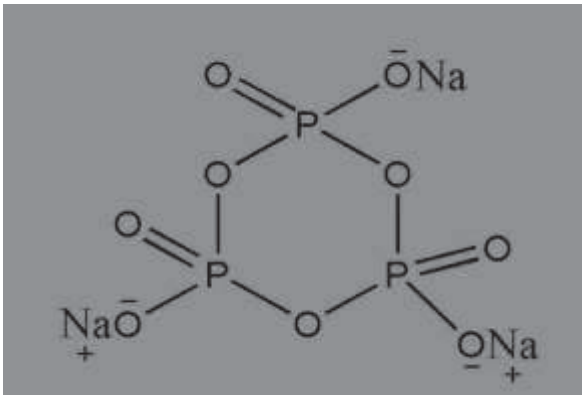


FIGURE 8 : Trimetaphosphate de sodium

Des films de PVA, suturés sous forme de tubes d'environ 2 mm de diamètre, présentaient des propriétés mécaniques compatibles avec les contraintes hémodynamiques du système artériel.

Les travaux de Marc Chaouat ont confirmé le bon comportement biomécanique, et la perméabilité des prothèses de PVA in vivo à court terme, (7 jours d'implantation)avec pour modèle , le remplacement d'une portion d'aorte sous rénale de 1cm chez le rat.

FIGURE 9 : A Film de PVA ; B Film de PVA suture sur lui-même sous forme tubulaire; C Perméabilité confirmée par artériographie à J7

Ino et al(27), dans la suite des travaux de Chaouat,(28) a amélioré le fabrication de tubes, par une méthode de congelation séchage, en air ambiant ou par une méthode dite de coulage.

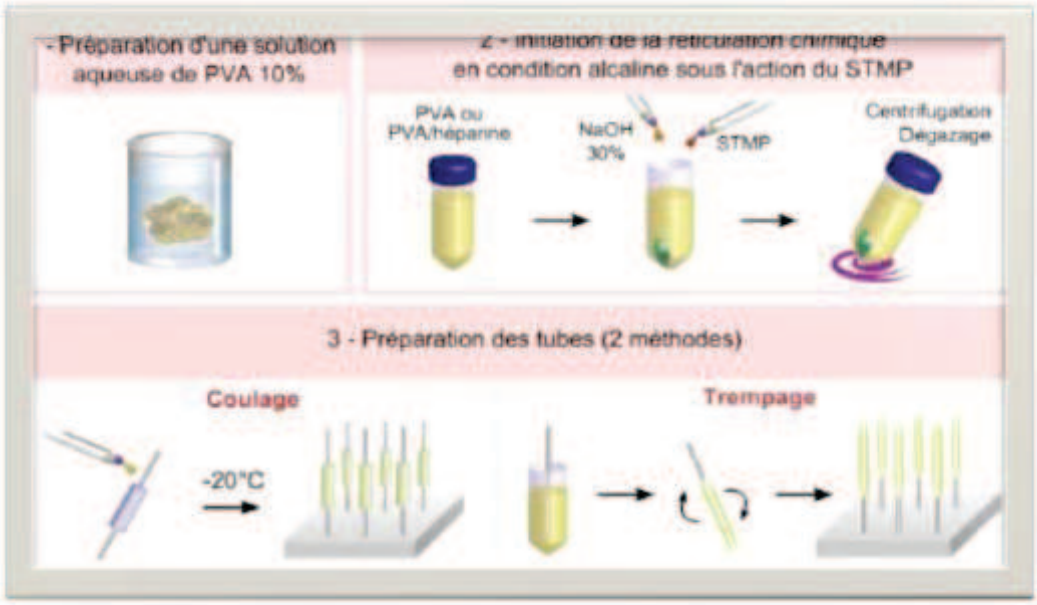


FIGURE 10 : Préparation des tubes de PVA par coulage et dipping selon INO.

Dix grammes de PVA (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA. M_w entre 85 000 et 124 000 et un degré de saponification entre 87 et 89%) sont dissout dans 100 mL d'eau distillée à 90° par agitation jusqu'à dissolution complète puis ramené progressivement à température ambiante. 7.5 mL d'une solution aqueuse de 15 % (w/v) STMP (Sigma-Aldrich) sont ajouté au PVA en agitant constamment la solution pour obtenir un mélange homogène. Un volume de 3ml de NaOH (30% w/v) est alors ajouté, toujours sous agitation continue. Après 5 mn, le mélange obtenu était coulé dans un moule constitué par un axe téflonisé de 1.5 mm dans une pipette polypropylène de 5 mm de diamètre. L'ensemble était placé au congélateur à -80° pendant 15 minutes. Le tube laissé sur son axe était alors démoulé de la pipette rapidement, puis était séché à l'air ambiant verticalement sur un socle pendant 24 heures. Le tube était ensuite réhydraté dans de l'eau distillée, l'axe téflonisé était retiré et le tube était rincé plusieurs fois pour enlever les résidus de STMP et de soude. Ensuite, le tube pouvait être conservé dans de l'eau distillée à 4°C ou laissé sécher à nouveau pour une utilisation ultérieure. Par la suite, Ino, avec l'aide de Michael Atlan, a orienté son travail, vers le développement d'une prothèse préalablement endothélialisée, avant implantation soit par incorporation de gelatine, d'héparine ou encore par fonctionnalisation (greffage de groupement NH2) par Plasma Micro Onde(29).

La stratégie retenue pour l'endothélialisation du PVA a consisté à incorporer à la formulation du gel de PVA, une macromolécule favorable à l'adhérence cellulaire. Parmi l'éventail de macromolécules bioadhésives (collagène, fibronectine...), nous avons choisi la gélatine, un produit protéiné obtenu par dénaturation du collagène. La gélatine est autorisée par la FDA et l'ANSM et est maintenant fréquemment utilisée pour la préparation de gels à applications biomédicales. Elle a l'avantage d'être moins antigénique que le collagène, tout en présentant des peptides d'adhésion encore intacts, notamment la séquence RGD.

Des matériaux hybrides PVA/gélatine ont déjà été proposés comme support tridimensionnel, pour la culture de fibroblastes. Plus récemment, l'équipe de McGuiness a développé des gels de PVA/gélatine "endothélialisables" pour l'ingénierie vasculaire, obtenus par une réticulation physique combinant des cycles de congélation/décongélation et des bains de coagulation(30,31) La strategie d'incorporation de gelatine a montré que l'adhérence, l'attachement, et la proliferation des cellules endothéliales etaient optimales avec un ratio de gelatine à 1%, avec une quasi confluence cellulaire (Figures 11 et 12), meilleures qu'avec le PVA seul, tout en conservant de bonnes proprietes mécaniques (Tableau 1). De plus l'hémocompatibilité était comparable au PVA seul (avec une adhésion plaquettaire faible, et pouvoir thrombogène faible) mais l'adsorption de la fibronectine (signal cellulaire important pour l'adhésion cellulaire) de l'hybride PVA gelatine était supérieure au PVA seul..

	FILMS			TUBES			
Materials	TS (MPa)	EB (%)	EM (MPa)	Thickness (µm)	Compliance (% par mmHg×10⁻²)	Burst pressure (mmHg)	Suture retention (gmf)
PVA	0.9 ± 0.4	249 ± 71	0.54 ± 0.11	382 ± 13	5.1 ± 0.2	673 ± 27	70 ± 4
PG1	1.6 ± 0.6 *	376 ± 36 *	0.73 ± 0.05 *	388 ± 10	6.5 ± 0.6	544 ± 25	70 ± 6
PG5	1.6 ± 0.3 *	382 ± 44 *	0.70 ± 0.05 *	410 ± 5	7.4 ± 0.3*	484 ± 27*	75 ± 5
PG10	1.4 ± 0.4 *	328 ± 38 *	0.77 ± 0.12 *	421 ± 23	7.6 ± 0.5*	446 ± 36*	70 ± 4
Rat abd aorta	-	-	-	89 ± 8	6.4 ± 0.4	> 3000	107 ± 11
hITA [a]	-	-	-	108-557	4.5-6.2	2031-4225	200 ± 119
hSV [b]	-	-	-	350-710	0.7-1.5	1680-2273	196 ± 2

[a] hITA = human internal thoracic artery, [b] hSV = human saphenous vein.

Tableau 1: Comparaisons des propriétés mécaniques: module élastique, compliance, pression d'éclatement, capacité de retention suture du PVA ,et PVA gélatine

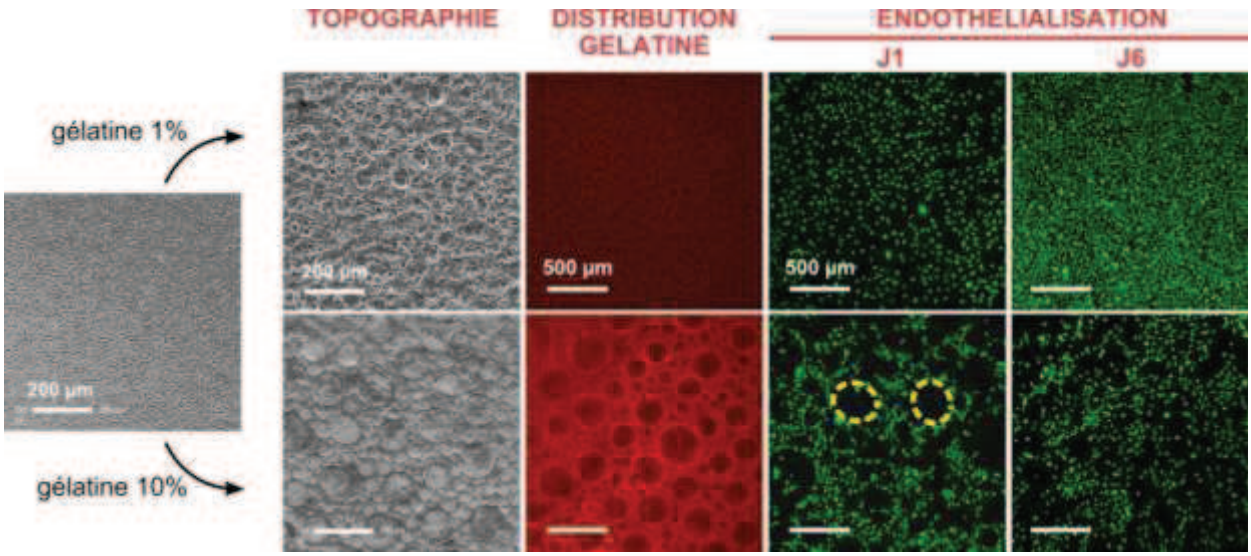


Figure 11: Endothélialisation à J1 et 6, de tubes à base de PVA gelatine 1% et 10% (selon Ino)

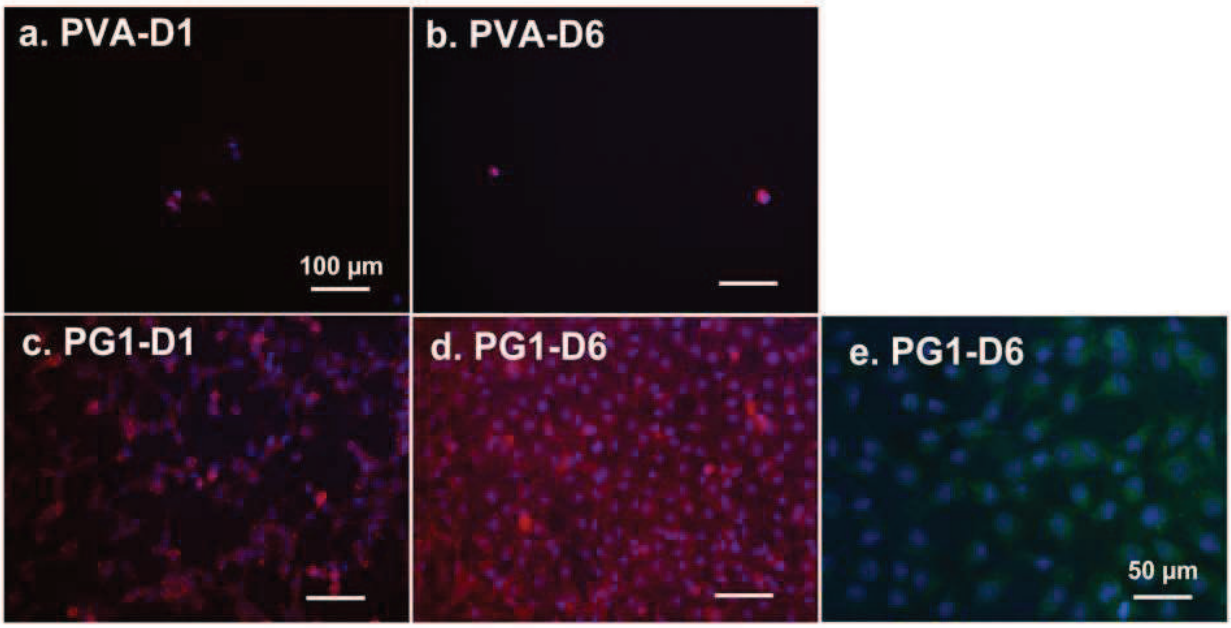


Figure 12: 1 a et b , Cellules endothéliales cultivée ssur PVA à J1 et J6

c,d ,e Cellules endothliales cultivées sur PVA gelatine 1% J1 et J6.

Objectifs du travail de thèse

Ce travail s'articule de la manière suivante:

Dans une première partie, nous avons souhaité évaluer si les bonnes performances biomécaniques des prothèses de PVA, pouvaient permettre d'améliorer l'entrainement des futurs microchirurgiens avec le développement d'outils innovants.

Dans une seconde partie, nous montrerons, l'interêt d'un nouvel outil d'exploration vasculaire,base sur l'IRM sans injection de produit de contraste, que nous avons appliqué à l'évaluation de la perméabilité de ces microprothèses vasculaires

Dans une dernière partie, nous évaluerons les performances de microprothèses(basées sur le PVA, le PVA héparine et le PVA gelatin) comme moyen de remplacement vasculaire, *in vivo*(implantation chez le rat), ainsi que leurs hémocompatibilité, le contenu en eau, en gelatine, héparine .Une etude de la texturation luminale *in vitro* et une analyse biomécanique ont aussi été réalisées . Il fallait notamment pour la gélatine verifier si l'amélioration des capacités, d'adsorption protéique, d'adhésion et de prolifération cellulaire in vitro, avait une traduction in vivo et si l'endothélialisation était une des raisons de ce bénéfice attendu.

De plus, nous avons voulu fiabiliser le procédé de fabrication des tubes qui consistait en des films suturés sur eux-mêmes ou, des tubes préformés mais avec des conditions de séchages non contrôlées, lors du dipping ou du coulage.

I) Entrainement et simulation en microchirurgie:

les micro implants vasculaires à base d'alcool polyvinylique , comme modèle d'entraînement à l'anastomose microchirurgicale chez le novice.

La microchirurgie est une compétence technique, d'anastomose de vaisseaux ou canaux de petits diamètres (artères, veines, canaux déférents, canaux lymphatiques). Elle n'est pas une procédure chirurgicale à part entière mais une étape des reconstructions par lambeaux libres. Dans certains pays asiatiques, des « techniciens de microchirurgie », sont formés et dédiés à la seule et unique réalisation de ce geste afin de libérer les chirurgiens de cette « contrainte ».

L'échec d'une anastomose a un retentissement majeur sur le devenir fonctionnel et cosmétique d'une reconstruction; de surcroit, c'est une source de morbidités très importantes et les « sauvetages » ne réussissent pas toujours.

L'acquisition de cette compétence ne peut se faire seulement au cours du compagnonnage chirurgical classique, et doit être précédé d'un entrainement, menant à la validation d'objectifs. Le chirurgien doit réunir des qualités de vision stéréoscopique, des compétences visuo-spatiales (32–34)(les mains sont capables de gestes très fins sous microscope par la coordination œil-main), et de dextérité/contrôle manuel (tremblements, fluidité) La courbe d'apprentissage est importante, avec des phases plateaux longues (35,36).Le maintien des compétences est une encore autre problématique tout comme la précocité de l'acquisition. En France, en dehors de la formation initiale des chirurgiens, il existe des diplômes universitaires, pour l'acquisition des compétences microchirurgicales.

Ces diplômes valident la réalisation d'une anastomose microvasculaire dans diverses situations, répétées le plus souvent sur le rat, modèle organique dit de haute fidélité.

Ces diplômes sont des formations validantes, mais pas certifiantes; en d'autres termes, leur délivrance confirme la réalisation d'un curriculum, d'objectifs validés, mais ne délivre pas d'autorisation « officielle » d'exercer la microchirurgie, permettant de préjuger de la fiabilité de l'opérateur, en situation clinique réelle.

L'exposition trop précoce, des novices, au rat, est discutable éthiquement, en raison d'un taux d'échec élevé, mais aussi du point de vue du coût pour l'entretien des animaux de laboratoires, par un personnel qualifié.

Les Diplômes Universitaires ou Interuniversitaires, (DU)/(DIU) en France, sont obligatoires à l'obtention du titre de chirurgie de la main (via l'orthopédie ou la plastique) et très fortement recommandés sinon obligatoires en chirurgie plastique, Le curriculum des DIU de microchirurgie français est très hétérogène, en France et à l'étranger, mais aussi dans les différentes universités (27–31). L'essentiel de l'enseignement, est centré sur la microchirurgie vasculaire et sur la dissection, des petits vaisseaux.

Les internes, chefs de cliniques ou chirurgiens, sont entrainés par un enseignement spécifique, en dehors de la formation initiale (DES, DESC) à la microchirurgie dans les disciplines suivantes par des Diplomes universitaires ou Inter- universitaires (DU/DIU) de techniques micro-chirurgicales : Orthopédie, Chirurgie Plastique, Chirurgie maxillo-faciale, Neurochirurgie, ORL et plus rarement en gynécologie.

La formation est théorique et pratique, mais la répartition, comme le contenu, sont laissés au libre choix des équipes pédagogiques avec des modalités très variables (37,38):

- remise d'un mémoire ou examen de fin d'année, examen écrit et ou oral
- sessions d'entrainement indépendantes avec validation par un sénior à chaque session jusqu'à validation d'un ensemble de chirurgies prédéfinies par palier de difficultés

- entrainement face à face avec un sénior à chaque session
- auto---évaluation ou la validation peut être clinique (patency test) ou avec l'aide d'un écho-doppler/ Contrôle continu ou évaluation sur 1 à 2 journées
- entraînement au choix ou au contraire une séquence obligatoire d'anastomoses de difficulté croissante

Les modèles principaux impliqués dans l'apprentissage sont

- les simulateurs synthétiques (ex : tubes de silicone, compresses)
- -simulateur organique basse ou haute fidélité (rat).

Le passage sur le modèle vivant haute fidélité, principalement le rat, est souvent trop précoce et finalement inadéquat pour des débutants.

De plus les entrainements, sur les modèles de basse fidélité synthétiques sont parfois non proposés dans certains DU ou alors pendant un laps de temps tres court.

Parmi les modèles basse fidélité organiques ou synthétiques, on trouve des manipulations sur compresses,jeux(39)(40) avec systeme de clou sur une planche, les pattes d'oie ou de poulet ou canard, aorte thoracique de poulet(41) mais aussi --- nouilles japonaises konnyaku shirataki(42), lombric, tubes en silicone, voire placenta(43)

Ces modèles simples permettent l'acquisition adéquate de :

- la gestuelle de base des instruments
- la familiarisation avec l'utilisation du microscope,
- les principes des micro-anastomoses, sans sacrifices d'animaux excessifs.

Notion de simulation chirurgicale

« Le terme simulation en santé correspond à l'utilisation d'un matériel (mannequin, simulateur procédural), de la réalité virtuelle ou d'un patient standardisé pour reproduire des situations ou des environnements de soin, dans le but d'enseigner des procédures diagnostiques et thérapeutiques et de répéter des processus des concepts médicaux ou des prises de décision par un professionnel de santé ou une équipe de professionnels. »

Dans Etat de l'art (national et international) en matières de pratiques de simulation dans le domaine de la santé, Rapport de mission, haute autorité de Santé (HAS), Janvier 2012.

« Jamais la première fois sur un malade »

La simulation en santé n'est pas concept nouveau mais émerge en France, qui est inégalement répartie dans le territoire alors qu'en Europe c'est une donnée acquise de l'enseignement.

C'est même un argument d'attractivité pour les étudiants des facultés de médecine. Le regain d'intérêt de ces dernières années pour la simulation rejoint les injonctions du paradigme sécuritaire et éthique : « Jamais en premier sur le patient ». Au delà, les normes et la réglementation de l'expérimentation animale n'autorise plus des essais « sauvages » sur l'animal et le couts de fonctionnement et d'entretien ,des animaleries tendent à une limitation de l'expérimentation animale même sur les petits animaux.

Certains simulateurs procéduraux sont dits « low- tech »: ils sont essentiellement des « part task trainer ». Ils permettent de reproduire une gamme restreinte de gestes, de manoeuvres ou de techniques : canulation de vaisseaux, tracheotomie, réduction de fracture…

Ils sont plutôt destinés aux novices. . La simulation favorise l'apprentissage actif et est le plus souvent bien acceptée des étudiants. La simulation électronique, la simulation synthétique, et la simulation organique sont utilisables en microchirurgie.

La simulation électronique est peu répandue du fait du cout important, de l'absence de retour de force (retour haptique) avec des instruments de petites tailles et surtout d'absence de validation qui ne justifie pas pour le moment de tels investissements(44,45).

Cependant, dans de nombreuses publications, les compétences chirurgicales sur des modèles basse fidélité sont au moins aussi efficace pour l'acquisition des techniques de bases, pour les chirurgiens novices (6, 11). Le sujet anatomique cadavérique (46)comme simulateur organique est un modèle haute fidélité mais il est compliqué à mettre en oeuvre en microchirurgie vasculaire , alors que le nombre d'étudiants est en augmentation, la disponibilité des cadavres tend à diminuer .

Le rat constitue, un modèle organique haute fidélité de choix, pour la microchirurgie, mais avant de pouvoir exploiter, les possibilités de ce modèle, il faudrait avoir acquis la gestuelle de base, sur un modèle basse fidélité. Les exigences actuelles en terme de réglementation, de "maintenance" des animaleries, mais aussi d'éthique animale ne permettent plus une utilisation non maitrisée, de ces modèles pour l'entrainement microchirurgical.

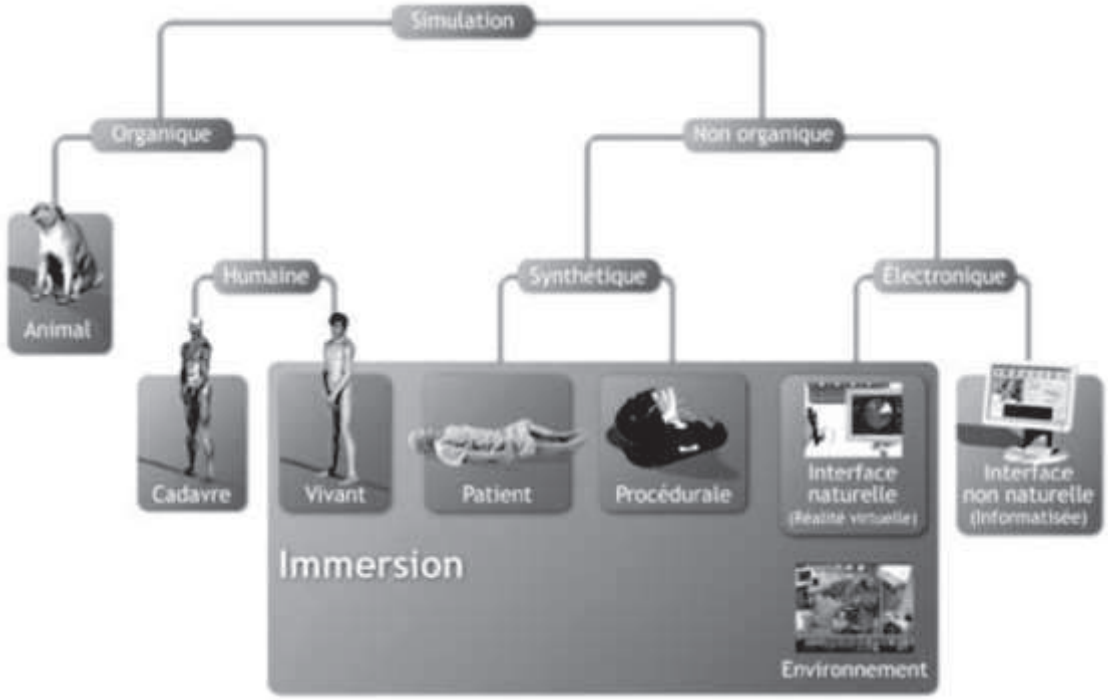


Figure 1: Les différents type de simulateur selon ChiniaraG.Simulation médicale pour l'acquisition des compétences en anesthésie.In:Société française d'anesthésie et de réanimation, ed. Congrès national d'anesthésie etde réanimation 2007.Conférences d'actualisation.Paris:SFAR;2007

Des dispositifs électroniques ont été développés (38) en microchirurgie pour le placement des points, élément essentiel de l'anastomose microchirurgicale avec les inconvénients de cout de développement l'absence de retour de forces et la limitation à reproduire l'environnement chirurgical réel.

Nous proposons d'après les travaux issus de notre thèse de science, un modèle de vaisseaux différent du tube de silicone jusque là, utilisé, dans le DU de microchirurgie de l'école de Chirurgie de Paris, (université Pierre et Marie Curie).

Le but de ce travail est de vérifier l'intérêt des micro- prothèses vasculaires en PVA gélatine, pour l'entraînement à la réalisation d'anastomoses microchirurgicales, en comparaison avec le modèle utilisé dans le DIU de techniques microchirurgicales de Paris VI, Université Pierre et Marie Curie. Le modèle proposé est un tube qui a des propriétés mécaniques proches du vaisseau humain. L'utilisation de ce modèle synthétique de « fidélité améliorée » plutôt que le silicone améliore t-il l'acquisition des performances sur le modèle animal ?

L'objectif de ce travail est d'évaluer si l'utilisation des micro-implants vasculaires de PVA gélatine, comme simulateur basse fidélité, influence les performances des novices lors de la réalisation d'anastomoses artérielles de carotide et d'aorte du rat, en comparaison avec le tube de silicone antérieurement utilisé.

UPMC SORBONNE UNIVERSITÉS — afaq ISO 9001 — FACULTÉ DE MÉDECINE PIERRE & MARIE CURIE

Médecine Chirurgie

Nouveau

Techniques microchirurgicales

Avertissement

Cette formation diplômante peut entrer dans le cadre de la :
- Formation Initiale (FI) : étudiants (internes, licence, master...), chefs de clinique inscrits en DESC.
- Formation Continue Individuelle (FCI) : libéraux, salariés et individuels non pris en charge.
- Formation Continue Employeur (FCE) : demandeurs d'emploi et salariés avec prise en charge financière.

Responsable : Pr Masquelet

Public et prérequis

Docteurs en médecine titulaires du C.E.S. ou D.E.S. de chirurgie générale ou les médecins ayant reçu la qualification en chirurgie générale par la commission de qualification de l'ordre des Médecins.
Docteurs en médecine titulaires d'un C.E.S. ou D.E.S. de spécialité chirurgicale, stomatologie, ophtalmologie, O.R.L., gynécologie obstétrique, maxillo-faciale, ou ayant reçu la qualification correspondante par la Commission de qualification de l'ordre des Médecins.
Les étrangers titulaires d'un diplôme permettant d'exercer la médecine dans leur pays.
Internes ayant validé trois semestres de chirurgie
Docteurs vétérinaires.

Prérequis : Le Diplôme s'adresse aux personnes ayant reçu une formation élémentaire en microchirurgie expérimentale vasculaire (un justificatif sera demandé obligatoirement lors de la pré-inscription).

Objectifs

L'apprentissage des techniques microchirurgicales fait désormais partie intégrante de la formation des futurs chirurgiens quelles que soient leurs spécialités. Cet apprentissage s'avère nécessaire et indispensable pour l'exercice de certaines spécialités (chirurgie de la main, chirurgie plastique, chirurgies ORL et maxillo-faciale, neurochirurgie...).

Contenus

Cours théoriques : Microchirurgie appliquée à la clinique et dans toutes les spécialités : Lambeaux cutanés vascularisés, transferts osseux vascularisés, allogreffes de la face et de la main, reconstruction mammaire, reconstruction de la face et du cou, micro-neurochirurgie tumorale et vasculaire, transferts d'orteils, transferts vascularisés en chirurgie digestive.....
Travaux pratiques sur l'animal de laboratoire: Le programme est composé de plus de 20 techniques à réaliser selon un apprentissage par difficultés croissantes :
Dissections et anastomoses termino-terminales et termino-latérales : aorte, iliaque, carotide, veine jugulaire, vaisseaux fémoraux, anastomose porto-cave, nerf sciatique.
Pontages et greffes vasculaires : Aorte par la veine jugulaire, carotide par la veine faciale, artère fémorale par la veine épigastrique.
Greffes d'organes et lambeaux : Auto-transplantation rénale avec anastomoses termino-terminales et termino-latérales. Lambeau inguinal in situ, transféré sur le site opposé et transféré au cou et sur les vaisseaux axillaires.

Organisation

Cours théoriques : 25 heures au total réparties en 6 sessions.
Enseignements dirigés et pratiques Chaque étudiant a 4 heures d'entrainement pratique par semaine soit 120 heures de TP.

Calendrier

Du 03 Novembre 2014 au 12 juin 2015

Contrôle des connaissances

Examen écrit : note sur 10 – 1 h
Mémoire et présentation orale du mémoire : note sur 10 – 30 mn
Examen pratique : note sur 40 – 6h
3 techniques microchirurgicales sur l'animal de laboratoire doivent être réalisées le jour de l'examen.

Validation

Diplôme d'université

Tarif

Droits universitaires : **261.10 €**
Droits d'enseignement : F.Initiale : 1.000 €
F.C Individuelle : 2.000 €
F.C Employeur : 2.000 €

Inscription Pédagogique

Autorisation d'inscription pédagogique préalable à l'inscription administrative et renseignements pédagogiques
Une demande d'autorisation d'inscription préalable devra être faite entre le 08 septembre et le 17 octobre inclus.

Pr A.C Masquelet - Secrétariat : Mme Eriale
Ecole de Chirurgie
7 Rue du Fer à Moulin - 75221 Paris Cedex 05
Tél 01 46 69 15 62 - Fax 01 46 69 15 25
Mail : ecole.chirurgie2@eps.aphp.fr

Inscription administrative

Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie (Code 0---)
« Les Cordeliers » 15, rue de l'école de médecine - Esc. H – RDC 75006 Paris
Tél. : 01 44.27.45.76/82 ou 94
Email : scolmed3@upmc.fr

Renseignements, tarifs et dossier téléchargeable :
www.fmpmc.upmc.fr (Formations, inscriptions)

Inscription préalable pour prise en charge par un financeur: (FCE)
UPMC – Formation Continue www.fc.upmc.fr **(Code D27)**
Tél : 01.44.27.82.46/47/49/45 - Fax 01.44.27.82.95 fcmedecine@upmc.fr

Figure 2 ; programme DIU de microchirurgie :UPMC , Ecole de chirurgie.

Notre modèle est un micro implant de 2 mm de diamètre à base de PVA gelatine 1%, Les propriétés mécaniques(figure 3) sont très proches des vaisseaux du rat et de l'humain, et ces prothèses sont en cours d'évaluation pour le remplacement vasculaire de petit calibre avec de bons résultats par rapport aux prothèses vasculaires de petits calibres antérieurement utiliséess (Figure 4).

Figure 3 : Propriétés biomécaniques des tubes .Comparaison des implants PVA , PVA Gélatine 1% (PG1), PVA Gélatine 10%(PG10). Propriétés biomécaniques d'après INO et al.(27)

	FILMS			TUBES			
Materials	TS (MPa)	EB (%)	EM (MPa)	Thickness (µm)	Compliance (% par mmHg×10⁻²)	Burst pressure (mmHg)	Suture retention (gmf)
PVA	0.9 ± 0.4	249 ± 71	0.54 ± 0.11	382 ± 13	5.1 ± 0.2	673 ± 27	70 ± 4
PG1	1.6 ± 0.6 *	376 ± 36 *	0.73 ± 0.05 *	388 ± 10	6.5 ± 0.6	544 ± 25	70 ± 6
PG5	1.6 ± 0.3 *	382 ± 44 *	0.70 ± 0.05 *	410 ± 5	7.4 ± 0.3*	484 ± 27*	75 ± 5
PG10	1.4 ± 0.4 *	328 ± 38 *	0.77 ± 0.12 *	421 ± 23	7.6 ± 0.5*	446 ± 36*	70 ± 4
Rat							
abd aorta	-	-	-	89 ± 8	6.4 ± 0.4	> 3000	107 ± 11
hITA [a]	-	-	-	108-557	4.5-6.2	2031-4225	200 ± 119
hSV [b]	-	-	-	350-710	0.7-1.5	1680-2273	196 ± 2

[a] hITA = human internal thoracic artery, [b] hSV = human saphenous vein.

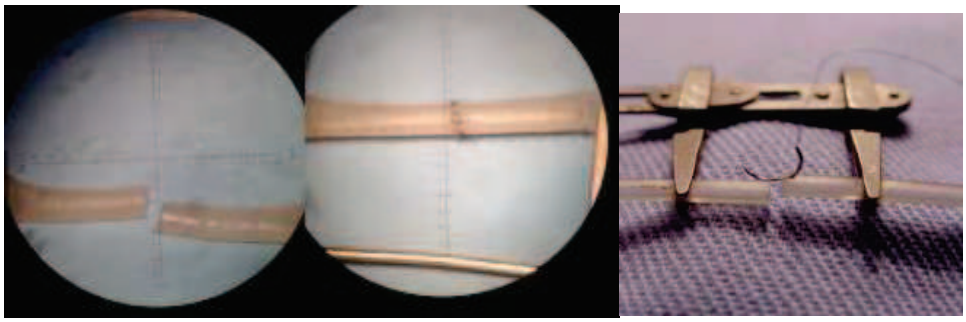


Figure 4 : Tube de silicone utilisé lors de l'entrainement à la microchirurgie.

Matériel et Méthodes

L'initiation à a microchirurgie a eu lieu du 2 Septembre au 31 0ctobre 2014 à l'école de chirurgie de Paris, rue du fer à Moulin. Le but est de donner les bases techniques de la microchirurgie vasculaire en préparation au DIU de Microchirurgie de l'université Pierre et Marie Curie.12 groupes de 4 étudiants à 10 étudiants maximum participent à cette initiation sur une session de 3 jours. L'inscription se fait de façon volontaire et payante à l'école de chirurgie du Fer à Moulin de Paris. Les candidats ne savaient pas qu'ils étaient inclus dans cette étude qui évaluait leur performance.

Le programme était le

suivant:

Jour 1 :

- cours théorique le matin.

- exposition aux modèles synthétiques l'après midi : compresses, tubes. Visualisation d'un film la veille sur les techniques du lendemain

Jour 2 :
-Exposition aux modèles synthétiques tubes: matin

-Premier essai d'anastomose sur le rat : après midi , apres quelques notions

de dissections, et anesthesia.

3 ème jour: Anastomoses Carotidiennes et Aortiques Matin et Apres midi.

Chaque étudiant pouvait essayer deux fois chaque tâche.

Les tubes de PVA 1% gélatine ont été fournis avant le début des cours avec tirage au sort, pour attribuer le type de modèle synthétique PVA-gelatine1% ou Silicone (Figure 4).

Aucune modification du programme n'a été réalisée en dehors du changement de type de tubes en fonction du tirage au sort. Les tubes PVA ou Silicone étaient dénommés de « tubes ». A aucun moment les 2 modèles de tubes furent donnés en même temps lors d'une session.

Tous les étudiants ont été évalués sur 3 épreuves :

- 1 épreuve d'entrainement d'anastomose sur tube
- anastomoses sur l'aorte puis sur la carotide du rat.

Chaque étudiant pouvait s'entrainer sur les tubes, autant qu'ils le souhaitaient mais étaient évalués sur 2 à 3 essais, et les 2 meilleurs étaient pris en compte. Pour l'épreuve sur rat, 2 essais étaient permis

Les rats WISTAR de pesaient 300-400g, dans le cadre de la saisine 55387537, de l'école de Chirurgie de Paris. Les étudiants étaient évalués par 2 observateurs (Chirurgiens, techniciens de labo) qui ont en charge les étudiants, et qui ont relevé : les données démographiques (âge, sexe, tabac, semestre, spécialité), problèmes de convergence oculaire, expérience L'évaluation du geste chirurgical était basée sur 2 questionnaires :

1) Le questionnaire OSATS **O**bjective **S**tructured **A**ssessment of **T**echnical Skills **for Surgical residents** spécifique au geste de l'anastomose (infra)

L'OSATS évalue la gestuelle de l'étudiant et son habilité technique

Respect des tissus /TUBES	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
	Dégats/instrument non approprié/Degats tissulaires		**Manip soigneuse avec defauts**		**parfaite manip des tissus**
Mouvement	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
	Bcp de mvt non necessaires		**Efficacité du mvt mais gestes parasites**		**efficacité max**
Prise en main /tenue des instruments	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
	maladroits répetitions /saut d'aiguille	**OK mais maladroits**			**utilisation fluide**
Fluidité /déroulement	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Plannification	**Arret fréquent et demande d'aide pour prochaine étape**				**Planni/Anticipation**
Familarisation **Avec la technique**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Connaissance insuffisante	**nécessité de répéter les instructions à chaque étape**				**habitude de tous les aspects**

2) Les critères de jugement de réussite (cf infra) de l'anastomose étaient évalués par une check-liste spécifique de l'anastomose elle-même avec une note globale de son aspect, nombre de points adapté, répartition des points, serrage des nœuds, régularité des prises de berges, notés sur une échelle de Likert+ ,durée en minutes du clampage, la présence de points transfixiants, des fuites lors du déclampage, des flaps intimaux.

Epreuve validante ANASTOMOSE DE LA CAROTIDE						
Note globale		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Nombre de points		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Répartition des points		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Serrage des nœuds		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Régularité des prises de berge		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Durée en mn						
Points transifixiants	**Oui /Non :**	-2				
Fuites	**Oui /Non :**	-2				
Flaps intimaux	**Oui /Non :**	-2				

Vidéo

Un étudiant par groupe, était tiré au sort de la façon suivante, les étudiants s'installent au hasard sur les différentes stations de travail, et c'était toujours à la même table qu'était installée le dispositif d'enregistrement vidéo sur le microscope. L'étudiant conservait la même table tout au long de son apprentissage. La « prestation » était filmée tant sur le modèle synthétique que sur le vivant. Les vidéos ont été analysées par le même questionnaire en temps réel puis en différé par la relecture des vidéos, par 2 évaluateurs en aveugle n'ayant pas connaissance de l'étudiant testé.

Evaluation du modèle synthétique, par les étudiants et les formateurs

Un questionnaire d'évaluation du modèle synthétique tubes de silicone ou PVA est rempli par l'étudiant après son exposition au modèle vivant.

Un questionnaire d'évaluation du modèle synthétique par les évaluateurs du DU, et 4 autres chirurgiens entrainés à la microchirurgie.

EVALUATION DU MODELE SYNTHETIQUE PAR LES ETUDIANTS

***APRES* ANASTOMOSE SUR RAT**

EVALUATION DU MODELE PAR l' *ETUDIANT*						
Avez vous trouvé que l'entraiment sur le tube a été utile ? Lors de votre entrainement sur le tube, pour l'anastomose, en comparaison avec votre expérience sur les vaisseaux						
score numérique de 1 (très mauvais) à 5 (excellent) des qualités du tube d'entrainement						
	o texture vaisseaux/souplesse	1	2	3	4	5
	o taille du modèle (1 trop petit – 5 trop grand)	1	2	3	4	5
	o Résistance à la pénétration de l'aiguille	1	2	3	4	5
	o Serrage des noeuds	1	2	3	4	5
Impression globale REALISME		1	2	3	4	5
NOTE GLOBALE INTERET DU TUBE /expérience sur le rat 1			2	3	4	5

EVALUATION DU MODELE SYNTHETIQUE

EN COMPARAISON

AVEC LE TUBE SILICONE PAR LES FORMATEURS

EVALUATION DU MODELE PAR *SENIORS*					
Avez vous trouvé que l'entraiment sur le tube a été utile ?					
score numérique de 1(très mauvais irréaliste non adapté) à 5 (excellent totalement adapté--- réaliste) du tube d'entrainement					
	○ taille du modèle (1 trop petit – 5 trop grand)				
	○ texture vaisseaux/souplesse	1	2	3	4	5
		1	2	3	4	5
	○ Résistance à la pénétration de l'aiguille	1	2	3	4	5
	○ Serrage des noeuds	1	2	3	4	5
Impression globale REALISME		1	2	3	4	5
	Valeur pédagogique	1	2	3	4	5
	Faisabilité dans le cadre du DIU	1	2	3	4	5

Ce nouveau tube devrait il remplacer le tube silicone ?	1	2	3	4	5
NOTE GLOBALE INTERET DU TUBE	1	2	3	4	5

ANALYSES STATISTIQUES :

Le test non-paramétrique de Mann-Whithney, a permis de comparer les résultats des groupes silicone et PVA . Le test de corrélation de Spearman (Rho) a été utilisé, pour mettre en evidence une correlation entre les scores et les caractéristiques démographiques des étudiants. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs pour un $p<0.05$. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Statview version PC.

RESULTATS

Huit groupes ont pu être inclus dans l'étude, car une autre étude était en cours à l'école de chirurgie, et nous ne souhaitions pas d'interférences. Soixante et onze étudiants répartis avec 36 étudiants dans le groupe PVA gelatin 1%, versus 35 pour le groupe entrainé au tube silicone. Tous les étudiants étaient novices, et n'avaient jamais eu aucune d'expérience pratique ou théorique à la microchirurgie. Le nombres de semestres d'internat étaient de 6.73 avec des extrêmes de 24 (2 candidats vétérinaires) à 2. La moyenne d'âge est de 27,8 ans avec des extrêmes de 38 à 24 ans. Le 'sex ratio' était en faveur des garçons, 27 femmes ,et sur 67 candidats 26 étaient fumeurs.

La répartition par spécialité chirurgicale était la suivante sur les 71 étudiants:

- 5 ORL
-18 Orthopédistes
- 9 Maxillofaciaux
-14 plasticiens
-11 vétérinaires
-14 « Autres » : gynécologues, viscéraux, neurochirurgien, urologues.

Concernant les anastomoses sur tubes, il y avait une différence significative entre les 2 groupes entrainés par le silicone et ceux entrainés par les implants 1% gelatine PVA pour l'évaluation de l'anastomose et de la gestuelle (figure 6).

Pour les étudiants ayant réalisé 2 essais le 2 ème essai était globalement meilleur, de façon significative pour l'ensenmble des étudiants mais sans différences entre les 2 groupes PVA-1% gélatine et Silicone

Les scores OSATS étaient supérieurs dans le groupe PVA gelatine que silicone : lors de l'anastomose sur l'aorte du rat (18,1 versus 16.6) et de la carotide(15.9 versus 14.2) , de facon significative(p=0.014 aorte, et p=0.047 carotide).

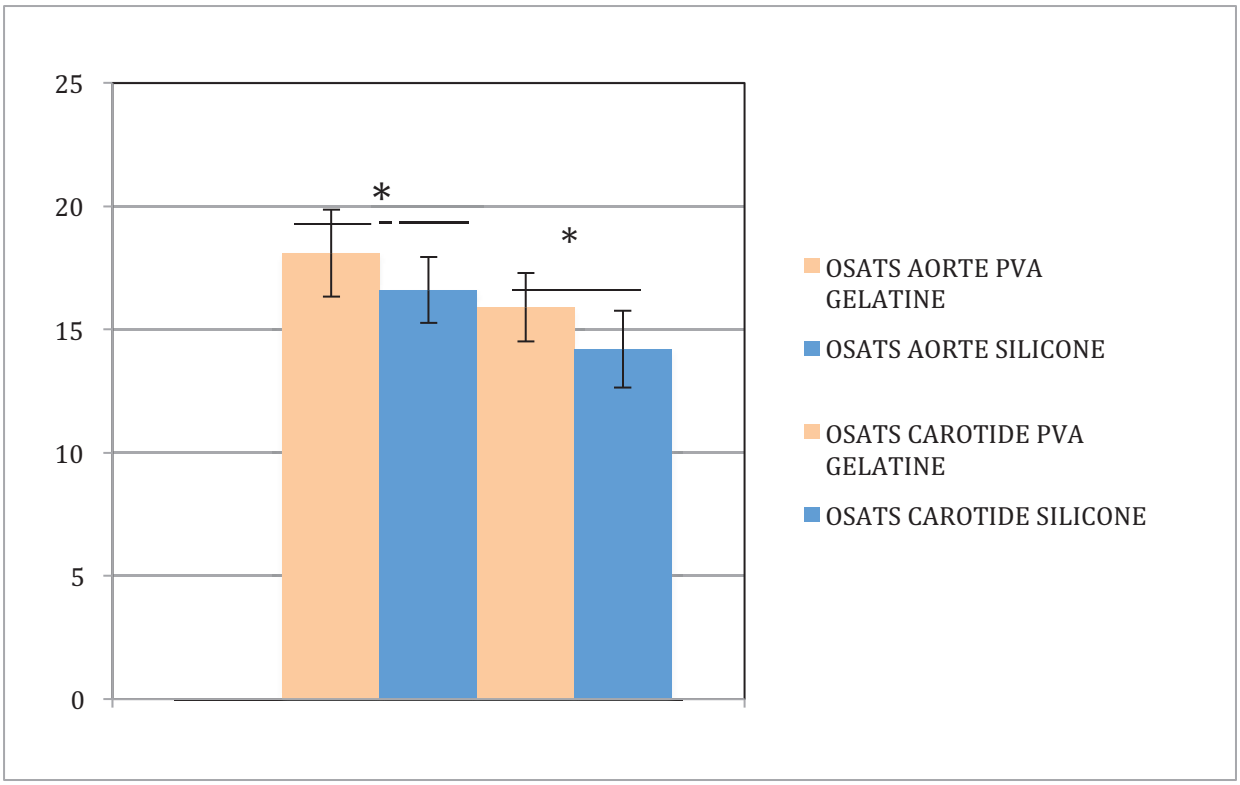


Figure 6 : Comparaison des scores moyens OSATS, des groupes entrainés par le silicone bleu et PVA gélatine % (couleur saumon)

La perméabilité, vérifiée par le test de patency, était significativement différente entre les groupes PVA et Silicone (p= 0.027) tout comme le score OSATS.

Le test de corrélation de Spearman n'a pas retrouvé de corrélation entre la perméabilité, le score OSAT, avec l'ancienneté des étudiants en semestre, le sexe et l'intoxication tabagique.

En ce qui concerne l'appréciation par les étudiants des implants par rapport aux vaisseaux natifs, après l'exposition au modèle vivant, il y a une différence significative($p<0,001$) entre les 2 groupes (jamais exposés aux 2 implants en même temps) en faveur du PVA gelatine 1% : 20,82 versus Silicone: 17,48 .

Les principales différences entre les 2 tubes retrouvées pour les items : texture, taille et réalisme .

L'appréciation des séniors sur le tube de PVA (qui connaissaient les tubes de silicone) a impliqué 6 personnes: 3 techniciens et évaluateurs du DIU, 2 CCA rompus à la microchirurgie (> 30 cas) et un Praticien Hospitalier. Cette tendance est retrouvée avec une note de 21 (reprenant les mêmes items que les étudiant) mais avec une note sur l'item « ce tube pourrait il remplacer l'ancien ?» de 3.9/5. Mais avec les remarques suivantes résumées:

« tubes plus souples, taille adaptée, bonne pénétration de l'aiguille mais l'effet de rapprochement des berges est artificiel et non conforme à la réalité ».

Concernant la vidéo, les étudiants tirés au sort (n=8) avaient des scores OSATS pour l'anastomose, significativement plus faibles ($p<0.005$) qu'en temps réel, de 1.1 points (Figure 7)

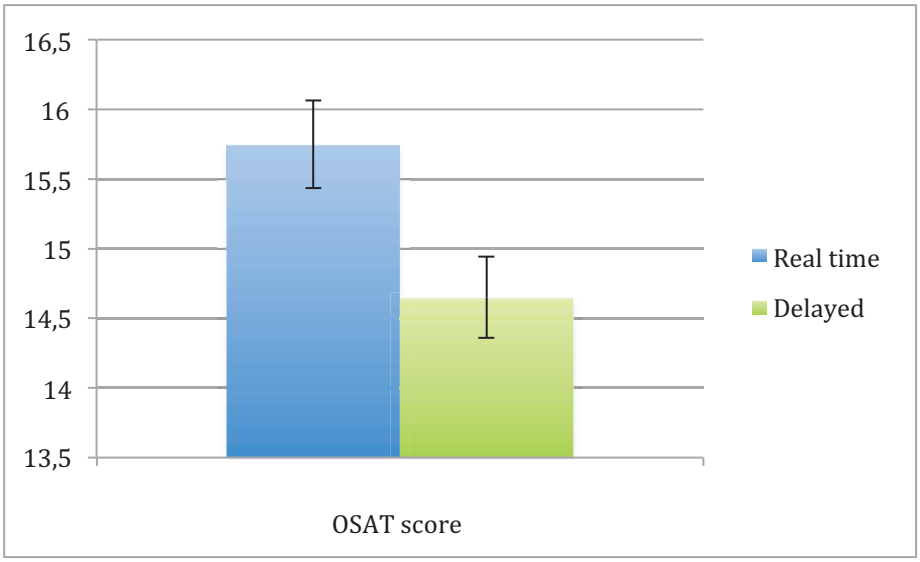


Figure 7 : Comparaison des scores OSATS , évalués en temps réel et en différé

DISCUSSION

Après entrainement sur notre modèle, (micro implant de PVA Gelatine 1%) notre étude a montré une amelioration significative, des performances des étudiants novices, pour la realisation d'anastomoses microvasculaires chez le rat, comparativement à l'entraînement sur tube en silicone. Notre hypothèse qu'un implant, aux propriétés bio-mécaniques , plus proches du vivant qu'un tube de silicone, améliorerait les performances des étudiants s'est vérifiée. Enfin les étudiants après avoir fait leur expérience sur le modèle vivant ont mieux noté la nouvelle prothèse, que l'ancien tube en silicone. La différence de score de « fidélité et de reproduction du vivant », entre le tube de PVA et le tube de silicone est significative et en faveur du tube de PVA. Si le modèle synthétique permet une diminution du nombre de tentatives ,s ur animaux pour valider les taches demandées, cela épargnera des rats , et conduira à des réductions de couts. En effet le cout unitaire d'un rat est de 20 euros, alors qu'il ya dans certains DIU jusqu'à 30 interventions à valider, sans compter les rats d'entrainement. Les fils de microchirurgie, 35 à 70 euros et en moyenne 1 à 2 fils sont utilisés, les anesthésiques, sans compter les dépenses de l'animalerie, entretien et personnel mais aussi les techniciens…

La repartition des étudiants dans notre série est homogène avec celle d'autres auteurs(47) et nous n'avons pas retrouvé correlation , en fontion des différentes spécialités, ni meme en fonction du sexe. Pour certains auteurs, il y a une difference entre les sexes, ainsi des bonnes performances psychomotrices initiales chez le garcon (48) seraient un facteur prédictif de bonnes performances microchirurgicales , ce qui n'est pas le cas chez la fille don't les performances sont indépendantes de ses performances initiales .

L'OSATS, a montré pour l'entrainement en laboratoire peu importe le type de modèle une haute fiabilité inter-évaluateur, ainsi que de bonnes cohérences et validité interne. La fiabilité et la validité , du questionnaire OSATS ont été démontrées en chirurgie (49,50) notamment coelioscopique ou en orthopédie.Des questionnaires proches de l'OSATS ont déjà été utilises et validés en microchirurgie(51,52).

L'adaptation du questionnaire, nous a permis de mettre en évidence la supériorité du tube PVA gélatine sur le silicone pour l'amélioration des performances du score OSATS.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas pu réaliser ce travail sur toute la durée du diplôme mais uniquement sur l'initiation à la microchirurgie.

De ce fait, l'exposition au modèle basse fidélité est très courte, comparativement au temps passé sur le vivant (1.5 jours complets).

Mais le rat reste la base de l'entrainement (30)(38) dans toutes les formations car il est le seul qui reunissent des conditions de 'stress' les plus proches du réel notamment le temps de dissection, la gestion anesthétique,le flux sanguin , le saignement,la respiration,le patency test…

De façon anecdotique, il existe meme un modèle synthétique haute fidélité de rat PVC Rat (53,54), destiné à l'entrainement microchirurgical mais ni la validité, ni la fiabilité de ces modèles n'a été évalué de façon adequate. Nous ne pouvons savoir si une exposition plus prolongée au tube synthétique aurait pu améliorer, la performance des étudiants sur des taches plus complexes.

L'« initiation à la microchirurgie » qui se fait sur un temps court, est moins propice à une intégration à long terme des compétences techniques.

D’autre part, la puissance de l’étude aurait pu être plus importante, mais une autre étude était en cours sur un sujet proche et nous n’avons pas voulu rajouter des biais.

La simulation chirurgicale, permet de diminuer la pente de la courbe d’apprentissage pour les stagiaires débutants et d'améliorer les compétences visuo spatiales essentielles, en microchirurgie , de plus cela permet un apprentissage “serein” de la gestion du microscope tout en épargnant des rats.

A des fins d’évaluation objective, il existe des échelles de notations globales évaluées avec succès en microchirurgie: OSATS (51,52)University of Western Ontario Microsurgery Skills Acquisition/Assessment (UWOMSA) .

Ces 2 échelles sont d’ailleurs bien corrélées entre elles et le UWOMSA intègre une évaluation différée par enregistrement vidéo.

Dans l’état actuel des choses, les responsables des DIU/DU de microchirurgie, conservent le modèle organique (rat) le plus utilisé, et des modèles synthétiques divers. L’évaluation des performances, des étudiants, basée sur un score global, une analyse des mouvements des mains et un test de perméabilité de vaisseaux tests sont de bons moyens d’évaluation.

L’évaluation de ces performances au bloc opératoire, ne peut pas, pour le moment, reposer, sur les questionnaires utilisés au laboratoire car leur validité n’a pas été

démontrée en situation clinique humaine (55)où les paramètres de l'expérience sont par définition moins bien contrôlés qu'en laboratoire de microchirurgie.

L'évaluation vidéo , base du questionnaire, (29,42) de l'université de Western Ontario (Figure infra) a l'avantage de ne pas mobiliser un observateur pour évaluer les candidats. Les échelles utilisées dans le UWOMSA.d'après des enregistrements vidéos des étudiants sont très riches et précises, ce qui permet d'évaluer plus d'items qu'en temps reel avec plus d'objectivité et de sérénité.Mais ces questionnaires demandent de l'entraînement à l'observateur avec l'avantage de pouvoir choisir les sequences video d'interets et du caractère différé ce qui représente un confort pour l'évaluateur.

Dans notre travail (même à un très faible effectif d'étudiants par groupe), ce jugement différé semble plus sévère que l'évaluation en direct par les observateurs. Concernant la vidéo, une revue systématique de la littérature de Sutherland et al (56)a repris 30 essais contrôlés randomisés, sur l'enseignement chirurgical, la simulation informatique, simulation vidéo, et les modèles synthétiques, versus l'enseignement standard. Ils concluent que la simulation vidéo, bien que pleine de promesses, n'augmente pas de façon significative la qualité de la formation. Pour d'autres, la video peut etre utile, à l'étudiant qui peut visualiser sa performance et prendre conscience de ses erreurs(57) et améliorer plus rapidement ses performances.

L'évaluation vidéo, permet du fait du caractère différé une analyse plus objective, sans l'affect lié à la présence de l'étudiant tout en permettant d'analyser de facon répétée les gestes ce qui explique des résultats moins bons lors de l'analyse video des 8 étudiants concernés dans notre série.

KNOT TYING MODULE

A. QUALITY OF KNOT

1 2 3 4 5

Not square	Partially square	Square
Loose	Somewhat loose	Snug
Cut ends too long/short	Cut ends OK length	Cut ends proper length

B. EFFICIENCY

1 2 3 4 5

Many wasted moves	Some wasted moves	No wasted moves
Regrasps multiple times	Regrasps occasionally	Grasps once only
Does not pull needle out of field	Sometimes pulls needle out of field	Always pulls out of field

C. HANDLING

1 2 3 4 5

Multiple passes	A few passes	Single pass
Grasps tip of needle	Sometimes grasps the tip	Never grasps the tip
Does not bolster	Sometimes bolsters	Always bolsters
Pulls needle out not on the curve	Sometimes pulls needle out on the curve	Always pulls needle out on the curve

University of Western Ontario
Microsurgical Skills Acquisition Instrument: UWOMSA

Schulich
MEDICINE & DENTISTRY

ANASTOMOSIS MODULE

A. PREPARATION

1 2 3 4 5

Forgets background		Background in place
Ends set up poorly in approximating clamp		Approximating clamp applied correctly
Forgets dilatation	Rough dilatation	Gentle dilatation
No adventitial stripping	Excessive/inadequate adventitial stripping	Clean adventitial stripping

B. SUTURING

1 2 3 4 5

Inaccurate needle placement	Inconsistent needle placement	Accurate needle placement
Pulls needle through roughly	Rough/inconsistent needle passage	Takes needle out on curve
Drops suture end/inefficient knot tying	Knot tying loose/tight/ineffecient	Efficient tying
Does not look inside lumen		Always checks inside lumen
Too much movement at anastamosis with tying		Anastamosis stays still with tying

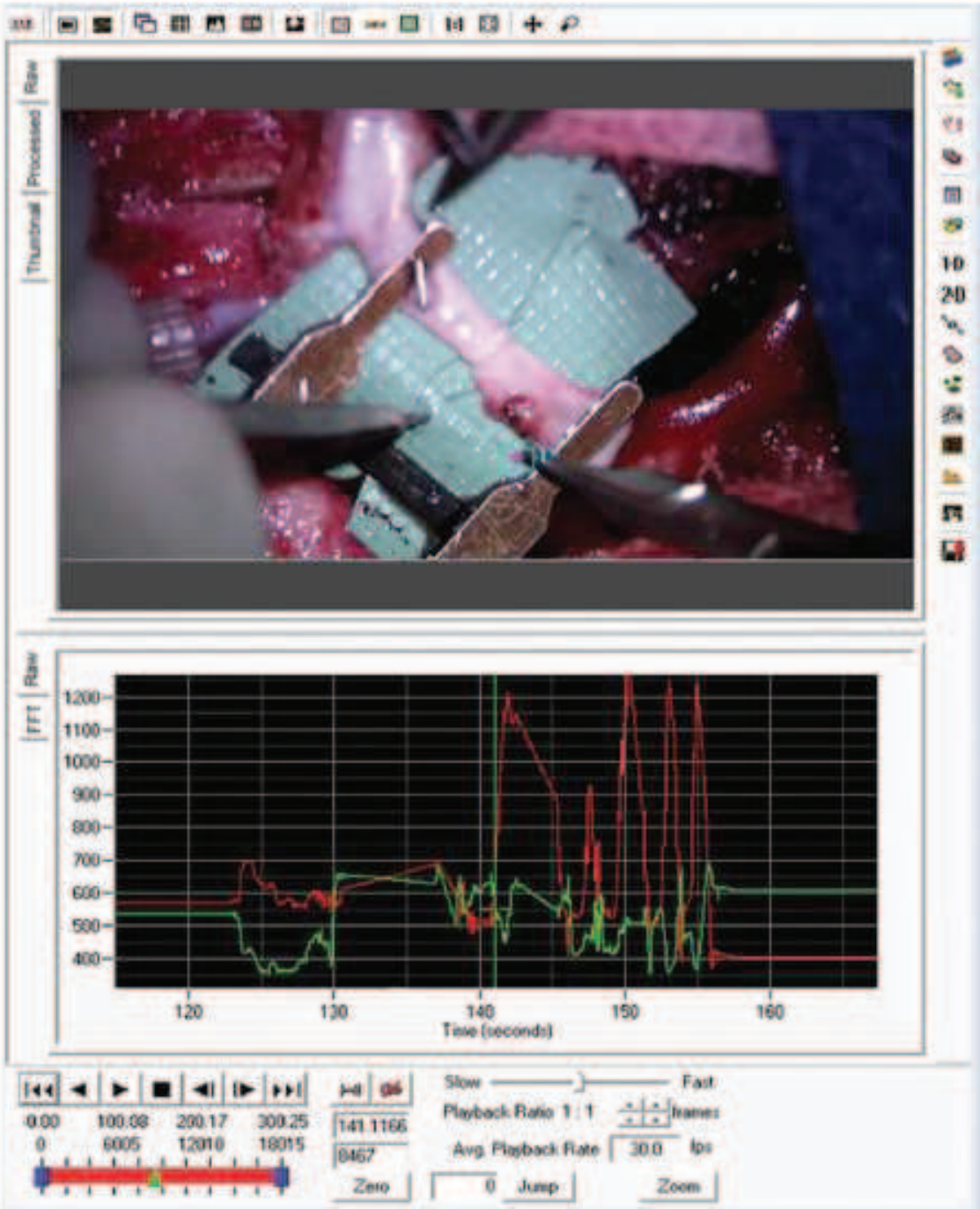
C. FINAL PRODUCT

1 2 3 4 5

Rough outer appearance	Outer appearance inconsistent/partially inverted	Smooth outer appearance
Back wall stitch	Possible back wall stitch	No back wall stitch
Not patent		Patent
Suture ends intraluminal	Some suture ends intraluminal	All suture ends extraluminal
Poor suture spacing	Suture spacing inconsistent	Appropriate suture spacing

Figure 8 : UWOMSA : KNOT TYING (réalisation de la suture) et ANASTOMOSIS (évaluation de l'anastomose) Module.

Mc Goldrich, de l'université de Stanford utilise, le meme modèle de questionnaire, avec une correction semi automatisée de l'enregistrement via à software, Pro Analyst Motion (xcite) d'analyse du mouvement(58) illustré dans la figure 9.



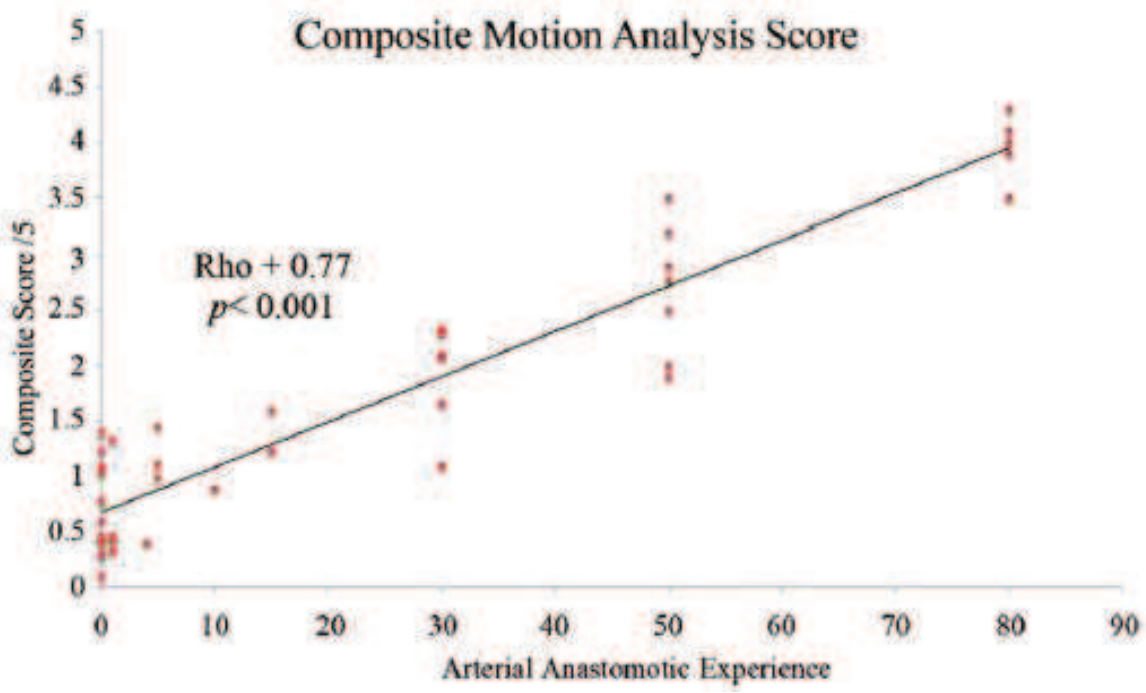


Figure 9: Pro Analyst Motion (xcite) d'analyse du mouvement , utilisé par l'équipe de Stanford

Le nouveau tube de PVA gélatine, présente pour les étudiants des qualités supérieures au tube de silicone après qu'ils aient été exposés aux vaisseaux du rat. Ce matériel pourrait même remplacer avantageusement selon les évaluateurs seniors le tube silicone. Mais jusqu'ou améliorer le tube de PVA, afin de se rapprocher du vaisseau humain, et surtout cela aura t-il une conséquence sur l'apprentissage ?

On pourrait supposer que les modèles haute fidélité donnent de meilleurs résultats en terme d'acquisition des techniques chirurgicales.

Grober et al (32)comparent 3 groupes, sur une journée : 10 n'ayant reçu qu'un enseignement théorique, 19 ayant reçu un entrainement sur tube silicone 21 un entrainement direct sur le rat (vaisseaux déférents). L'épreuve validante, le lendemain consistait en la réalisation des anastomoses de vaisseaux déférents de rats par un

questionnaire de type OSATS et vidéo. La conclusion était que :

- L'entrainement pratique surpassait significativement l'enseignement théorique dans tous les cas
- Les modèles basse fidélité microchirurgicaux (79%) sont équivalents (p = 0.039) en terme de performance par rapport aux modèles haute fidélité (76%) à long terme mais avec une « préférence » des étudiants pour le rat.

Onoda et al(59) , ont montré sur 29 étudiants, , une corrélation negative entre le nombre d'essais sur modeles synthétiques(tubes de silicone) et le nombre d'essai nécessaire à la realisation d'anastomoses perméables chez le rat.

Un élément important, non abordé dans ce travail, est la rémanence de l'effet de cette formation sur les acquisitions techniques. Les étudiants ont acquis des compétences, sur ce temps court pendant cette initiation, or pour d'autres spécialités, un apprentissage intensif sur une courte période courte s'est révélé, moins efficace sur la rémanence de l'acquisition qu'un apprentissage de temps équivelent sur un temps plus long, et de manière régulière(60), l'absence d'exposition à la microchirurgie pendant 16 semaines, chez des praticiens rompus à la technique, a pour conséquence une diminution des performances(44,45).

Il faut aussi remarquer que la France propose la formation la plus complète en microchirurgie et c'est la seule sanctionnée par un diplôme malheureusement non reconnue en Europe. La formation en microchirurgie à l'étranger, par exemple aux États-Unis et en Europe du Nord, est organisée sous forme d'ateliers courts (quelques jours) encadrés, n'excède pas une semaine et ne correspond pas à un programme d'entraînement

académique sanctionné par un diplôme (38,47,61)

Ce diplôme de microchirurgie est payant , et les coûts de fonctionnement augmentent. Diminuer le nombre d'animaux nécessaires, à l'apprentissage d'une tache, par l'utilisation de modèles synthétiques permet en outre d'épargner des animaux pour des raisons éthiques mais aussi économiques. L'utilisation de modèle synthétique, pourrait être une solution si l'on confirme que celui-ci diminue le nombre de tentatives nécessaires sur le rat pour realiser la tache demandée, pour pérenniser ces diplômes sans augmentation de coûts en diminuant le nombre de rats utilisés.

Les outils de la validation (évaluation standardisée, vidéo voire assistance ou automatisation) permettent de valider une gestuelle et la fiabilité des anastomoses, mais ne permettent pas encore de certifier des microchirurgiens pour la pratique clinique. Gràce à ces outils d'évaluation , la progression de la courbe d'apprentissage, (27,46) des étudiants peut etre suivie, . En effet il semble possible de prédire, les aptitudes microchirurgicales des étudiants. Ainsi Nugent et al (46) sur un modèle de cathéterisation artérielle, fixe a priori 1 taux d'échec arbitrairement acceptable, et ont permis de générer une courbe d'apprentissage basée sur le nombre d'essais nécessaires à la réussites de la tache. Ainsi avec un taux d'échec initial de 10 et 25%, 3 étudiants sur 6 atteignaient la compétence entre 26 et 48 tentatives. Si ce taux est arbitrairement fixé à une limite supérieure, 5 étudiant sur 6 ont obtenu la compétence avec un nombre de tentatives entre 18 et 55.

En analysant les caractéristiques des échecs, les auteurs ont caractérisés 2 items qui ont permis de discriminer les étudiants qui échouent et ceux qui réussissent. Encore mieux, ils ont réussi à développer un algorithme capable de prédire quels étudiants réussiront la tache ou non basé sur l'aspect de la courbe des nombres d'échecs ou de réussites en fonction du nombre de tentatives. Ainsi l'automatisation et l'enregistrement des performances des étudiants, pourraient avec les bons instruments nous permettre ce suivi.

Conclusion

Nous avons montré par l'utilisation d'un outil d'évaluation spécifique, que le modèle de micro-implant vasculaire par rapport au tube de silicone, a permis une amélioration chez le novice de l'acquisition des competences en microchirurgie, sur le modèle vivant..

La meilleure fidélité de ce nouveau matériau PVA 1% gélatine, pourrait faire remplacer le tube de silicone dans le DIU de microchirurgie. Il reste à évaluer l'effet d'une exposition prolongée ou une adaptation de l'exercice sur notre prothèse, sur les performances sur le modèle vivant.

D'après les données de la littérature, il semble que les modèles basse fidélité chez les novices sont aussi efficaces dans l'acquisition de la gestuelle spécifique de microchirurgie, que les modèles hautes fidélités qui semblent plus adaptés aux séniors. La pratique est la clé pour une rémanence des compétences microchirurgicales surtout lorsque l'exposition clinique est limitée pendant le temps de la formation.

L'évolution des technologies, va dans le sens de modèles synthétiques haute fidélité, avec des matériaux reproduisant au mieux la qualité des tissus, les expériences émotionnelles, la reproduction des difficultés techniques (respiration) etc…

Enfin il devient urgent d'avancer des stratégies nouvelles visant à normaliser et à objectiver la formation en microchirurgie en particulier dans l'ère de la simulation, car les différents DU /DIU de microchirurgie en France ont des fonctionnements très hétérogènes. Plus qu'un phénomène de mode, la simulation est une nécessité en terme réglementaire, de cout et d'éthique pour une formation en toute sécurité pour le patient, renforcée et fondée sur des preuves

Beaucoup de questions se posent :

- les performances sur le vivant, préfigurent celles sur le malade ?
- et ce que d'autres modèles synthétiques pourraient permettre au micro chirurgien de maintenir son niveau en cas de difficulté d'exposition modèle vivant ? (régions éloignées, terrain de guerre ?)

Perspectives et évolution:

Ce travail nous permet grâce à l'équipe pédagogique du DIU de microchirurgie de PARIS VI (Ecole de chirurgie de Paris UPMC) de continuer cette évaluation sur 2015-2016, avec des effectifs plus importants, sur une durée d'exposition plus longue à notre modèle et une évolution vers le UWOMSA canadien avec enregistrement video ou le travail de Stanford(58)

D'autre part dans la continuité de ce travail nous avons soumis un projet MITRAD – robotized microsurgery training device, à l'IUIS grâce aux étudiants de l'ISIR au sein de l'UPMC, pour laquelle notre équipe a obtenu une bourse de 10000 euros pour la conception d'un prototype en 2015.

Nous présentons ici les travaux des étudiants, que nous avons pris en charge.

Le cahier des charges fut celui-ci:

- Créer une plateforme d'entraînement à la microchirurgie, avec comme modèle un tube de PVA gelatin 1% et ou des vaisseaux de rats, qui reproduiraient des mouvements parasites comme la respiration (notamment utile en reconstruction mammaire pour l'anastomose sur les vaisseaux mammaires internes, mais aussi en pontage a cœur battant) et pourrait permettre des anastomoses dans des positions plus proches des conditions réelles.
- Créer une interface Web reliée au microscope, d'entraînement qui permettrait de ne plus avoir a juger en temps réel les étudiants, et pouvoir remplir de façon confortable, les échelles d'évaluation, et au mieux les automatiser.
- Enfin vérifier la faisabilité d'un tracking des mains et ou des instruments, afin de vérifier si le déplacement en 3 dimensions, des repères utilisés pourraient modéliser la performance de microchirurgiens entrainés, tout en confirmant qu'un novice aurait des mouvements éloignés des séniors et que le fait de s'en rapprocher, le rapprocherait ou non de la réussite de l'anastomose.
- Ce projet est très ambitieux et sa réalisation finale modeste à ce jour mais le sujet intéresse beaucoup les étudiants que nous accueillons au bloc pour la microchirurgie.

La première équipe, étudiants de Master en Robotique, a avancé sur l'ergonomie, le modèle mécanique, du plateau animé, afin de simuler la respiration.

Mais celui-ci s'est révélé trop bruyant et les mouvements trop brusques, mais des réglages récents (juillet 2015) ont montré des résultats sont encourageants.

Le « tracking » des mouvements est balbutiant, mais le système trois dimensions s'est révélé difficile à mettre en place (2 caméras) .Il fonctionne grâce à un système de repérages des couleurs, et des formes. Mais le choix technique de la première éuqipe, de caméras de type industrielles, semble être une limitation. Enfin, l'enregistrement de la performance sur la caméra du microscope d'entrainement sur site web et la grille d'évaluation devrait prendre forme début 2016 et s'est révélé très séduisant en circuit fermé. Une nouvelle équipe a repris la main et se concentrera sur le « tracking » et l'enregistrement video en septembre 2015.

PUBLICATION :

ORIGINAL REPORTS

A New Synthetic Model for Microvascular Anastomosis Training? A Randomized Comparative Study Between Silicone and Polyvinyl Alcohol Gelatin Tubes

Michael Atlan, MD, PhD,[*,†,§,¶] *Alexandre G. Lellouch, MD,*[‡] *Josette Legagneux, MSc,*[§] *Marc Chaouat, MD, PhD,*[¶,#] *Alain-Charles Masquelet, MD, PhD,*[§] *and Didier Letourneur, PhD*[¶]

[*]Faculty of Medicine, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; [†]Plastic Surgery Department, APHP, Hôpital Tenon, Paris, France; [‡]Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; [§]Department of Microsurgery, Faculty of Medicine, School of Surgery of Paris, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; [¶]Inserm; Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale 1148, Laboratory for Vascular Translational Science, University Paris Diderot, University Paris 13, CHU X Bichat, Paris, France; and [#]Plastic Surgery Department, Burn Unit, APHP, Hôpital Saint Louis, Paris, France

INTRODUCTION: Assessment of a resident's microsurgical competency with the rodent model remains the current gold standard. However, cost and ethical issues related to animal welfare may limit training opportunities. Therefore, synthetic alternatives such as silicone tubes have been developed to provide easy access to training, shorten the learning curve, and have been incorporated into microsurgical courses as a low-fidelity model for basic skills acquisition. This study compares the use of polyvinyl alcohol (PVA) gelatin tubes with silicone for resident microsurgical training.

MATERIAL AND METHODS: Residents were randomized into silicone (S) or PVA (P) groups and underwent the same training. Following basic instruction, microsurgical anastomoses were performed with the rat's aorta or carotid artery or both. Performance was assessed using the Objective Structured Assessment of Technical Skills (OSATS) score and 5 different items to assess the quality of the anastomosis. Posttest questionnaires were also conducted for qualitative assessment of both students' and trainers' experience with silicone and PVA in comparison with rat vessels.

RESULTS: OSATS score in Group P was higher than Group S (18.2 ± 2.6 vs 16.6 ± 2.5, $p = 0.015$). Results of anastomoses were similarly better in Group P based on OSATS score (19.3 ± 1.2 vs 17.7 ± 0.7, $p = 0.027$). Subjectively, both students and trainers found that PVA tubes resembled the rat aorta more closely than silicone. The number of rats used was also significantly lower in Group P than Group S (65 vs 75 total, $p = 0.023$).

CONCLUSION: PVA gelatin tubes may be a viable alternative to silicone for microsurgical training because this synthetic model mirrors better rat vessels and can improve training performance based on objective assessment while using less animals overall. (J Surg Ed ▮:▮▮▮-▮▮▮. © 2017 Association of Program Directors in Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.)

KEY WORDS: microsurgery, simulation, silicon, PVA tube, low fidelity model

COMPETENCIES: Practice Based Learning and Improvement, Professionalism, Interpersonal Skills, Simulation

INTRODUCTION

Surgical simulation[1] has an increasing role to play in modern surgical training including microsurgery.[2] Although success rates for free tissue transfers are approximately 95%, if not higher,[3] technical mastery of microsurgery is a prerequisite. Typically, this is achieved through training with increasing complexity, starting from low-fidelity

Correspondence: Inquiries to Michael Atlan, Plastic Surgery Department, APHP, Hôpital Tenon, 4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France; fax: +(156) 016-490; e-mail: drmichaelatlan@gmail.com, michael.atlan@aphp.fr

 © 2017 Association of Program Directors in Surgery. Published by Elsevier Inc. All rights reserved. *1931-7204/$30.00*
http://dx.doi.org/10.1016/j.jsurg.2017.06.008

.

A Robotized Microsurgery Training Device= ROBO MITRAD

EQUIPE 1

I. PRÉSENTATION DU PROJET

II. OBJECTIFS ATTEINTS & COMMENT

1) Plateforme mécanique
2) Interface Utilisateur
3) Plateforme pédagogique en ligne

III. OBJECTIFS NON ATTEINT & POURQUOI

1) Suivi des mains
2) Plateforme pédagogique en ligne

IV. LE FUTUR DU PROJET

I- PRÉSENTATION DU PROJET

Le présent document présente le rapport de rendu du projet industriel commandé par le Dr M. Atlan, MCU-PH à l'UPMC Hopital TENON AP-HP et en collaboration avec Guillaume Morel, Professeur à l'ISIR, Polytech Paris-UPMC.

Le projet consiste en la réalisation d'un prototype de plateforme multimodale d'entraînement à la réalisation de micro anastomoses vasculaires. Il se compose des parties suivantes :

- Plateforme pédagogique physique
  - Simulation d'un environnement d'opération (dynamique et statique)
  - Acquisition de données sur la réalisation d'une opération
  - Traitement des données en temps réel

- Plateforme pédagogique en ligne
  - Mise en ligne des travaux des étudiants
  - Évaluation en ligne par les enseignants
  - Suivi des étudiants

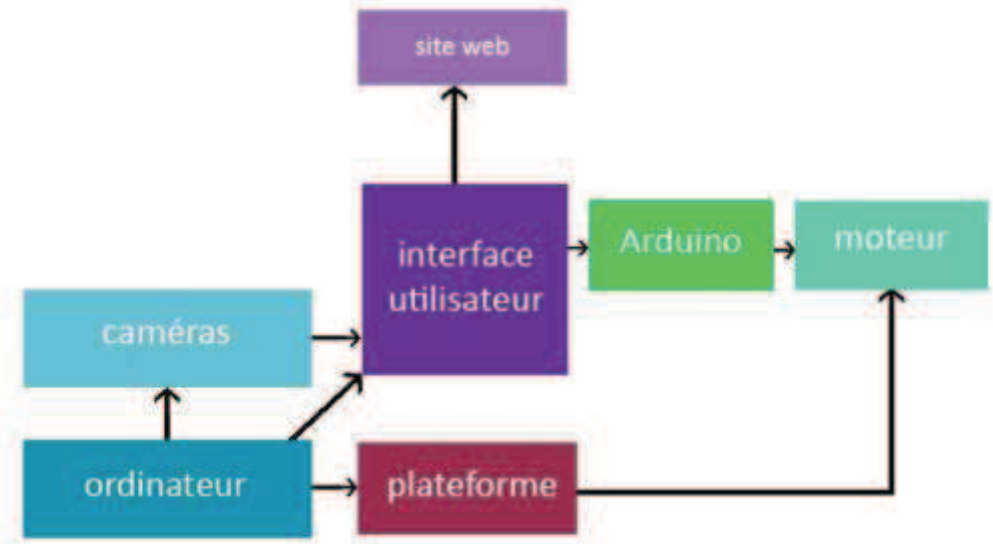
L'objectif à terme est d'utiliser cette plateforme dans un but pédagogique. Il faut donc disposer d'un système robuste dans le sens que son utilisation ne doit pas dépendre des personnes qui l'utilisent (afin de ne pas donner la possibilité aux élèves de régler les paramètres d'évaluation) tout en disposant de suffisamment de libertés pour pouvoir s'adapter. Ainsi, parmi les paramètres variables, nous trouvons :

- Veines utilisées : fournies par le Dr Atlan pour le moment.
- Variété des paramètres physiques des utilisateurs (pour la vision par ordinateur : couleur de peau etc)
- Variété des paramètres de l'environnement (luminosité etc)

Enfin, ce système étant un système à but pédagogique, il faut déterminer les critères d'évaluation. De part la complexité de la tâche, il est impossible de savoir dans l'absolu ce qui fait une bonne opération. Notre approche, proposé par Dr. Atlan est de procéder par apprentissage. Pour cela, nous devons enregistrer un certain nombre de bonnes opérations et de mauvaises afin de calibrer le système d'apprentissage. Ensuite, un logiciel sera capable de discerner les bonnes des mauvaises opérations.

Cependant, il faut des données à comparer. Pour cela, nous avons proposé pour le moment de suivre le mouvement des doigts de l'utilisateur. A ceci pourrons ensuite s'ajouter d'autres capteurs afin de capter différentes données pour ensuite les croiser ou les compléter.

Le schéma suivant résume l'utilisation de la plateforme :



Pour suivre le mouvement des doigts, nous utilisons des caméras haute fréquence de type industriel.

Nous avons donc ici un tour d'horizon du projet tel qu'il nous est apparu au fur et à mesure de l'année. En effet ce projet a eu pour caractéristique d'évoluer au gré des avancées.

Afin de présenter le rendu, nous commencerons par les objectifs qui ont été entièrement atteints et comment ils ont été atteints. Puis, nous passerons aux objectifs qui n'ont pas été atteints ou partiellement et pourquoi ils ne l'ont pas été. Pour finir, nous présenterons nos idées non accomplies et notre vision du projet et de sa faisabilité.

II- OBJECTIFS ATTEINTS & COMMENT

1) **Plateforme**

La plateforme se sépare en deux entités importantes qui sont :

- Un châssis contenant tout les systèmes électroniques, électriques et mécaniques
- Une interface d'utilisation homme-machine

Nous commencerons par expliciter le contenu du châssis afin de rendre plus clair l'exposé de l'interface d'utilisation qui est la partie vraiment importante du sujet. En effet, le châssis n'a pour mission que le support des composants et une simple simulation physiologique mais il constitue la base du système.

Châssis :

Bien qu'une petite partie du châssis ne soit effectivement pas utilisée par l'utilisateur, ce dernier nous a pris beaucoup de temps. En effet sa réalisation étais nécessaire pour la suite et doit donc être réalisée avec soin afin de permettre une utilisation plus simple par la suite. Comme vu dans les documents transmis précédemment, le châssis se compose d'un caisson principal, de deux avancées permettant le positionnement des bras de l'utilisateur ainsi que d'un espace de travail. Le châssis est entièrement fini et se compose de :

- Un bâti
  - Le caisson arrière
  - Les systèmes de simulation physiologique
  - Les reposes mains et avant bras
- Un ordinateur :
  - Processeur : i7-4770 3.4GHz 8MB cache
  - Mémoire vive : 8Go DDR3
  - Mémoire morte : 256Go SSD 4To
  - Alimentation : 300W

- Un moteur et son système de contrôle
    - Un moteur Maxxon Motors(REF TS10094) 1.6Nm
    - Une carte Arduino et son module Shield
- Deux caméras CMOS qualité industrielle
    - The Imaging Source(REF DFK 23UV024)

Commençons par les caractéristiques de l'ordinateur et des caméras.

L'ordinateur a été choisi de manière à pouvoir traiter des informations rapidement et surtout pouvoir faire plusieurs tâches en même temps, ce qui est primordial si l'on veut pouvoir détecter des informations fines tels que les tremblements de l'utilisateur. Il a également une grande capacité de stockage puisque nous allons y stocker les vidéos des séances d'entraînement. Enfin, il est relativement petit et peu bruyant. Nous l'avons équipé d'un écran tactile afin de rendre son utilisation pendant une session facile.

Il est équipé d'un panneau de façade permettant de connecter des périphériques de stockage externes.

Les caméras ont été choisies dans la même optique de rapidité, à savoir une acquisition à 100 images par secondes. Ces caméras de haute qualité permettent une analyse très fine des données. L'association de l'ordinateur avec ces caméras sera donc parfaite pour cette application. Nous les avons installé en façade, afin de pouvoir les orienter sur les mains sans problèmes. Ceci permet donc d'avoir un champ de vision très serré sur les mains. Ceci limite donc l'apparition d'arrière plan qui augmente l'instabilité du suivi des mains. De plus, l'utilisateur étant face aux caméras, ces dernières ont le bon angle sur le dos des mains lorsque l'utilisateur travaille.

Nous allons maintenant traiter du sujet des simulations physiologiques.

L'alimentation de l'ordinateur est la seule entrée électrique de la plateforme. Dans un objectif de simplification nous avons préféré prendre une alimentation puissante et la modifier afin d'alimenter les autres systèmes électriques plutôt que de multiplier les entrées électriques.

Puisque nous simulons des mouvements physiologiques humains, cette vitesse n'a pas besoin d'être élevée. Par un système de levier, la vitesse du moteur est ensuite transformée en mouvement de translation qui imite la respiration (mouvement physiologique dynamique). Les explications sont sur la page suivante.

Le moteur est contrôlé par une carte arduino et un motor-shield pour l'alimenter. La carte arduino reçoit une commande sur son port série et via le shield fait tourner le moteur. L'algorithme de contrôle est donc très simple puisqu'il n'y a pas de bouclage :

Initialisation

Tant que vrai

Tant que rien reçu sur le port COM consommer le

buffer d'entrée

Fin tant que

Lire la nouvelle valeur

Tant que rien reçu sur le port COM consommer le

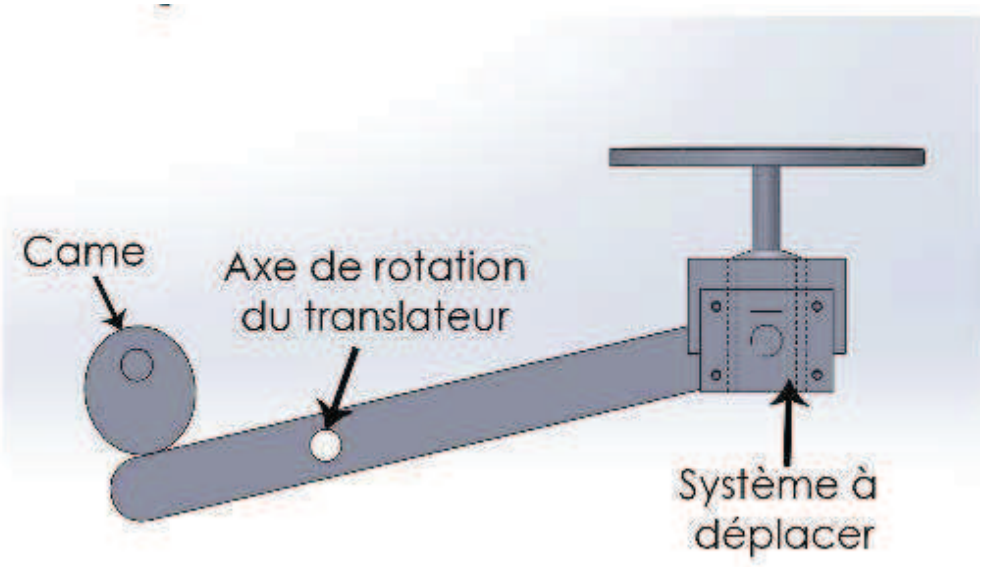
buffer d'entrée

Fin tant que

Renvoyer la valeur lue sur le port COM Envoyer

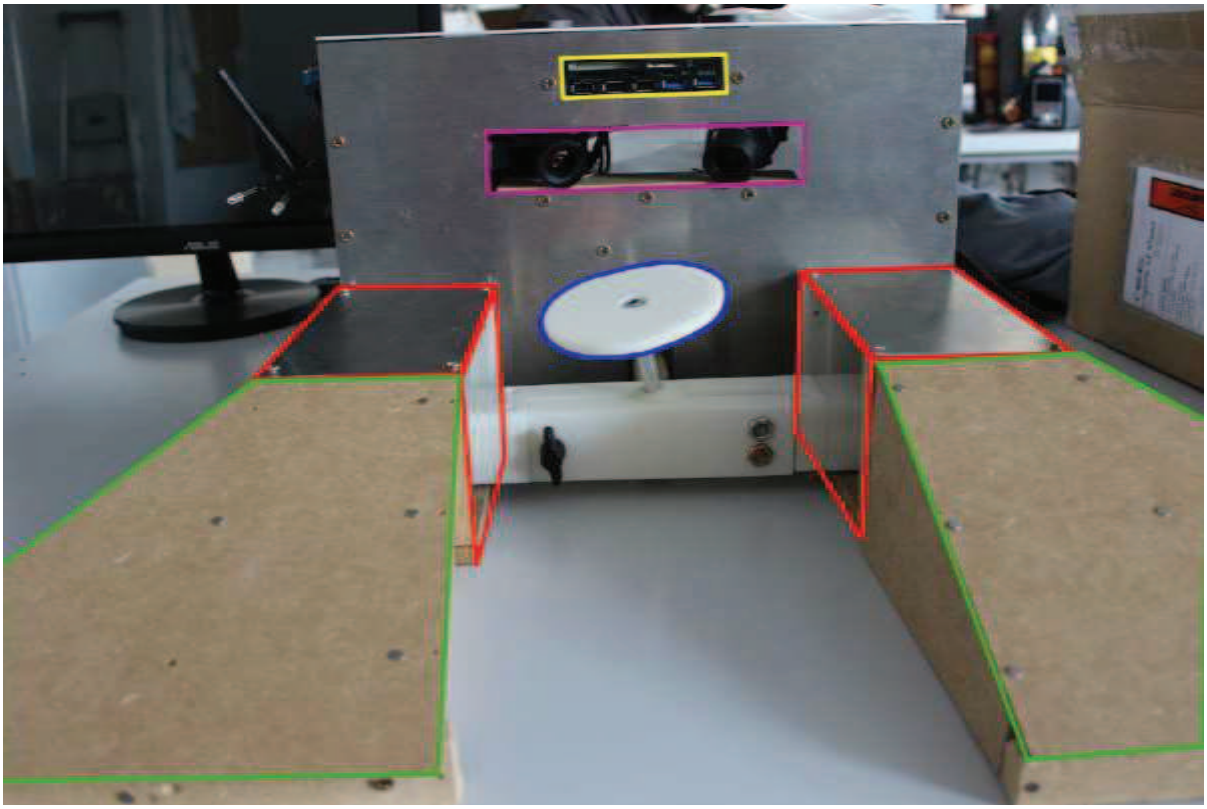
la commande

Fin tant que



Expérimentalement, il faut une vitesse importante pour lancer le système et pour le maintenir (bien que la vitesse minimum de démarrage soit supérieure à la vitesse minimum de maintient). Pour permettre un bon fonctionnement, la fixation entre le système à déplacer et le translateur est un trou oblong. En effet, le système à déplacer ne peut se déplacer qu'en translation verticale.

Le caisson arrière sert de maintient pour les systèmes électroniques et électrique et le bâti (base de référence fixe) aux systèmes de simulation. Il mesure 40cm de largeur, 25cm de hauteur et 25cm de profondeur, ce qui correspond aux caractéristiques de son environnement en laboratoire. Le châssis est en aluminium pour les parties nécessitant de la précision et en bois pour les parties internes. En effet, cette dualité présente un avantage : cela permet l'ajout de nouveaux composants tels que des capteurs assez facilement tout en conservant un bâti solide.



On peut voir sur cette vue l'ensemble des avancées :

- Repose mains (en rouge)
- Repose avant bras (en vert) On

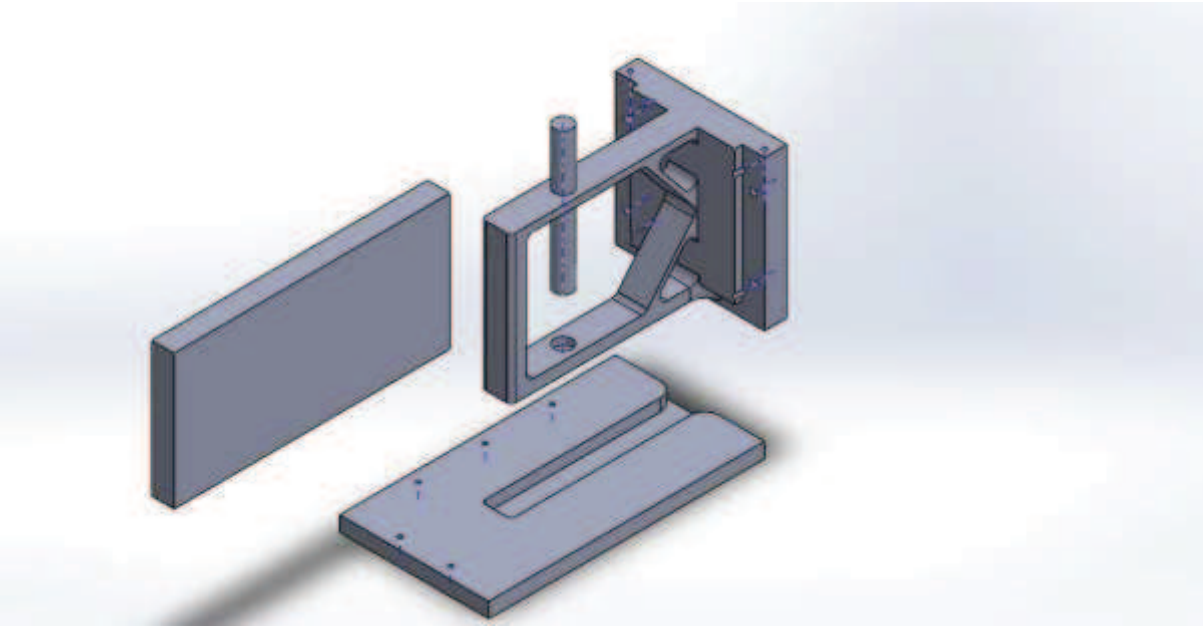
voit également :

- Le plateau d'opération (en bleu)
- La baie USB (en jaune)
- La baie des caméras (en mauve)

Le translateur est opérationnel ainsi que la rotule de positionnement. Ce dernier ensemble représentant la partie de simulation physiologique statique de la plateforme.

Cette partie a été faite dans un délai très bref. Partant d'abord sur une base réalisée entièrement en prototypage rapide , nous nous sommes heurtés à un coût trop élevé .

Aussi, nous avons refait des plans pour imprimer le moins possible d'éléments, en utilisant notamment du bois. Ainsi, les supports de mains, détaillés dans une précédente version, qui consiste en une boite de 10x10x20cm (h x L x l) traversée par une tige servant de guidage pour le support de la rotule, ont été imprimées en prototypage rapide pour les parties de précision : fixation au châssis et maintien de la tige et le reste en bois.



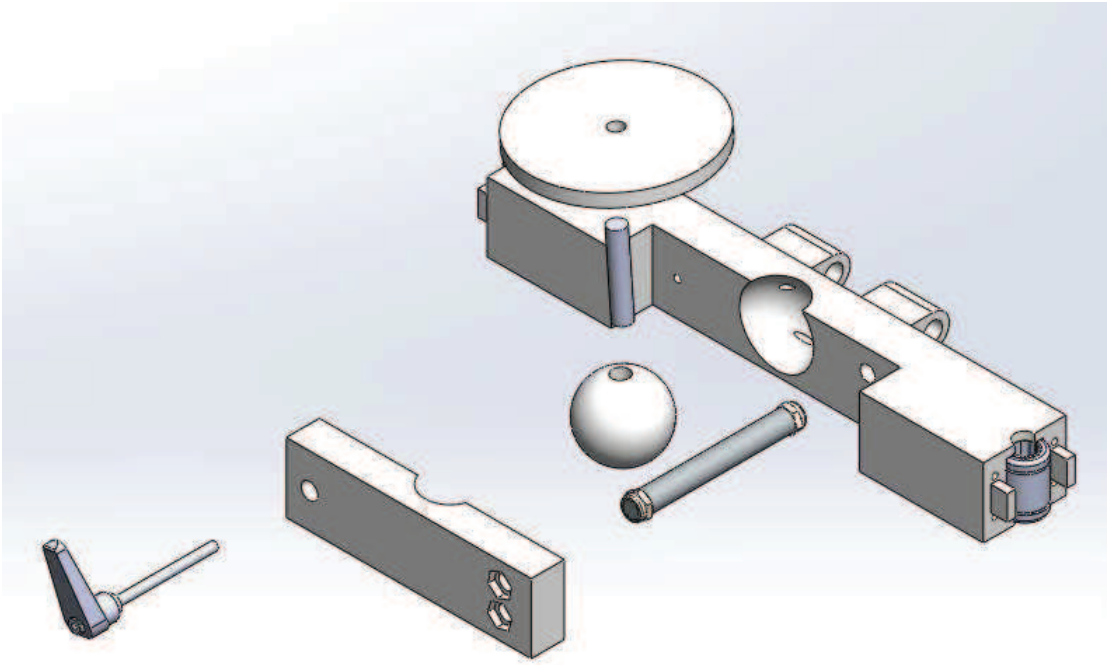
La rotule de positionnement est également finie. Il s'agit donc d'une sphère emprisonnée dans un étau. Comme prévu, les frottements entre les trois parties (deux pour former un étau et une pour la sphère) sont suffisant pour effectuer un blocage complet.

Dans la sphère, nous avons introduit une tige en métal creuse. En taraudant l'autre extrémité, nous avons pu visser le plateau par dessus. Il reste cependant un point d'intérêt ici. En effet, le support de la rotule à été entièrement prototypé par impression. Ainsi, nous avons du le séparer en 5 fragments pour que cela tienne dans la machine. Aussi, pour fixer les pièces entre elles, nous avons opté pour une fixation par chevilles vissées dans les parties prototypées. Lors de la première installation le système n'était pas fonctionnel, c'est à dire que la translation ne pouvait pas être effectuée.

Cependant, après quelques modifications : perçage, limage, nous avons obtenu une structure suffisamment rigide pour pouvoir translater sans problème.

De plus, nous avons modifié le plan d'origine pour placer la liaison entre le translateur et le support de la rotule derrière la rotule et non à coté comme c'était le cas originellement. Ceci permet de ne pas avoir d'efforts asymétriques sur un système déjà sur-contraint. En effet, l'utilisation de deux glissières est redondante puisque une glissière et une liaisons annulaire, c'est à dire de longueur inférieur aux ¾ du diamètre de la tige aurait suffit. Enfin, nous avons ajouté deux ressorts en bout de course pour éviter trop de chocs.

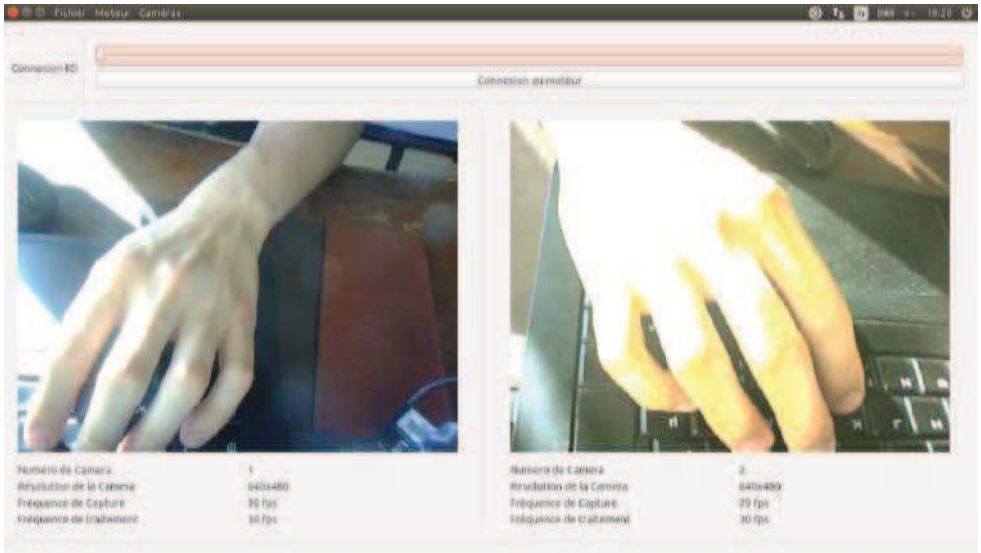
Nos tests révèlent que la simulation physiologique fonctionne conformément au cahier des charges autant pour la partie dynamique que statique (le système de positionnement).



2) **Interface Utilisateur**

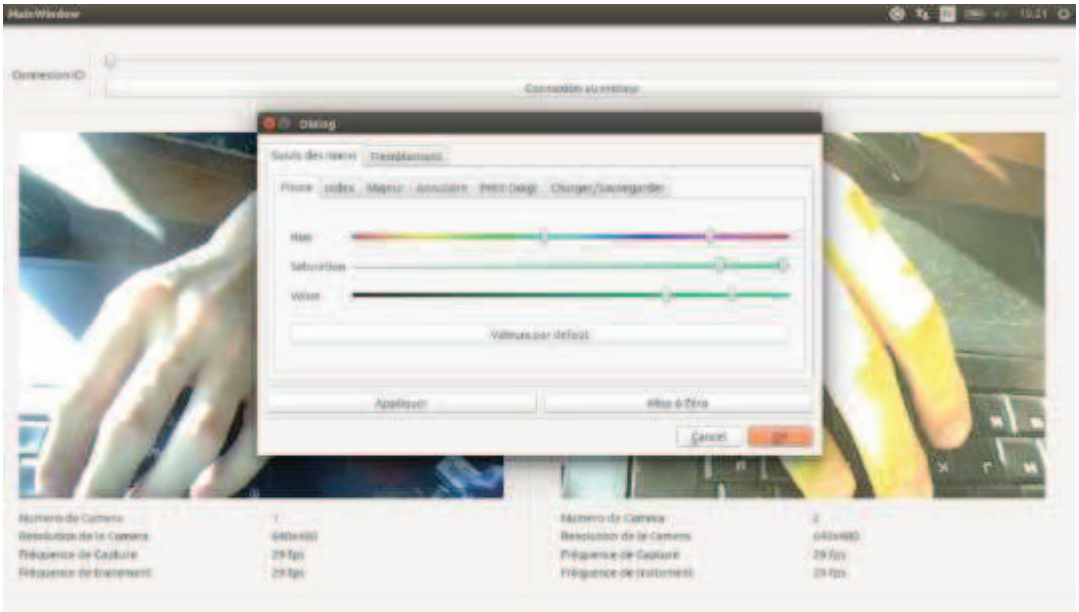
L'interface utilisateur est un point très important du projet. En effet, c'est elle qui permet de commander le châssis et surtout elle centralise les données reçues et les traite.

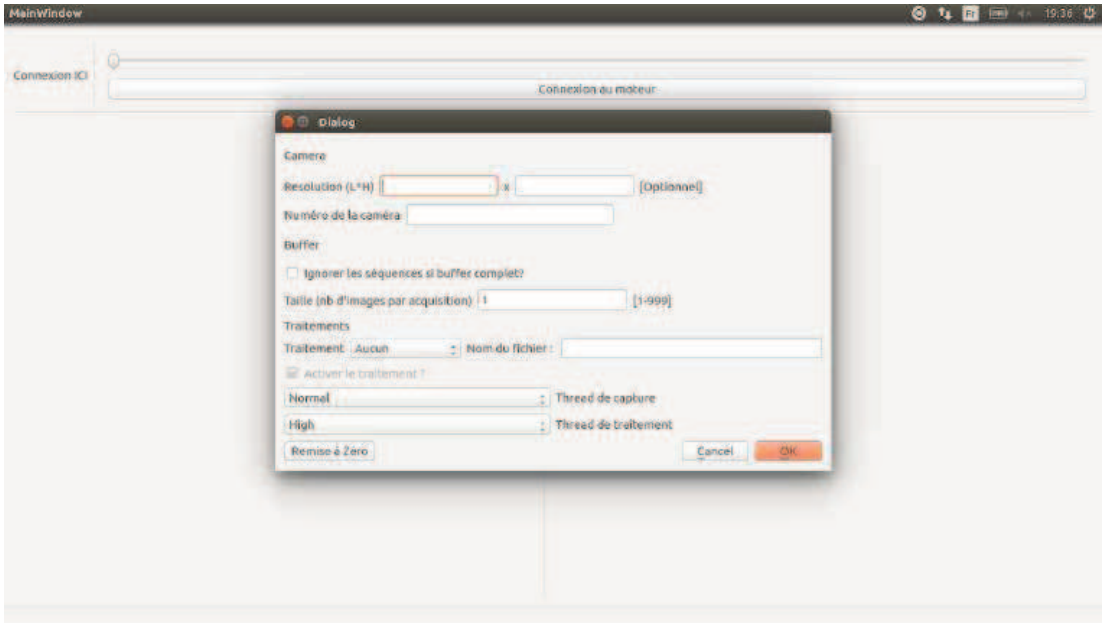
Sur la capture d'écran suivante, on peut voir à quoi ressemble l'interface :



On voit en haut un bandeau. Dans ce dernier, on peut régler la vitesse de rotation du moteur. Dans la partie basse, on peut voir les vidéos prises par les caméras qui regardent les mains. Comme vous pouvez le voir sur la figure suivante, on peut choisir au lancement de chaque caméra quel traitement on veut sortir sur la caméra (pour le moment seul un début de programmation du suivis des mains).

Sur la figure suivante, on peut voir l'interface qui permet de choisir les couleurs que l'on veut suivre. En effet, bien que des réglages par défaut soient disponible, si la luminosité change trop, il peut être souhaitable de pouvoir changer les couleurs. De même si l'on souhaite changer la couleur des gommettes, c'est possible dans cette interface :





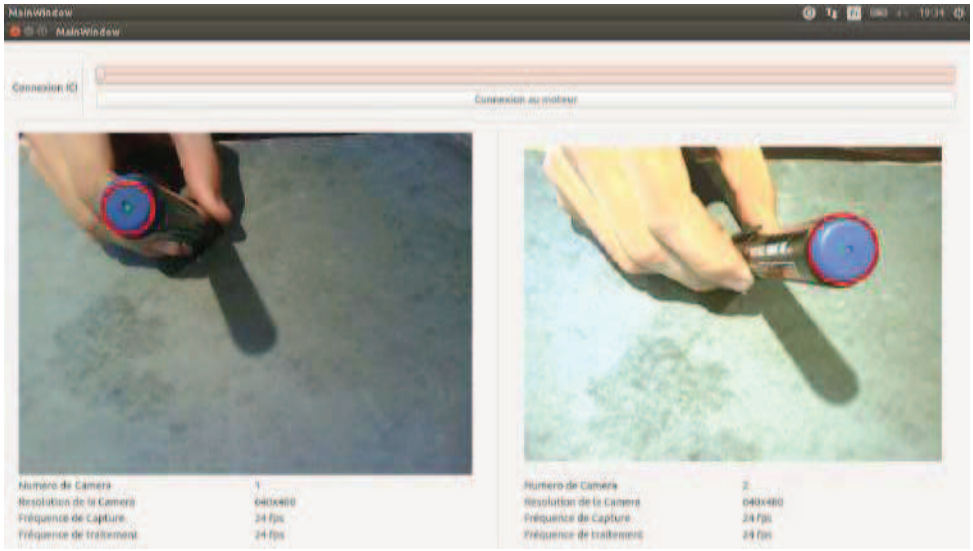
Sous Qt, il est simple d'implémenter une fenêtre d'option comme celle ci puisque le Qt Designer simplifie le travail. Il ne reste plus qu'à appliquer des comportements aux éléments, en connectant les signaux émis par chacun d'eux.

Cependant, le double curseur n'existe pas.
Nous avons donc créé une classe QSuperSlider qui hérite du QSlider afin de rajouter le second curseur. Enfin, pour donner la couleur de fond, nous avons édité notre propre thème QSS (similaire au CSS des langages Web). La couleur de fond de la Saturation et de la valeur changent en fonction de la couleur moyenne sélectionnée dans Hue ce qui augmente l'intuitivité de la fenètre.

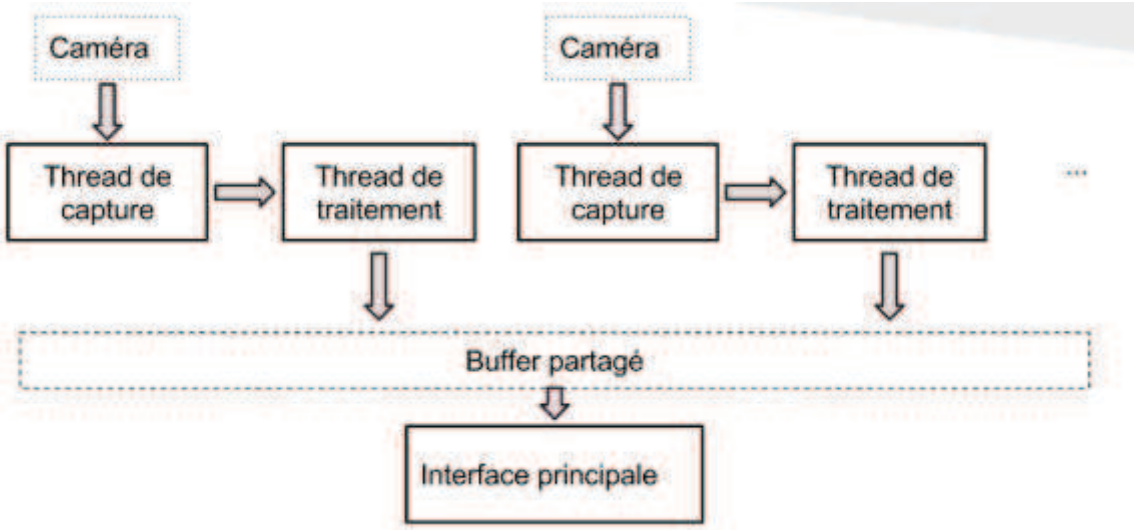
Cette partie est avancée, pour preuve sur la figure suivante où l'on peut voir un cercle rouge qui suit un rond bleu. Pour mettre en oeuvre ce système, nous avons binarisé les images en ne gardant que les couleurs sélectionnées. Ensuite, nous détectons les cercles avec une transformée de Hough.

Pour faire ceci, nous parcourons l'image et testons pour chaque pixel s'il appartient à un intervalle. Si oui, nous mettons ce pixel à la valeur logique vraie dans l'image binarisée. Sinon à 0. Ensuite, pour chaque image binarisée, une par doigts, on applique la fonction Opencv préprogrammée HoughCircle qui va détecter les cercles présents dans l'image.

Pour rappel, la transformée de Hough teste chaque pixel et indique sur l'espace des cercles possible tous les cercles qui peuvent passer par ce pixel. Une fois toute l'image parcourue, certains points de l'espace des cercles possibles auront un grand poids. Ces points correspondent donc aux cercles qui sont dans l'image.


MainWindow
MainWindow
Connexion IC
Connexion au moteur
Numero de Camera
1
Resolution de la Camera
640x480
Fréquence de Capture
24 fps
Fréquence de traitement
24 fps
Numero de Camera
2
Resolution de la Camera
640x480
Fréquence de Capture
24 fps
Fréquence de traitement
24 fps

L'idée générale derrière l'interface est la suivante :



A chaque ajout de caméra, un thread de capture et un thread de traitement sont créés. Ceci permet donc de pouvoir acquérir une image en traitant la précédente, ce qui réduit le frame per second. Chaque image est ensuite transférée dans le buffer partagé. De là, l'image peut être lu par l'interface pour être affichée ou bien traitée par un autre thread.

Ceci permet donc de traiter deux images simultanément. Grâce à cette technique, on peut donc recontruire en 3D le mouvements de points vues par les deux caméras en temps réel au lieu de le faire en post traitement.

Tout ceci a été rendu possible par l'utilisation de Qt. En effet, la gestion des thread est beaucoup plus simple avec ce framework. L'écriture et la lecture est protégée par des QMutex ce qui évite les problèmes d'accès. Lorsque la synchronisation des flux est activée (dans l'onglet en haut), les thread peuvent accéder aux images qui ne sont pas les leurs dans le buffer partagé.

Manuel d'utilisation de l'interface :

Démarrez l'interface.

Pour commander le moteur :

Cliquez sur l'onglet *moteur* en haut, sélectionnez le port série sur lequel il est branché, sélectionnez la *vitesse de communication* (en BAUDS). Ensuite, sur la fenêtre principale, cliquez sur *connexion au moteur* puis sélectionnez la vitesse voulue avec la scrollbar.

Pour lancer les caméras :

Cliquez sur l'onglet *caméra*, sélectionnez *connecter la caméra droite* (resp. gauche). Dans la fenêtre qui s'ouvre, rentrez les détails que vous souhaitez, notamment, la caméra à ouvrir et le traitement à faire puis validez. Vous pouvez par la suite déconnecter une caméra, ou bien ouvrir celle de gauche (resp. droite). Vous pouvez également synchroniser les flux.

Pour changer les options des traitements sur les images :

Cliquez sur Paramètre des traitements sur la caméra x, sélectionnez le traitement dont vous souhaitez changer les options.

Pour le suivi des mains, vous pouvez sélectionner pour chaque doigt la couleur à suivre. Les couleurs sont indiquées en système HSV. H correspond à la teinte, le système est très intuitif puisque vous pouvez sélectionner la couleur directement en regardant la couleur qui est sous les curseurs. Les valeurs S et V servent principalement à sélectionner les plages de tolérance sur la couleur afin de s'adapter aux variations de luminosité par exemple. Enfin, dans l'onglet supplémentaire, on peut charger ou sauvegarder des profils d'options pour faciliter l'utilisation.

3) **Plateforme Pédagogique en Ligne**

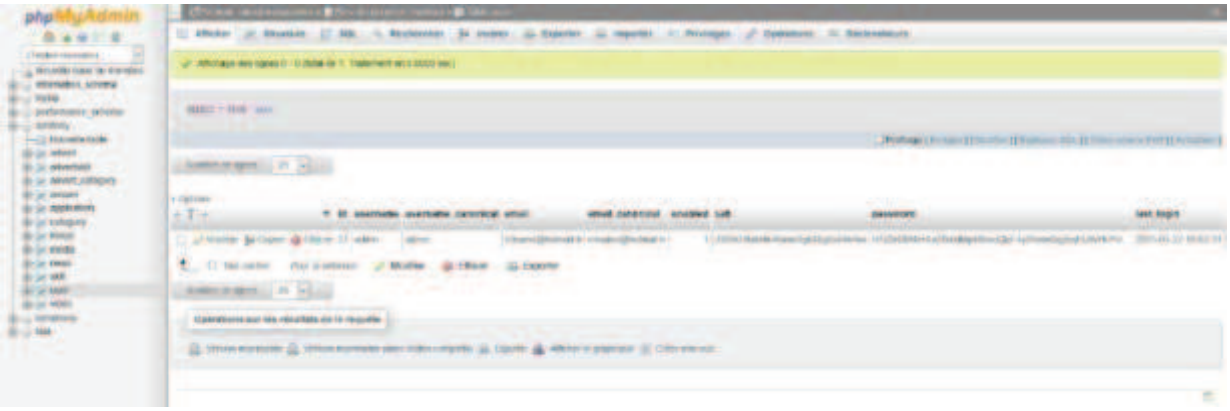
Concernant la plateforme en ligne que nous devions réaliser, nous avons pu mettre en place en local quelques unes des fonctionnalités demandées telles que la gestion de sessions utilisateur, un questionnaire d'évaluation et la mise en ligne de vidéos. Comme

prévu nous avons utilisé le framework php Symfony2 ainsi que différents outils, mis à disposition par la communauté d'utilisateurs du framework, et des bases de données nécessaires.

Base de données

Notre base de données a étés gérée et suivie en utilisant PhPMyAdmin. Nous avons utilisé trois tables pour les fonctionnalités implémentées :

- User : contient la liste des utilisateurs inscris sur la site. Chaque utilisateur possède un rôle qui lui permet d'être identifié en tant qu'élève ou professeur.
- Video : contient la liste des vidéos mises en ligne.
- Answer : contient les réponses des professeurs au questionnaire d'évaluation

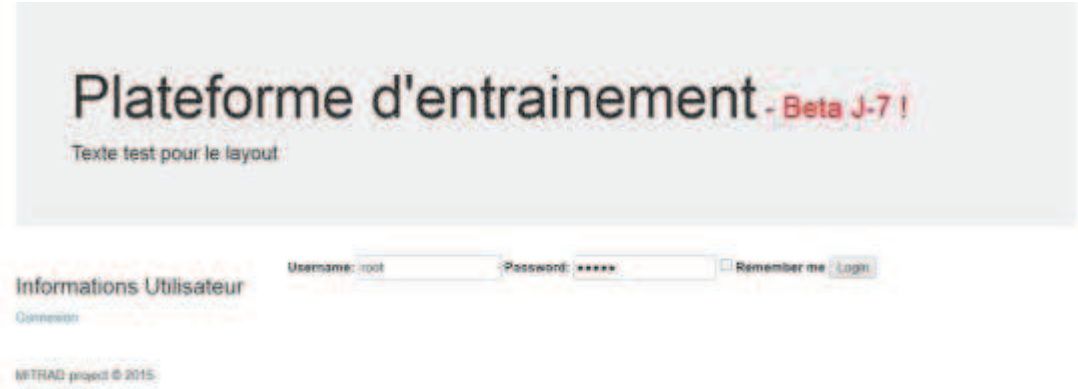


Structure de Symfony2

Symfony2 permet l'utilisation de bundles, ce sont des "fonctions" à implémenter et à configurer, mises à disposition par des utilisateurs. Dans notre cas nous avons principalement utilisés les bundles Doctrine et FOS_user :

- Doctrine est le bundle le plus important que nous avons utilisé en association avec Symfony2. Celui-ci nous permet de gérer nos bases de données de manière simple sans passer directement par le langage SQL pour envoyer des requêtes. De plus Doctrine nous a aussi fournis les éléments nécessaires pour réaliser la mise en ligne de fichier et notamment de vidéos. Nous avons testé cette fonctionnalité avec des fichiers ayant une taille allant jusqu'à 2 Go pour pouvoir assurer que les vidéos d'entraînement des étudiants qui durent environ une heure puissent être mises en lignes.

- FOSUserBundle est le bundle qui nous a permis de gérer les sessions d'utilisateurs, les droits d'accès aux différentes sections du site ainsi que les inscriptions des nouveaux élèves. Il était important que selon la personne connectée celles-ci ai accès seulement aux fonctionnalités qui l'intéresse et auxquelles elle a droit comme celle d'évaluer un étudiant pour un professeur ou de voir ses résultats pour un étudiant.



Ce questionnaire est à la base de la standardisation voulue pour l'évaluation des étudiants en chirurgie. Le questionnaire que nous proposons ci-dessous a été réalisé à partir des différents exemples de notation de performances que nous avait fourni notre client :

Préparation de l'espace de travail
- Placement du clamp
- Mise en place des éléments de fond

Réalisation de la suture
- Placement de l'aiguille
- Récupération de l'aiguille
- Qualité du nœud
- Stabilité de l'anastomose après le nœud
- Dextérité
- Manipulation du tissu

Évaluation du résultat final
- Apparence générale
- Espacement des sutures
- Fin des sutures en dehors de la lumière
- Perméabilité

Performance globale

Les élèves ont donc accès sur leur page aux derniers résultats de questionnaire qu'ils ont soumis aux professeurs.

Plateforme d'entrainement - Beta J-7 !
Texte test pour le layout
Espace professeurs
Espace etudiants
Espace administrateur
Informations Utilisateur
Résulats de la dernière évaluation
Préparation de l'espace de travail
Réalisation de la suture
Evaluation du résultat final
Performance globale : 1

Hôpitaux Universitaires Est Parisien
TENON
Menu
Mon Compte
Mes operations
Formulaire
1/ Itaque verae amicitiae difficillime reperiuntur in iis qui in honoribus reque publica versantur; ubi enim
ASSISTANCE PUBLIQUE
HÔPITAUX DE PARIS
Hôpital Tenon
4 Rue de la Chine, 75020 Paris
01 56 01 70 00
Département de microchirugie

III- OBJECTIFS NON ATTEINT & POURQUOI

1) Suivi des mains

Sur le point de vue Logiciel, nous n'avons pas pu à arriver à une détection suffisante. Tout d'abord, le calcul sur de nombreux points à détecter (ici, 5 par mains) est lourd, il fait perdre donc de la vitesse au programme. Or cette vitesse est implicitement liée à la fréquence d'images traitées. Moins nous avons de vitesse, moins nous pouvons interpréter les mouvements rapides et saccadés. De plus, nous avons eu de nombreux problèmes avec le format vidéo de la caméra. En effet celle-ci étant industrielle elle retournait une image au format BAYER_GBRG.

La matrice de définition du format

Dans cette définition chaque pixel dans le domaine RGB est définit par une interpolation d'un pixel et de ses voisins proches dans le domaine GBRG. Cela crée donc un seuil d'erreur. Le format n'étant pas supporté par openCV, nous nous sommes d'abord tourné vers le constructeur afin de pouvoir avoir leur solutions techniques adaptées à notre système mais aussi à leur caméra. Néanmoins, ces solutions n'ont pas aidé et nous avons donc du nous pencher sur le problème d'un convertisseur au format RGB grâce à v4L écrit manuellement.

V4L est une bibliothèque incluse dans opencv qui permet de gérer images et vidéos de manière plus poussée.

La gestion des couleurs étant différente sur les caméras, les couleurs des images que nous traitons sont très uniformes. Nous avons tenté de corriger ce problème à maintes reprises. Tout d'abord en modifiant le gain de l'image, ce qui nous rajoute des zones couleurs bien plus distinctes. Mais de même que pour le réglage d'exposition, ces modifications perturbent trop les couleurs, en donnant une saturation soit trop faible, soit trop élevée.

Même si nous avons réussi à régler ces différents réglages en y ajoutant un traitement de couleur par la suite, nous pouvons détecter des couleurs vives mais le reste des couleurs n'est pas naturel. Ainsi les nuances entre les différents rouges, verts sont faibles ce qui nous rajoute beaucoup d'erreurs potentielles lors de la détection.

Concernant la partie gestion du moteur dans le logiciel, nous n'avons pas eu le temps de gérer le problème d'inertie mécanique sur le moteur. En effet, pour de faibles valeurs (en dessous de 20% de l'intervalle de sélection) le moteur a trop peu de puissance de démarrer et force sur le système, abîmant du même fait les composants internes du moto-réducteur.

Chronologie test caméra

- Réception caméra
- Test connection caméra
- Fonctionnement normal avec le logiciel gucview / opencv défectueux
- Implémentation des différentes librairies du constructeur / opencv défectueux
- Script de conversion avec V4L / open cv bon
- Traitement d'exposition / gain / contraste / couleurs / même résultat

2) **Plateforme pédagogique en ligne**

Parmi les fonctionnalités qu'il reste à implémenter il y a notamment le lecteur vidéo sur la page du questionnaire d'évaluation ainsi que la gestion de l'étudiant à évaluer avec une liste de ceux-ci triés par ordre de mise en ligne des vidéos. Ce qui a freiné notre avancée sur ces points a été la prise en main difficile de Symfony2.

En effet, n'ayant jamais codé en langage PhP et utilisé un framework, nous avons du partir de zéro pour cet apprentissage. Une fois ces outils pris en main, il a fallu tester les différents bundles que nous souhaitions utiliser et les implémenter. Chaque implémentation d'un nouveau bundle amenant son lot de bugs, il a fallu pas mal de temps pour obtenir le résultat que nous avons mais cela signifie aussi que l'ajout des autres fonctionnalités manquantes n'est qu'une question de manque de temps.

Comme évoqué précédemment le site ne fonctionne pour l'instant qu'en local. Il n'était pas assez avancé pour qu'on puisse louer un serveur dédié et mettre le site véritablement en ligne.

IV- LE FUTUR DU PROJET

Concernant le suivi des mains, le logiciel devra être légèrement modifié afin de pouvoir reconstruire des coordonnées 3D grâce aux deux caméras. Cette partie est réellement cruciale puisqu'elle nous permet d'étudier les tremblements de manière réelle. De plus afin de pouvoir les étudier de manière claire il est important de pouvoir les réaliser après l'opération. De ce fait nous perdons moins de puissance de calcul et le temps devient moins une contrainte.

Pour la gestion des couleurs de la caméra, un calibrage en balance de blanc serait idéal. Pour cela nous avions pensé à une différence entre une image de référence, et l'image donnée par la caméra. Ensuite, calibrer la caméra automatiquement de tel sorte à ce que la différence devienne nulle.

Pour finir cette partie logiciel, l'obtention de la caméra auprès du constructeur zeiss est d'une importance capitale. Celle-ci permettra de donner un rendu clair de l'opération.

Concernant la partie commande moteur, le logiciel devrait pouvoir gérer automatiquement la puissance nécessaire pour démarrer le moteur. Cela permettrait d'allonger la durée de vie du moteur ainsi que du système, et de permettre un contrôle de la plate-forme plus simple et intuitif. Cependant, il faudrait avoir un capteur afin de boucler le système et de pouvoir le commander. L'amélioration des performances de la plateforme pourrait aussi passer par un meilleur dimensionnement du moteur ou l'ajout d'un variateur de vitesse.

PROJET Robo-Mitrad:

A Robotized Microsurgery Training Device

BILAN JUILLET 2015

Porteurs de projets (binôme scientifique/clinique)

,

Nom	*Téléphone*	*Adresse électronique*	*Grade*	*Etablissement ou organisme d'appartenance*	*Nom et adresse du laboratoire ou du service*
Guillaume Morel	*0664167377*		*Professeur*	*UPMC*	*ISIR Campus Jussieu*
Michael Altan	*0763927000*	*drmichaelatlan@gmail.com*	*MCUPH chef de l'unité de chirurgie plastique du CHU TENON aphp.*	*UPMC*	*Chirurgie plastique et réparatrice Tenon*

Axes de recherche concernés :

Conception et réalisation de dispositifs biomédicaux :

Dispositifs d'assistance aux gestes en médecine ; robotique chirurgicale

Rappel de la problématique

La microchirurgie vasculaire est une discipline exigeante qui nécessite de l'expérience. Former un opérateur fiable est un investissement long en temps et exigeant en efforts.

En chirurgie, l'enseignement clinique se fait traditionnellement sous la forme d'un compagnonnage au bloc opératoire, où un chirurgien « senior » montre et explique les gestes à un chirurgien« junior » qui les reproduit ensuite sous son contrôle. Cet enseignement est complété de façon ponctuelle par des entraînements sur sujets anatomiques et sur animaux.

L'enseignement de la microchirurgie ne peut pas être effectué de cette façon. En effet, les anastomoses microchirurgicales ne tolèrent aucune erreur technique sans compromettre le résultat, et seul un chirurgien déjà formé et fiable peut les effectuer lors d'une intervention chirurgicale. Ainsi il arrive que le microchirurgien junior effectue ses premières anastomoses chez l'homme une fois en position de responsabilité avec une courbe d'apprentissage qu'il faut accepter et des échecs pas toujours tolérables de nos jours.

La microchirurgie est actuellement enseignée en France sous la forme de Diplômes Universitaires, au cours desquels les étudiants s'entraînent d'abord sur des modèles inertes, selon les directives du ministère de l'enseignement et de la recherche (compresses ou des tubes de silicone, patte de poulet, vers) qui permettent l'acquisition de la gestuelle de base : Nœuds, préhension des instruments, utilisation du microscope.

Ces modèles ne reflètent pas le comportement biomécanique des vaisseaux. Ils ne permettent pas non plus de tester la perméabilité d'une anastomose. Une fois acquise la gestuelle de base, les élèves peuvent enfin l'appliquer *in vivo* sur des rats wistar selon une difficulté croissante : anastomose termino-terminale, latéro-temrinale aorte, jugulaire, carotide, pontage, lambeau libre, greffe rénale…

Cet enseignement se heurte à trois limites :

- La législation en vigueur sur l'expérimentation animale interdit l'entraînement en dehors de la supervision d'un enseignant habilité, et le nombre d'heures d'entraînement est de ce fait limité
- L'accès aux animaux a un coût non négligeable.
- L'évaluation de la qualité de l'anastomose faite par l'enseignant,en direct, en fin de séance ne porte que sur la « résiduelle » du geste (perméabilité ou non de l'anastomose réalisée, localisation et répartition des points) et non sur la qualité du geste en lui-même. De plus, elle n'est pas quantitative ce qui rend difficile pour l'étudiant, l'auto-évaluation des progrès. La seule évaluation de la qualité du geste se fait une fois dans l'année lorsque l'enseignant suit la totalité du geste de l'étudiant dans la deuxième paire d'oculaires du microscope et produit une analyse critique au fur et à mesure de la procédure. Ces séances sont de celles qui font le plus progresser l'étudiant, mais ne peuvent malheureusement pas être renouvelées plus souvent faute d'enseignants en nombre suffisant. Enfin cet aspect limite la comparaison des formations entre les différents diplômes universitaires.

Rappel des objectifs

L'objectif de ce projet était de développer un dispositif exploitant des technologies robotiques pour permettre l'entraînement à l'anastomose microchirurgicale.

Un tel dispositif permettrait de compléter l'apprentissage traditionnel, d'une part en permettant un accès illimité à l'entraînement (hors de séances encadrées) et d'autre part en permettant une évaluation quantifiée du geste et du résultat (localisation, repérage, et répartition des points sur l'anastomose, tension des nœuds, trajets des aiguilles et angles d'incidence).

Ce système permettrait également de perturber les conditions de réalisation du geste en introduisant des mouvements simulant les perturbations respiratoires (comme en reconstruction mammaire), et en obligeant à réaliser l'anastomose avec en contraignant le placement de mains.

Il pourrait ainsi servir à l'acquisition de compétences pour le débutant et au perfectionnement pour le professionnel notamment lors des situations reproduisant les conditions cliniques difficiles (nombre de points optimaux pour les petits vaisseaux de moins de 1 mm, incongruence de diamètre importante) ou en confirmant la bonne perméabilité des anastomoses par exemple.

L'objectif secondaire est l'enregistrement et le monitoring des mouvements de l'étudiant qui permettra d'évaluer objectivement ses performances et ses progrès.

Travaux entrepris et résultats obtenus

Comme proposé dans le projet, une étude, a d'abord été confiée à un groupe d'élèves ingénieurs de Polytech Paris-UPMC (spécialité robotique, niveau M1) en collaboration avec une chirurgien et son équipe. Cette étude a concerné la conception et réalisation d'un système robotisé d'entraînement à l'anastomose en microchirurgie, capable de :

- **Mesurer de façon automatique la qualité du geste :** évaluation des trajectoires d'aiguilles, de l'angle d'incidence de l'aiguille par rapport au vaisseau lors de l'insertion, etc.
- **Analyser le résultat final** : quantification de la répartition des points sur l'anastomose, de la tension des nœuds. Un score normalisé devra être défini et calculé

automatiquement afin que l'étudiant puisse

- **Perturber le geste** : simuler un mouvement respiratoire d'amplitude et de fréquence contrôlable, présenter l'anastomose avec divers angles représentatifs de situations cliniques complexes, etc.

Le dispositif réalisé permet d'enregistrer les paramètres de la réalisation du geste en exploitant un plateau mobile (pour simuler la respiration) et orientable (pour reproduire diverses configurations cliniques) intégré sous un microscope et des capteurs externes (paire de caméras).

Les images fournies par les caméras peuvent analyser les images en temps-réel. Il a été choisi de placer des gommettes de couleurs sur les mains et/ou sur les instruments de chirurgie afin de pouvoir les localiser dans chacune des deux images et ainsi reconstruire les trajectoires 3D. La Figure 1 illustre le système de traitement d'image mis en place. Une interface permet de sélectionner les couleurs de points trackés.

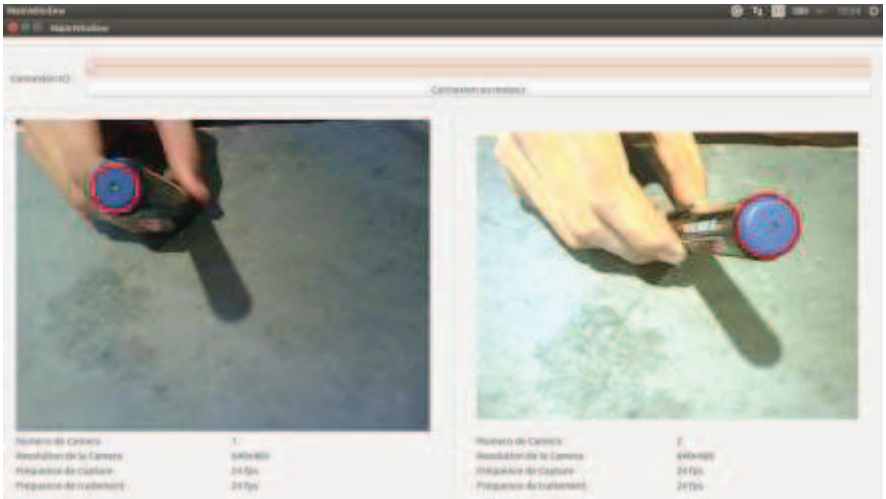


FIGURE 1 : Interface montrant le tracking en temps réel d'une cible circulaire bleue sur une paire stéréosopique.

Les données enregistrées (trajectoires des points, images du geste) sont ensuite enregistrées. Les outils pour l'exploitation de ces données restent à finaliser. Il est prévu un site Web accessible à un enseignant

qui pourra visualiser: les vidéos de réalisation du geste, les trajectoires des instruments et des mains

- . Des scores associés à ces trajectoires (régularité des mouvements, etc.)

Une feuille de notation a été conçue en collaboration avec l'équipe chirurgicale qui permettra un retour à l'étudiant.

Côté mécatronique, une plateforme permettant l'installation d'une maquette de micro- anastomose a été conçue. Elle permet :

- Une orientation du plateau perpendiculairement à un axe pouvant prendre une orientation quelconque jusqu'à 45° avec la verticale ascendante.
- Une oscillation verticale jusqu'à 10mm de fréquence contrôlable, destinée à reprduire les perturbations induites par les mouvements resiparatoire.

Le système, conçu à base de cames et de leviers, est intégré à une plateforme qui permet le support des bras et intègre les caméras.

FIGURE 2 : Maquette développée

La première version de la maquette (cf Figure 2), a permis de valider :

- L'architecture matérielle et logicielle
- Le respect des contraintes du cahier des charges

La très bonne ergonomie de l'ensemble et son utilisabilité pour des étudiants de chirurgie Cependant, les performances restent à optimiser.

C'est pourquoi, depuis début juillet, un stagiaire a été recruté pour :

- Optimiser le système mécanique de simulation des mouvements respiratoires (meilleur réglage des amplitudes et vitesses, réduction du bruit)
- Finaliser le tracking 3D des points
- Produire l'interface WEB

L’objectif est de commencer des essais à l’Ecole de Chirurgie de l’APHP, rue du fer à moulin .

Une première étape, consistera à faire passer sur MITRAD, des micro-chirurgiens séniors et confirmés qui serviront d’étalons or, pour évaluer les étudiants. Dans un second temps, les étudiants seront comparés aux éléments du tracking pour les comparer aux chirurgiens référents.

De plus nous utiliserons l'« University of Western Ontario Microsurgery Skills Acquisition/Assessment (UWOMSA) » (1) qui permet sur la base d'un enregistrement vidéo de la gestuelle des étudiants une notation pour le suivi des performances.

Enfin nous espérons intégrer l'algorithme du Pr David Biau (2) dans notre prototype afin de générer des courbes d'apprentissage personnalisé permettant aussi un meilleur jugement des progres mais aussi des étudiants qui ne pourront pas valider cette technique.

Tous ces éléments feront de MITRAD un élément de recherche en pédagogie et peut-être a terme un outil indispensable pour valider l'acquisition des compétences microchirurgicales (2– 5)

Moyens engagés au 20/07/2015

Composants mécaniques	664,90
Motoréducteurs	349,00
Composants informatiques	896,87
Caméra/optique	838,00
Composants Electroniques	281,16
Stage Bondon 13/07-22/08/15	669,90
TOTAL	3699,83

Sur le budget initial de 8900 euros, seuls 3700 euros ont été dépensés.

Le montant restant permettra de couvrir les frais liés aux améliorations du prototype (réalisation de pièces en sous-traitance pour plus de robustesse) et aux tests (automne 2015).

Il est également prévu une mission (Dr Atlan) pour présentation des résultats à deux congrès de microchirurgie courant 2016 (un national et un international) la mise en place au long cours à l'école de chirurgie dans le cadre du DIU de microchirurgie de l'UPMC.

Se rajouteront des instruments microchirurgicaux dédiés 1500 euros.

CAHIER DES CHARGES MITRAD

EQUIPE 2

Contrôle et évaluation des opérations d'anastomose par assistance robotisée

Il est actuellement très contraignant de s'entraîner à cette opération et difficile de l'évaluer sans la présence d'un chirurgien expérimenté. Constatant l'insuffisance des systèmes actuels, la direction de l'hôpital s'est donc adressée à Polytech pour réaliser un prototype afin de savoir s'il était possible de concevoir un dispositif plus complet. Des étudiants de Polytech ont déjà travaillé sur ce projet en 2014, Pierre Venet, Nicolas Landais, Victor Clément Chiu et Maxence Bondon. Au vu du travail déjà réalisé, nous avons décidé de reprendre leurs recherches et d'inscrire les nôtres dans leur continuation. Dans l'idée, le client souhaite que ce projet servent de base pour éventuellement développer un jour, un robot capable de réaliser des anastomoses de manière autonome.

W. Colin, F. Rabiazamaholy & J. Prin travaillent en collaboration avec le Dr M. Altan de l'hôpital Tenon (Paris XX) pour produire une plate-forme d'entraînement à l'anastomose. L'anastomose est une opération du domaine de la microchirurgie. Il s'agit en général de raccorder deux extrémités de vaisseaux sanguins par couture ou par

agrafe. Cette opération doit être précise et nécessite une formation encadrée par des chirurgiens expérimentés.

L'hôpital espère ainsi que les recherches vont leur permettre de réduire l'utilisation des rats de laboratoire et d'optimiser le temps des examinateurs lors des opérations réalisées par les apprenants.

Nous avons pu détacher les objectifs auxquels doit répondre le projet :

- Acquisition vidéo :

o Un système de caméra binoculaire doit permettre l'acquisition du mouvement des outils utilisés lors de l'anastomose en 3 dimensions.

Un microscope électronique doit permettre d'avoir une vidéo de l'opération que les examinateurs peuvent visionner de manièredifférééé.

Algorithmes d'évaluation :

o Évaluation des gestes par suivi des tremblements et des mouvements en quantifiant et en comparant avec des données pour rendre une évaluation quantitative.Il s'agit ici de tenir compte d'une fluidité générale du mouvement sans pour autant discriminer des mouvements ponctuels violents.

o Évaluation du résultat: temps passé pour réaliser l'opération. À la sortie, le programme sera capable de juger si le déroulement de l'opération est acceptable ou non.

- Plate-forme d'évaluation différée :

o Création d'un site internet sécurisé, où les étudiants peuvent se connecter pour voir l'évaluation faite par les examinateurs,

les remarques sur l'opération et l'évolution de la qualité de leurs opérations.

o Les correcteurs quant à eux, peuvent se connecter pour évaluer la qualité des opérations des étudiants de manière différée. Leur présence n'est plus sollicitée et l'évaluation peut se faire en ligne en regardant la vidéo acquise par un microscope électronique.

- Dispositif de simulation :

o Une anastomose se fait dans des conditions bien particulières (orientation du champ opératoire, propriétés des prothèses et simulation respiration). Pour mettre l'étudiant dans les conditions les plus proches de la réalité possible, un dispositif va venir simuler ces perturbations lors de l'opération..Ce dispositif doit être robuste et présenter un design en cohérence avec les utilisateurs, la finalité étant une ressource disponible à volonté aux élèves et aux professeurs.

b) Environnement

Il existe à l'heure actuelle plusieurs projets menés à travers le monde. Néanmoins, aucun d'entre eux ne convient aux attentes du client. Certains permettent de réaliser les anastomoses à distance en ajoutant aux connaissances chirurgicales des apports technologiques (vue en 3D, suppression du tremblement …), entre autres le système Da Vinci. Il existe également des simulateurs de gestes virtuels. La problématique est donc de faire un compromis entre les deux. Quelques exemples de tels systèmes ont déjà été trouvés: des systèmes d'analyse intégrant des traqueurs optiques et des

capteurs d'efforts. On a par exemple le système DermaRob qui permet d'assister les

chirurgiens lors de prélèvements de peau pour réaliser des greffes. Ou encore le projet CT-BOT pour assister lors d'interventions percutanée. Néanmoins, les capteurs utilisés sont spécifiques et ne permettent donc pas une utilisation généralisable.Le projet ayant déjà fait l'objet d'une étude l'année dernière, nous ne partons pas de zéro.. Nous possédons un prototype dont :

- La partie mécanique répond aux attentes du client puisqu'elle simule de manière assez réaliste les conditions dans lesquelles sont réalisées les anastomoses. Néanmoins elle pourrait être améliorée en supprimant l'hyperstatisme du dispositif.

- La partie acquisition 3D demande encore beaucoup de travail mais une grosse partie qui consistait à adapter le format des caméras et à suivre des cercles de couleur a été implémentée.
- Le logiciel qui permet de démarrer le simulateur a été implémenté
- Un manque d'ergonomie. Il ne sert actuellement qu'à vérifier le bon fonctionnement de la maquette.

Illustration 1: Vue de face de la maquette

II. Analyses fonctionnelles

a)

Le besoin provient d'un souci d'amélioration de l'efficacité et de la qualité de l'opération mais aussi d'une nécessité d'optimisation du temps des chirurgiens examinateurs. Le besoin est donc d'augmenter les chances de réussites et de diminuer le temps de réalisation. Le besoin ne peut disparaître dû à l'augmentation de l'accès aux soins en France et dans le monde.

a) Diagrammes fonctionnels

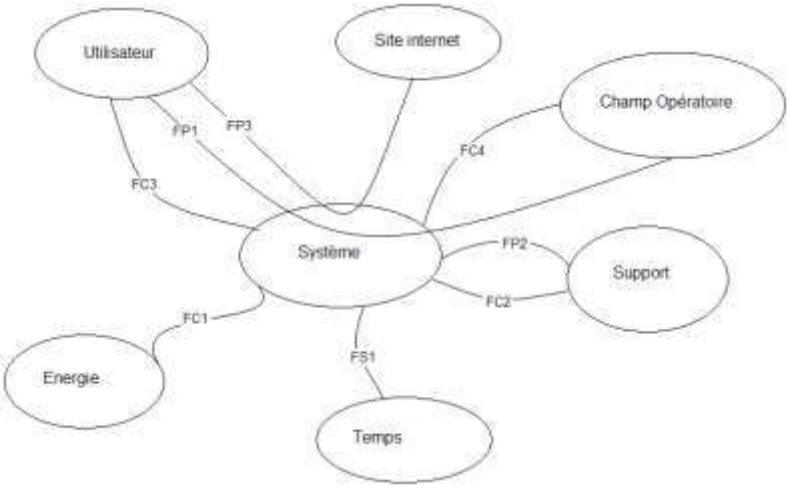
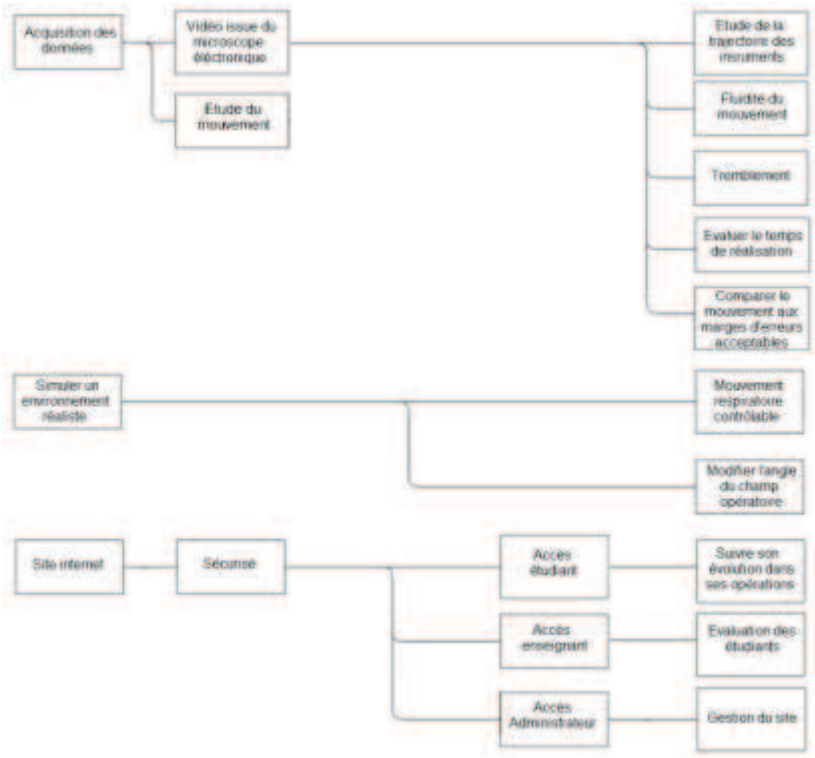


Illustration 3: Diagramme Pieuvre



FP1 : Réaliser l'opération

FP2 : Simuler un environnement opératoire réaliste FP3

: Évaluer l'utilisateur

FC1 : Adapter le système au secteur FC2 :

S'adapter aux prothèses

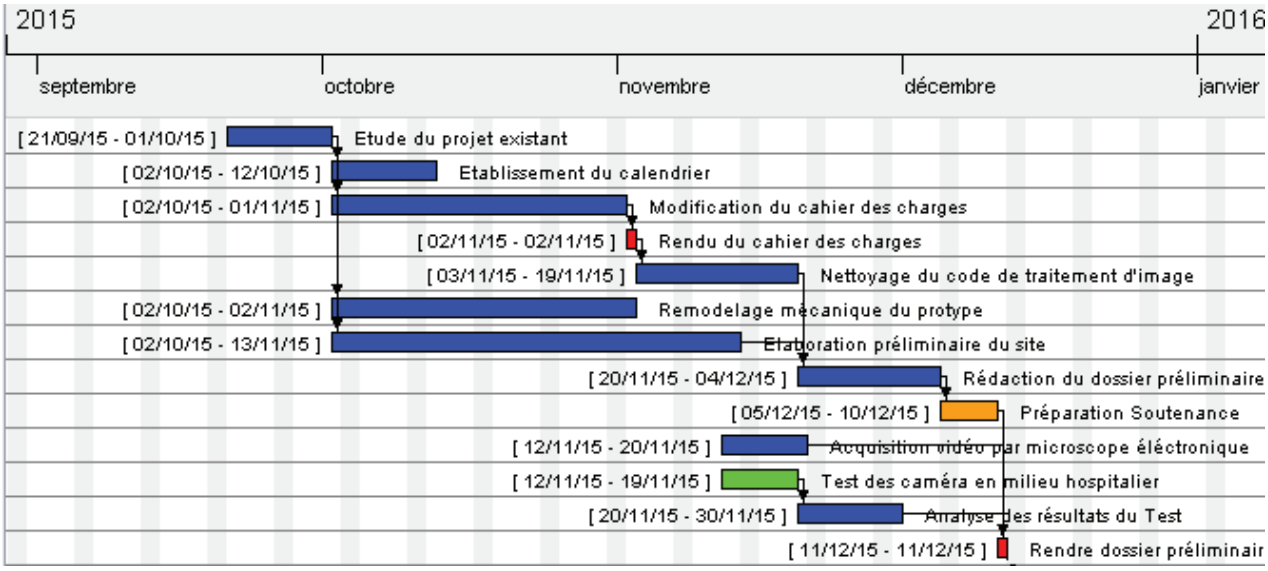
FC3 : Ne pas gêner l'utilisateur

FC4 : S'adapter au matériel chirurgical FS1 : Mesure la durée de l'intervention chirurgicale.

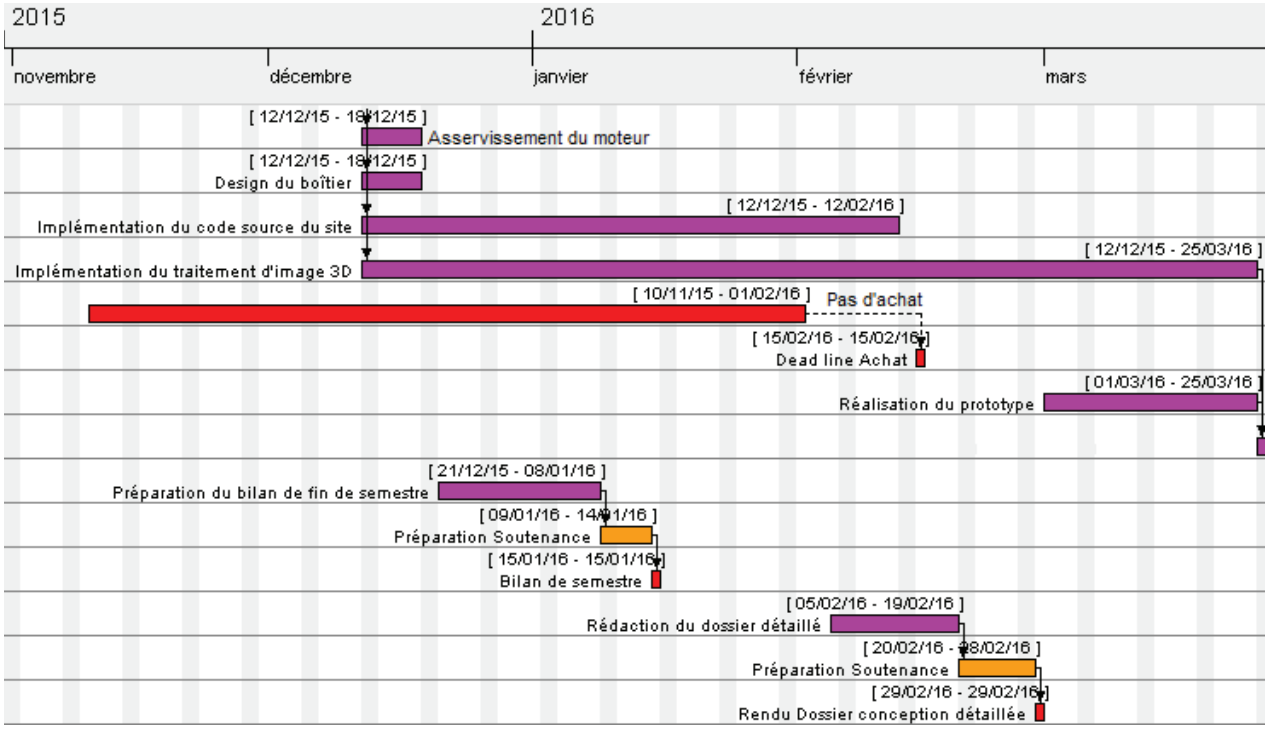
I. Planning et livrable

a) Diagramme de Gantt

Phase 1 :



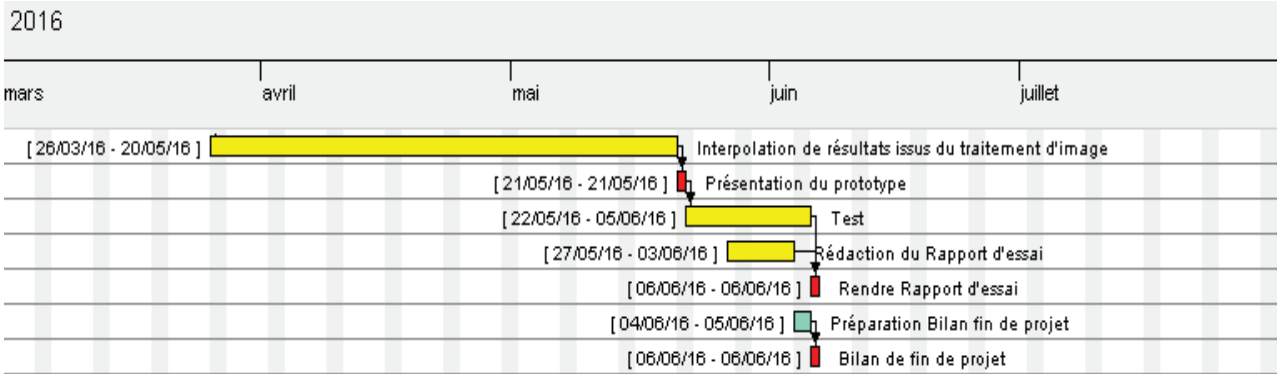
Phase 2 :


2015
2016
novembre
décembre
janvier
février
mars
[12/12/15 - 18/12/15]
Asservissement du moteur
[12/12/15 - 18/12/15]
Design du boîtier
[12/12/15 - 12/02/16]
Implémentation du code source du site
[12/12/15 - 25/03/16]
Implémentation du traitement d'image 3D
[10/11/15 - 01/02/16]
Pas d'achat
[15/02/16 - 15/02/16]
Dead line Achat
[01/03/16 - 25/03/16]
Réalisation du prototype
[21/12/15 - 08/01/16]
Préparation du bilan de fin de semestre
[09/01/16 - 14/01/16]
Préparation Soutenance
[15/01/16 - 15/01/16]
Bilan de semestre
[05/02/16 - 19/02/16]
Rédaction du dossier détaillé
[20/02/16 - 28/02/16]
Préparation Soutenance
[29/02/16 - 29/02/16]
Rendu Dossier conception détaillée

Phase 3 :

Légende :

- Bleu : Phase 1
- Violet : Phase 2
- Jaune : Phase 3
- Orange : Préparation des soutenances
- Vert : Déplacement à l'hôpital
- Rouge : Dead line



b) Descriptif des fournitures

Désignation	Estimation
Conception de la boite (CTP, Plexiglass, LED,	80,00 €
Conception du système Mécanique (rotules	12,00 €

L'hôpital peut également nous fournir des clamps et des vaisseaux afin de procéder à des tests.

c) Description du rendu

Suite à une réunion avec le client, nous avons pu faire un point sur ce qui a été fait jusqu'à présent.

En ce qui concerne la partie mécanique, le client la considère comme satisfaisante bien qu'elle puisse être optimisée. En revanche, la partie traitement d'image 3D et implémentation du site web requiert encore beaucoup de travail. C'est donc sur ce point que l'on doit accorder une attention toute particulière. On a donc pu dégager deux objectifs principaux :

- Le premier objectif est de permettre aux examinateurs de pouvoir évaluer les apprenants de manière différée au travers d'un site web. Les examinateurs pourront ainsi faire l'évaluation en regardant la vidéo de l'opération issue du microscope électronique de l'hôpital, de n'importe où dans le monde.

Ainsi, sur un même écran seront visible la vidéo et le formulaire pédagogique mis au point par un hôpital Canadien, permettant ainsi aux professeurs de répondre au questionnaire au fur et à mesure que la vidéo défile.

Ce formulaire vise à quantifier les compétences de l'étudiant selon des critères essentiels pour réaliser une anastomose correctement.

Le site sera implémenté de manière à ce qu'il soit ergonomique, sécurisé et facile d'utilisation pour les examinateurs et les élèves.

Chaque étudiant disposera d'une session sur le site où il pourra trouver tous les résultats de ses opérations, les appréciations laissées par les professeurs et ses courbes d'évolution.

- Le second objectif, qui est le cœur de ce projet industriel, consiste en un traitement des images 3D issues des caméras industrielles.

  En effet, l'acquisition d'images par nos deux caméras industrielles vont nous permettre de faire une étude du mouvement des outils utilisés dans l'espace.

  De ces mouvements nous espérons pouvoir déterminer s'il existe un modèle mathématique qui permet de valider si une anastomose est réalisée correctement.

  Nous devrons donc identifier les paramètres que l'on considère comme essentiels et ceux qui sont annexes.

Il faut noter que le projet a déjà coûté 4600€ répartis dans les différentes parties de la maquette déjà existant.

II. Organisation du projet

a) Rôle des acteurs

Nous avons réparti les tâches comme suit:

Wilson Colin : Chef Projet, contact avec les clients, Informatique Jonathan Prin : Mécanique, Informatique Fanja Rabiazamaholy : Informatique

La partie mécanique étant déjà faite et fonctionnant plutôt correctement, il n'est pas nécessaire d'être plusieurs sur cette partie. En revanche, côté informatique il reste le site à réaliser et la partie traitement d'image. C'est ce qui nous prendra la majeure partie de notre temps.

a) Modalité de communication

Afin de réaliser le cahier des charges, nous avons décidé de partager le document sur un espace partagé mais personnel afin de garantir le secret industriel.

III. Évolution et utilisation du dispositif

a) Outils d'installation et de maintenance

En ce qui concerne l'installation, elle ne nécessite pas de procédure particulière. Il suffit de brancher l'appareil sur le secteur et de raccorder l'écran au support.

Toutefois, le dispositif est sensible à son environnement. Malgré le dispositif d'éclairage qui lui est intégré, il est nécessaire qu'il soit installé dans une pièce avec une luminosité normale.

De plus, pour ne pas entacher la précision du dispositif il faudra accorder une importance toute particulière quant à la propreté des objectifs des caméras.

b) Fiabilité du système

La chirurgie est une science qui doit être pratiquée avec minutie. Les élèves doivent donc être évalués de manière précise. Notre dispositif devra donc quantifier le travail des opérateurs avec une marge d'erreur relativement faible. Néanmoins, substituer l'examinateur est envisagé, à long terme , mais pas pour le moment , nous proposons un degré de fiabilité qui ne nécessite p

a) Évolution du dispositif

Ce prototype a pour objectif d'optimiser le temps des chirurgiens mais aussi de servir de support à la réalisation d'un robot capable d'opérer des anastomoses de manière autonome. En effet, le produit que nous essayons de mettre en œuvre servira à construire les algorithmes nécessaires au robot.

I. Présentation générale du projet

a) Contexte

Le département de microchirurgie de l'hôpital Tenon de Paris souhaite réaliser un système ayant pour but de faciliter l'accès à l'entraînement aux chirurgiens.

En effet, il est actuellement très contraignant de s'entraîner à cette opération et difficile de l'évaluer sans la présence d'un chirurgien expérimenté. Constatant l'insuffisance des systèmes actuels, la direction de l'hôpital s'est donc adressée à Polytech pour réaliser un prototype afin de savoir s'il était possible de concevoir un dispositif plus complet. Des étudiants de Polytech ont déjà travaillé sur ce projet en 2014, Pierre Venet, Nicolas Landais, Victor Clément Chiu et Maxence Bondon. Au vu de ce qu'ils ont fait, nous avons décidé de reprendre leurs recherches et d'inscrire les nôtres dans leur continuation. Dans l'idée, le client souhaite que ce projet servent de base pour éventuellement développer un jour, un robot capable de réaliser des anastomoses de manièreautonome.

b) Projet

W. Colin, F. Rabiazamaholy & J. Prin travaillent en collaboration avec le Dr M. Altan de l'hôpital Tenon (Paris XX) pour produire une plate-forme d'entraînement à l'anastomose. L'anastomose est une opération du domaine de la microchirurgie. Il s'agit en général de raccorder deux extrémités de vaisseaux sanguins par couture ou par agrafe. Cette opération doit être précise et nécessite une formation encadrée par des chirurgiens expérimentés.

L'hôpital espère ainsi que nos recherches vont leur permettre de réduire l'utilisation des rats de laboratoire et d'optimiser le temps des examinateurs lors des opérations réalisées par les apprenants.

a) Énoncé des objectifs du projet

Les objectifs auxquels doit répondre le projet sont les suivants :

- Acquisition vidéo :

  - Un système de caméra binoculaire doit permettre l'acquisition du mouvement des outils utilisés lors de l'anastomose en 3 dimensions.

Un microscope électronique doit permettre d'avoir une vidéo de l'opération que les examinateurs

  - peuvent visionner de manière différée

c) Niveaux des critères d'appréciation

Numéro	EMU	Intitulé	Caractéristique	Critère	Niveau	Flexibilité
FP1	Support	Générer les perturbations lors de l'opération	Simulation	Fréquence respiratoire	12 à 20 cycles par minute	0
				Amplitude respiratoire	4 cm	1
				Angle du Champ opératoire	*	2
FP2	Site internet	Évaluer la performance de l'utilisateur	Fluidité du mouvement		*	2
			Tremblements		*	2
FC1	Énergie	Adapter le système au secteur	Alimentation	Tension	220V~	3
FC2	Support	S'adapter aux caractéristiques des prothèses	Diamètre	Plage	1-2mm	3
FC3	Utilisateur	Ne pas gêner les mouvements de l'utilisateur	Encombrement	Volume	< 30*30*30 (h*L*l cm3)	3
FC4	Champ Opératoire	S'adapter au matériel chirurgical				3

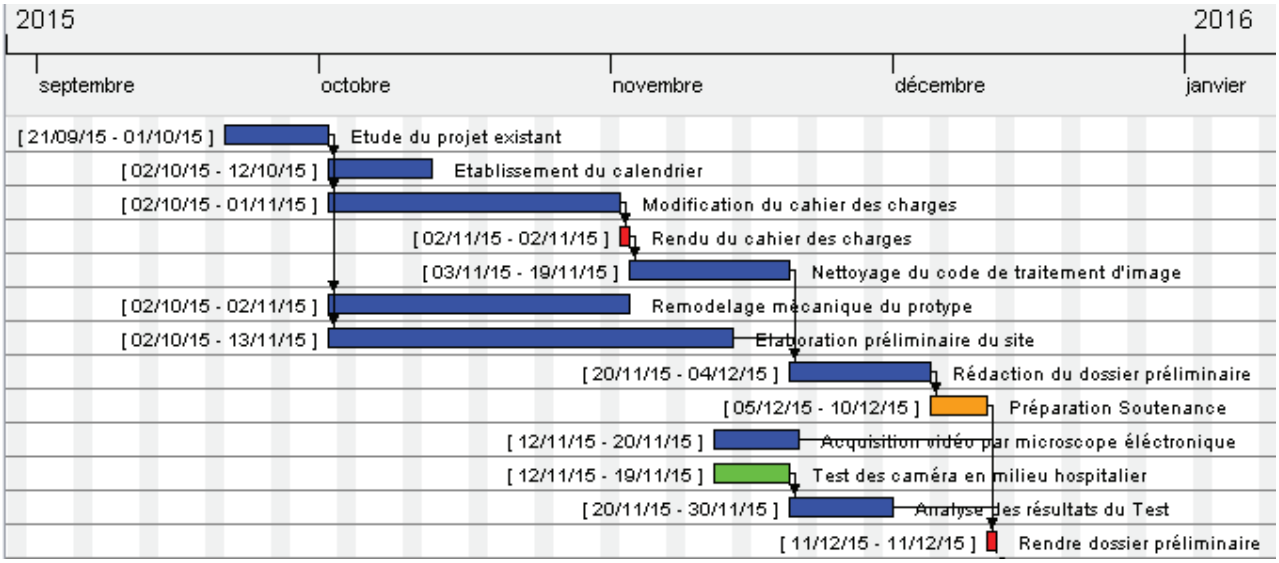
*' = Données inconnues du client. EMU = éléments du milieu d'utilisation.

Flexibilité : allant de 0 (flexible) à 3 (inflexible)

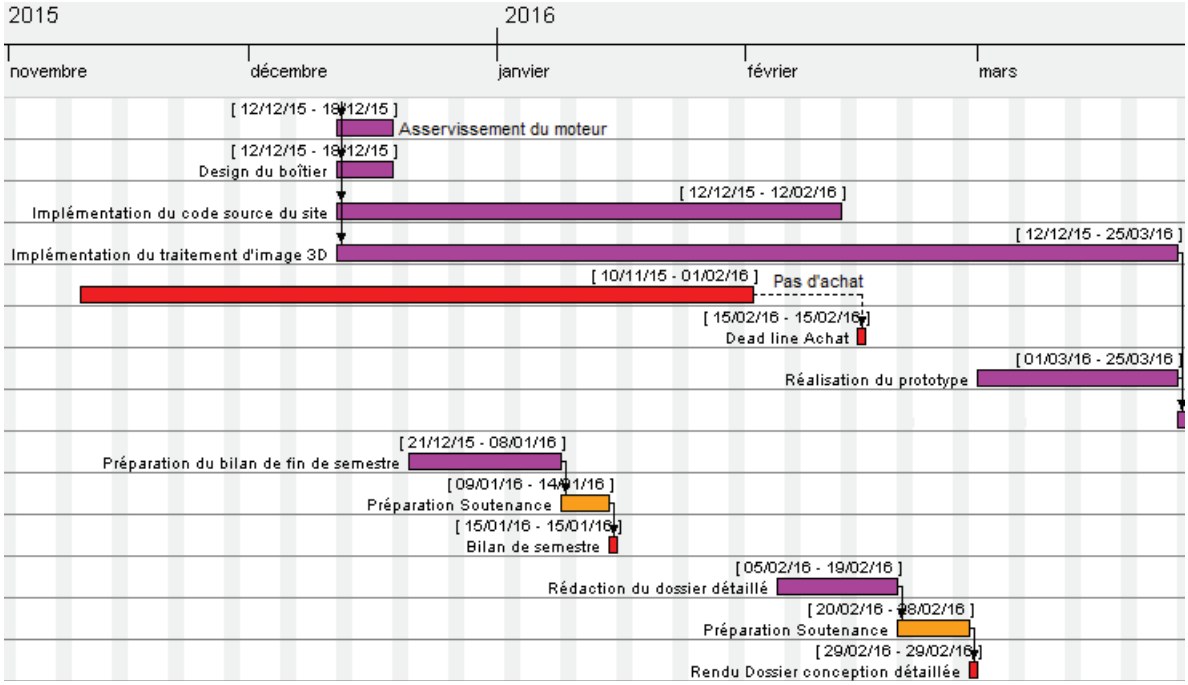
II. Planning et livrable

a) Diagramme de Gantt

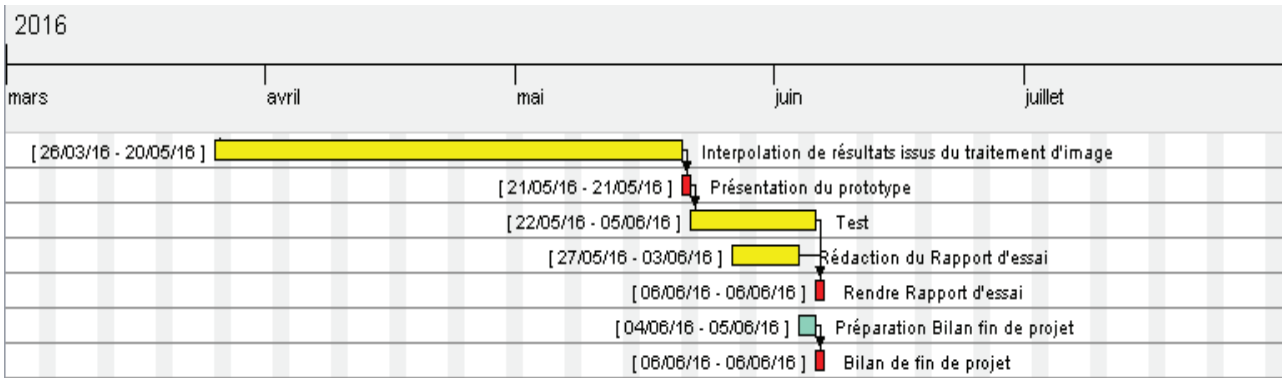
Phase 1 :



Phase 2 :


2015
2016
novembre
décembre
janvier
février
mars
[12/12/15 - 18/12/15]
Asservissement du moteur
[12/12/15 - 18/12/15]
Design du boîtier
[12/12/15 - 12/02/16]
Implémentation du code source du site
[12/12/15 - 25/03/16]
Implémentation du traitement d'image 3D
[10/11/15 - 01/02/16]
Pas d'achat
[15/02/16 - 15/02/16]
Dead line Achat
[01/03/16 - 25/03/16]
Réalisation du prototype
[21/12/15 - 08/01/16]
Préparation du bilan de fin de semestre
[09/01/16 - 14/01/16]
Préparation Soutenance
[15/01/16 - 15/01/16]
Bilan de semestre
[05/02/16 - 19/02/16]
Rédaction du dossier détaillé
[20/02/16 - 28/02/16]
Préparation Soutenance
[29/02/16 - 29/02/16]
Rendu Dossier conception détaillée

Phase 3 :



Légende :

- Bleu : Phase 1
- Violet : Phase 2
- Jaune : Phase 3
- Orange : Préparation des soutenances
- Vert : Déplacement à l'hôpital
- Rouge : Dead line

b) Descriptif des fournitures

Désignation	Estimation
Conception de la boite (CTP, Plexiglass, LED,	80,00 €
Conception du système Mécanique (rotules	12,00 €

L'hôpital peut également nous fournir des clamps et des vaisseaux afin de procéder à des tests.

c) Description du rendu

Suite à une réunion avec le client, nous avons pu faire un point sur ce qui a été fait jusqu'à présent.

En ce qui concerne la partie mécanique, le client la considère comme satisfaisante bien qu'elle puisse être optimisée. En revanche, la partie traitement d'image 3D et implémentation du site web requiert encore beaucoup de travail. C'est donc sur ce point que l'on doit accorder une attention toute particulière. On a donc pu dégager deux objectifs principaux :

- Le premier objectif est de permettre aux examinateurs de pouvoir évaluer les apprenants de manière différée au travers d'un site web. Les examinateurs pourront ainsi faire l'évaluation en regardant la vidéo de l'opération issue du microscope électronique de l'hôpital, de n'importe où dans le monde.

  Ainsi, sur un même écran seront visible la vidéo et le formulaire pédagogique mis au point par un hôpital Canadien, permettant ainsi aux professeurs de répondre au questionnaire au fur et à mesure que la vidéo défile.

Ce formulaire vise à quantifier les compétences de l'étudiant selon des critères essentiels pour réaliser une anastomose correctement.

Le site sera implémenté de manière à ce qu'il soit ergonomique, sécurisé et facile d'utilisation pour les examinateurs et lesélèves.

Chaque étudiant disposera d'une session sur le site où il pourra trouver tous les résultats de ses opérations, les appréciations laissées par les professeurs et ses courbes d'évolution.

- Le second objectif, qui est le cœur de ce projet industriel, consiste en un traitement des images 3D issues des caméras industrielles.

  En effet, l'acquisition d'images par nos deux caméras industrielles vont nous permettre de faire une étude dumouvement des outils utilisés dans l'espace.

  De ces mouvements nous espérons pouvoir déterminer s'il existe un modèle mathématique qui permet de valider si une anastomose est réalisée correctement.

  Nous devrons donc identifier les paramètres que l'on considère comme essentiels et ceux qui sont annexes.

Il faut noter que le projet a déjà coûté 4600€ répartis dans les différentes parties de la maquette déjà existante.

III. Organisation du projet

a) Rôle des acteurs

Nous avons réparti les tâches comme suit:

Wilson Colin : Chef Projet, contact avec les clients, Informatique Jonathan Prin : Mécanique, Informatique Fanja Rabiazamaholy : Informatique La partie mécanique étant déjà faite et fonctionnant plutôt correctement, il n'est pas nécessaire d'être plusieurs sur cette partie. En revanche, côté informatique il reste le site à réaliser et la partie traitement d'image. C'est ce qui nous prendra la majeure partie de notre temps.

b) Modalité de communication

Afin de réaliser le cahier des charges, nous avons décidé de partager le document sur un espace partagé mais personnel afin de garantir le secret industriel.

IV. Évolution et utilisation du dispositif

a) Outils d'installation et de maintenance

En ce qui concerne l'installation, elle ne nécessite pas de procédure particulière. Il suffit de brancher l'appareil sur le secteur et de raccorder l'écran au support.

Toutefois, le dispositif est sensible à son environnement. Malgré le dispositif d'éclairage qui lui est intégré, il est nécessaire qu'il soit installé dans une pièce avec une luminosité normale.

De plus, pour ne pas entacher la précision du dispositif il faudra accorder une importance toute particulière quant à la propreté des objectifs des caméras.

b) Fiabilité du système

La chirurgie est une science qui doit être pratiquée avec minutie. Les élèves doivent donc être évalués de manière précise. Notre dispositif devra donc quantifier le travail des opérateurs avec une marge d'erreur relativement faible. Néanmoins, substituer l'examinateur est envisagé, à long terme , mais pas pour le moment , nous proposons un degré de fiabilité qui ne nécessite p

b) Évolution du dispositif

Ce prototype a pour objectif d'optimiser le temps des chirurgiens mais aussi de servir de support à la réalisation d'un robot capable d'opérer des anastomoses de manière autonome. En effet, le produit que nous essayons de mettre en œuvre servira à construire les algorithmes nécessaires au robot.

II) Intérêt de l'Angiographie par Résonance Magnétique Nucléaire, avec séquence TIME OF FLIGHT 2D-3D dans l'exploration des vaisseaux de petits diamètres. Validation in vivo, et application clinique

L'artériographie est un moyen objectif, d'exploration vasculaire, et qui n'a pas le caractère opérateur-dépendant de l'échographie Doppler (Figure 1 et 2) .Ce dernier examen, reste cependant un examen de référence en pratique clinique.

Un des défauts de l'amplificateur de brillance est l'utilisation de radiations ionisantes, avec une réglementation, une maintenance, des protections, une formation du personnel strictes. Les injections de produit de contraste sont aussi susceptibles, chez le petit animal, d'entrainer des complications, d'autant plus si des mesures répétées sont nécessaires, comme dans notre étude.

Lors du travail réalisé sur l'évaluation de la perméabilité des microprotheses vasculaires basées sur le PVA, nous avons été confronté à l'indisponibilité de l'amplificateur de brillance, pendant plusieurs semaines

Figure 1 A: Artériographie d'un implant PVA , Perméable à J7.

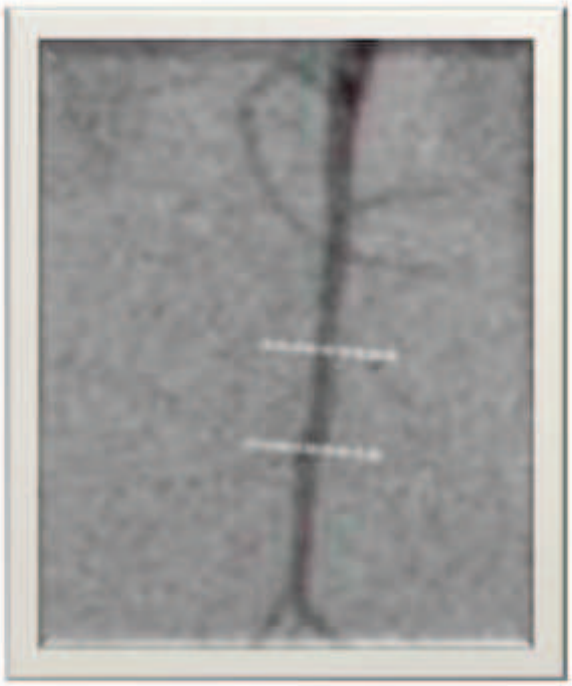


Figure 2 ; Artériographie d'une prothèse PVA perméable à 7 jours.

Nous nous sommes orientés vers l'utilisation de l'Angiographie par IRM grâce au Centre d'Explorations Fonctionnelles Intégré (CEFI) du petit animal(figure 3) labellisé IBiSA sur le site de Bichat, Université Paris VII. Nous avons eu accès à une IRM 7 Tesla (les IRM cliniques actuelles ayant des puissances de 1.5 à 3 Tesla).

Les images étaient d'excellentes qualités et donnaient des informations pertinentes.

Figure 3 : IRM 7 Tesla, disponible au CEFI, destiné au petit animal.

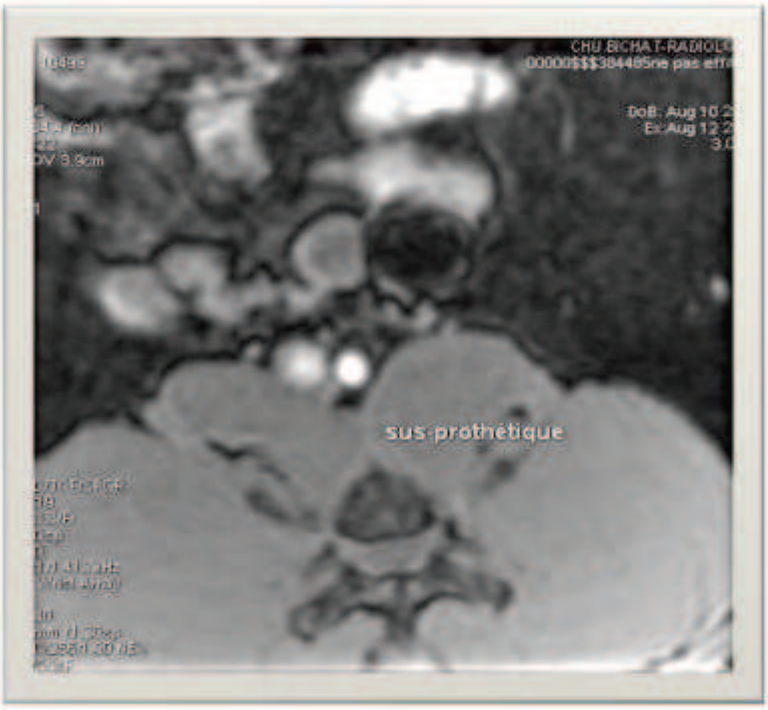


Figure 4 : Coupe coronale sus prothétique , IRM 7 Tesla avec injection de gadolinium.

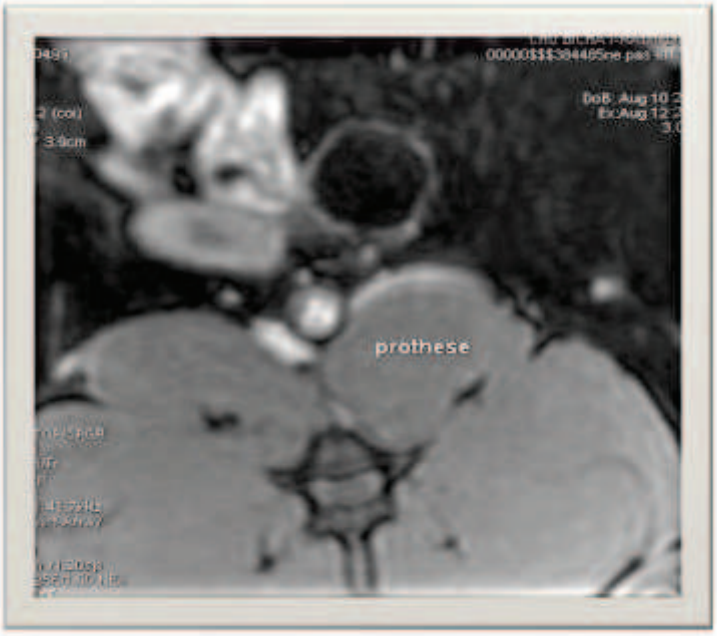


Figure 5 : Coupe coronale au niveau prothétique, Prothèse perméable. IRM 7 Tesla avec injection de gadolinium.

Figure 6 : Coupe coronale sous prothétique, flux d'aval de bonne qualité confirmant la perméabilité.

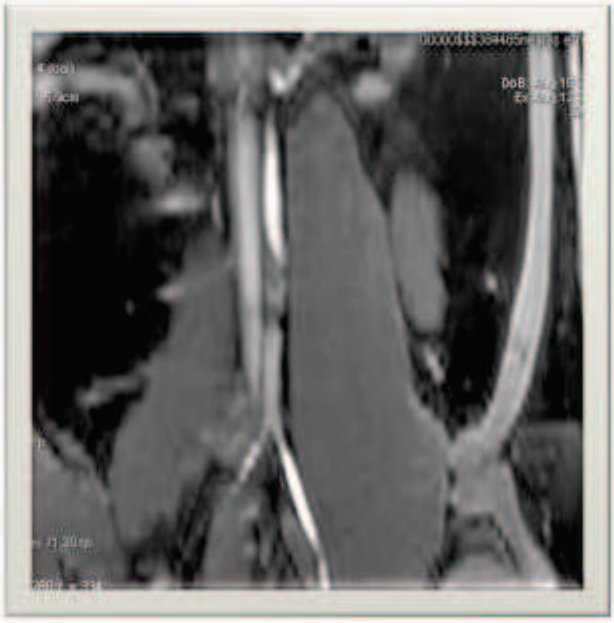


Figure 7A

Figure 7B

Figure 7A et B : IRM 7 Tesla avec injection de gadolinium. Prothèse perméable (A), thombosée (B).

Malgré ces bons résultats de l'imagerie par IRM 7 tesla avec injection de Gadolinium (Figures 4 à 7), nous n'avons pu poursuivre les explorations. En effet, dans la suite des travaux du Pr Marc Chaouat nous avons utilisé pour les implantations, des rats Wistar, d'un poids moyen de 515g, afin de diminuer le problème d'incongruence de diamètre des prothèses avec l'aorte de rats trop jeunes. L'évaluation de la perméabilité des prothèses avec des rats de ce poids, est peu compatible, avec cette IRM dédiée au petit animal (souris).

Nous avons alors contacté l'équipe du Pr Phalla OU, à Bichat afin de répondre au charges de charge suivant :

- sans injection de produit de contraste
- rapide
- fiable
- pour la perméabilité des petits vaisseaux, ici l'aorte du rat.
- Sans limite liée à la taille de l'animal.

L'angiographie par Résonnance Magnétique (ARM) par Temps de VOL ou TIME OF FLIGHT ou TOF a été adaptée par Sylvie Chillon technicienne IRM, et le Pr PHALLA OU, au CHU Bichat sur une IRM 3 Tesla.

Cette séquence est utilisée en neuroradiologie pour dépister les thromboses des vaisseaux cérébraux. Dans l' ARM par temps de vol, on va optimiser des séquences d'écho de gradient compensées en flux, afin de privilégier le signal vasculaire par rapport à celui des tissus environnants en saturant le signal des tissus stationnaires avec des TR très courts.

L'aimantation longitudinale de ces tissus n'a pas le temps de "repousser" et leur signal s'affaiblit favorisant le phénomène d'entrée de coupe; comme le sang circulant entrant dans la zone explorée n'a pas été saturé , son aimantation longitudinale est maximale.

Un plan de coupe perpendiculaire aux vaisseaux renforce le signal vasculaire et le signal provenant du flux sanguin est donc élevé par rapport à celui des tissus saturés. Un TE (Temps d'Echo) court permet de s'affranchir du déphasage des flux turbulents. Il est possible de sélectionner la direction des flux à visualiser en plaçant une bande de pré-saturation. Cette bande de pré-saturation (impulsion RF sélective en amont ou en aval du plan de coupe) amont du volume d'intérêt permet de supprimer le signal veineux ou artériel non désirés.

Imagerie TOF 2D

En acquisition 2D, l'imagerie en temps de vol est effectuée à l'aide d'un ensemble de coupes fines qui seront empilées pour reconstruire un pseudo-volume. L'avantage des coupes fines est une meilleure sensibilité aux flux lents (qui ne resteront pas dans la coupe longtemps et ne seront donc pas saturés) et la possibilité d'utiliser des angles de bascule , élevés (d'où une meilleure saturation des tissus stationnaires et plus de signal vasculaire). Cependant, l'acquisition 2D a l'inconvénient d'avoir une mauvaise résolution spatiale dans l'axe de la pile de coupe.

Imagerie TOF 3D

Au contraire de l'imagerie TOF 2D, l'acquisition TOF 3D volumique permet d'obtenir une bonne résolution spatiale dans les 3 directions de l'espace, avec un meilleur rapport signal / bruit . Du fait de l'excitation d'un volume à chaque répétition, il y a une saturation progressive des flux, d'autant plus qu'ils sont lents, les plus lents peuvent même disparaître complètement. On peut diminuer la saturation des flux au cours de leur parcours dans le volume exploré en fractionnant l'acquisition 3D en plusieurs blocs (ou « slabs ») MOTSA : Multiple Overlapping Thin Slab Acquisition) ce qui a été réalisé dans la séquence d'ARM.

L'importance du signal vasculaire dépend:

- de la vitesse et du type de flux
- de la longueur et de l'orientation du vaisseau exploré (le signal vasculaire sera meilleur si la coupe est perpendiculaire à l'axe du vaisseau)
- des paramètres de la séquence : TR, angle de bascule, TE, épaisseur de coupe

Limites

Les principales limites de l'ARM par temps de vol sont :

- La perte de signal liée au déphasage des spins lorsque les flux sont complexes ou turbulents (sténoses), lorsque les flux sont trop lents ou orientés parallèlement au plan de coupe.

- La mauvaise suppression du signal des tissus stationnaires à T_1 court (graisse, athérome, hématome, thrombus)

Optimisation

On peut améliorer le contraste vasculaire en supprimant du signal des tissus statiques grâce à une impulsion de préparation de type transfert d'aimantation pour une excitation sélective de l'eau ou une saturation de graisse.

Matériels et méthodes:

Le but de l'étude est de vérifier la faisabilité, d'une Angiographie par resonance magnétique, avec sequence en temps de vol, pour l'évaluation de la perméabilité de vaisseaux de petits diamètres en prenant comme modèle l'implantation, des micro-prothèses vasculaires à base de PVA . Nous avons restreint notre étude à la comparaison des micro-prothèses PVA gélatine et PVA ce qui représente 54 implantations chez l'animal. L'évaluation de la perméabilité est faite par IRM 3 Tesla nouvelle génération (General Electrics) à 1 mois, 2 mois, et 3 mois. Il y avait 3 observateurs (2 radiologues séniors et 1 chef de clinique assistant de radiologie) qui étaient « aveugles » par rapport aux types de tubes implantés. Un des observateurs donnait son diagnostic au moment de l'examen et les deux autres relisaient l'IRM à postériori.

L'antenne utilisée était une antenne de poignet (Figure 8) qui correspondait à la taille des rats utilisés. Lors d'un examen IRM, le poids est une donnée importante. Dans notre étude, il était considéré comme celui d'un nourrisson, c'est à dire le poids minimal pour limiter l'élévation de température obligatoire, lors de l'examen.

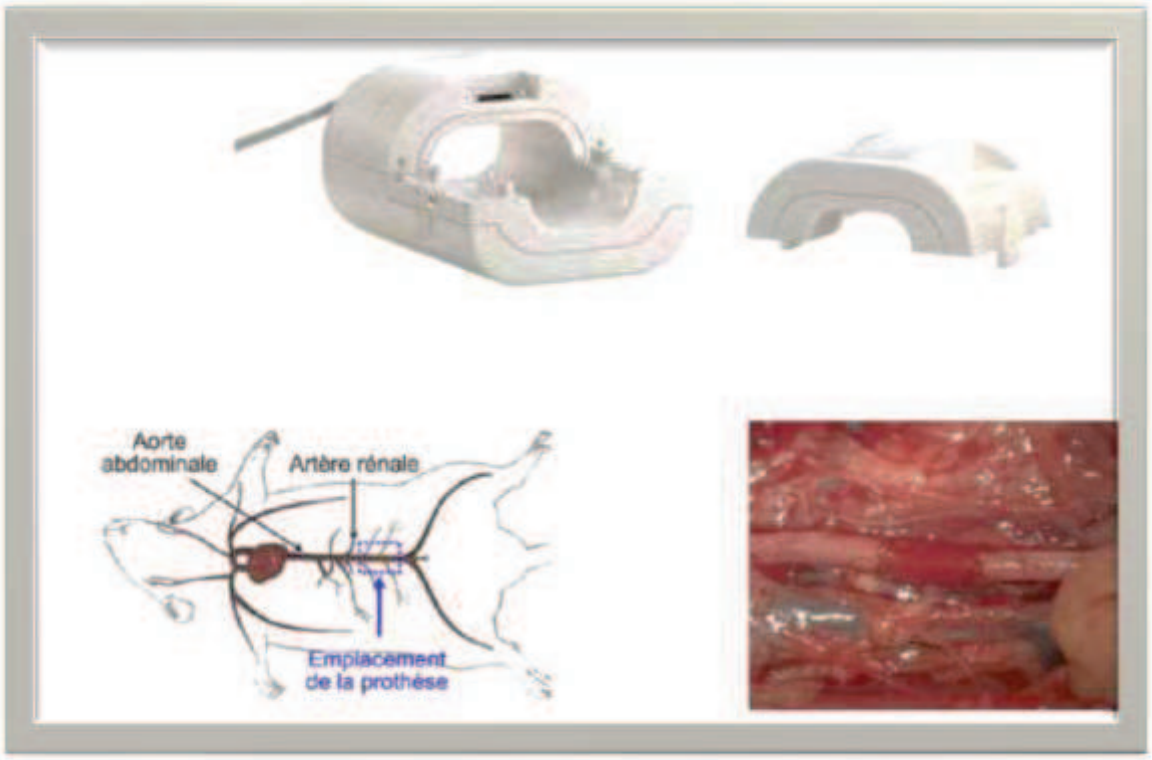


Figure 8 : Antenne de poignet ayant servi pour l'ARM 3 Tesla.

Les critères de perméabilité: lumière visible, force du signal en aval, pas de circulation collatérale, visualisation artères iliaques, visualisation de l'artère de la queue du rat donnaient un diagnostic sous la forme suivante T (« thrombose »), P (« perméable ») ou PS (« perméable avec sténose »). En effet une sténose ne donnant pas de flux d'aval , avec un signal insuffisant, était considérée comme une thrombose et celle avec un flux d'aval visualisable comme perméable. La durée d'acquisition de la séquence est de moins de 6 min.

Les animaux ont ensuite été sacrifiés pour vérifier la perméabilité des implants en parallèle des méthodes d'imagerie. L'histologie était réalisée « en aveugle » sur tous les rats. Sous anesthésie générale,(pentobarbital intra péritonéal) l'aorte a été prélevée 3 mm au-dessus et sous le site d'anastomose immédiatement après un rinçage de l'ensemble avec une solution saline à 0,9% sans effraction de la lumière du tube. Elles ont ensuite été fixées dans une para-formaldehyde à 4% solution avant d'être incluses dans l'OCT, et congelées dans de l'isopentane, par un bain d'azote liquide. Les sections transversales congelées ont six microns d'épaisseur, et sont positionnnées au milieu du tube pour la plupart des tubes, ainsi que certaines pour des sections longitudinales. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline / éosine et photos numériques et examinées par microscopie à contraste de phase avec caméra haute résolution (OLYMPUS CK40, Å ~ 100 ~ 400 et un grossissement). Les cellules endothéliales ont été colorées avec recA1 (1: 100, Serotec MCA970)) révélé par Alexa Fluor 594 de chèvre anti-souris (1:. 100, A11005 Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les cellules musculaires lisses ont été colorées avec de l' α-actine musculaire lisse de lapin (Ab5694, 2 pg / mL, Abcam, France) révélé par Alexa-488, anticorps secondaire conjugué (A11034, la dilution de 1/50, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Des contrôles négatifs ont été incubés avec les anticorps secondaires ou isotypes de BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Les clichés microscopiques d'immunofluorescence ont été prises à l'aide d'un microscope Leica DMRXA (Leica Microsystems).

Résultats

Groupe	**nombre**	**1 mois** sacrifice	**2 mois** sacrifice	**Week 12** sacrifice
PVA	12	1/4	0/4	0/4
PVAg 5%	9	0/3	0/3	0/3
PVAg 2.5%	9	1/3	0/3	0/3
PVAg 0.5%	12	2/4	¼	0/4
PVAg 1%	12	3/4	2/4	2/4

L'ARM permet une visualisation de l'implant en place, et du flux dans l'implant, des vaisseaux iliaques. L'artère de la queue du rat dans 40 cas sur 54 (74%).

Sur les 54 rats, 18 sessions d'imagerie ont été réalisées dont 12 tubes considérées comme perméables ou sténosés avec bon flux d'aval:

- 7 étaient des microprotheses en PVA gélatine 1%
- 3 PVA gélatine 5%
- 1 PVA 2.5%
- 1 PVA.

Les vaisseaux caves inferieurs sont visualisables, mais avec une définition plus faible. En ce qui concerne la variabilité inter-observateurs (3 observateurs), il y a 5 cas de discordance sur 54 examens, soit 11.1 % . Ces 5 examens concernaient le degré de sténose PS ou T. Ainsi dans ces cas une sténose très serrée a été considérée comme:

- « thrombose » par 2 observateurs et malgré tout perméable par le 3 ^{eme}. L'avis majoritaire rendait le bon diagnostic d'après l'histologie dans tous les cas en dehors d'un cas de sténose. Aucune thrombose histologique n'a été considérée par ARM, comme perméable ou perméable avec sténose..

Tableau 1 : Sur les 12 tubes « perméables », l'avis majoritaire, était le bon dans tous les cas puisqu'il y avait concordance avec l'histologie.

Observateur 1	Observateur 2	Observateur 3	histologie
P	P	P	P
P	P	P	P
P	P	P	P
P	P	P	P
PS	P	PS	PS
P	P	P	P
P	P	P	P
PS	PS	P	PS
P	P	PS	P
PS	P	PS	PS
P	P	P	P
P	P	P	P

La valeur predictive positive , après recueil de l'avis de 3 observateurs est de 100% pour la perméabilité après synthèse des avis majoritaires.

Figure 9 : Exemple d'une prothèse perméable en position sous rénale, avec une visualisation de la veine cave inférieure (VC), de la prothèse, des vaisseaux iliaques, artère caudale.

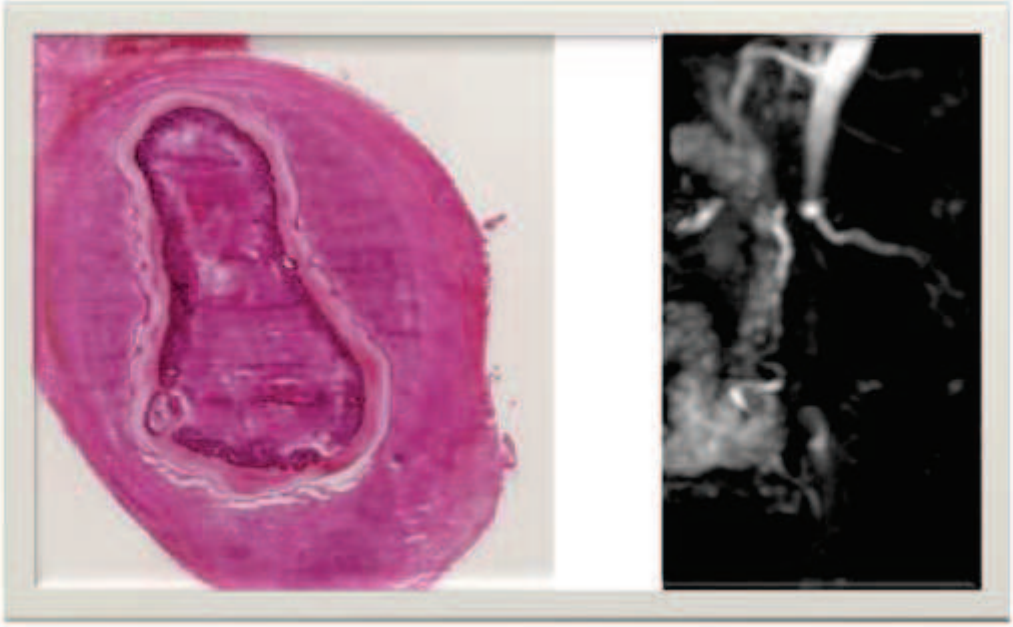


Figure 10 :Comparaison Histologie (A) et ARM (B) à 3 mois.PVA Gélatine 1% : « Thrombose ». Noter la circulation collatérale très développée sur l'ARM-TOF

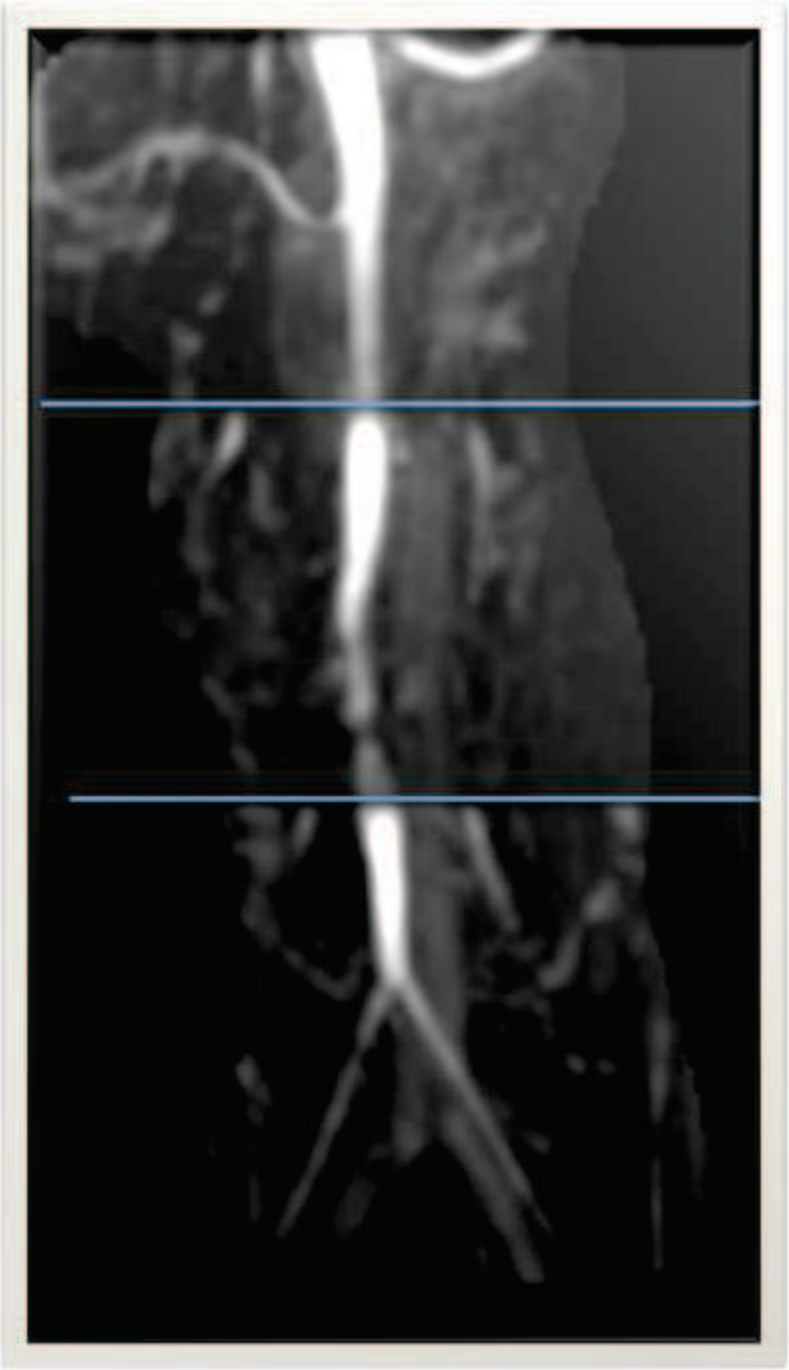


Figure 12 : Prothèses perméables 3 mois PVA 1% Gélatine.Visualisation d'une sténose avec bon flux d'aval plus bas que la prothese (coudée?).On peut aussi visualiser la veine cave avec un flux plus lent donc moins saturé (figure 12). Chaque bloc (voxel) est l'occasion d'un rehaussement de signal en général plus fort en début de boite qu'en fin

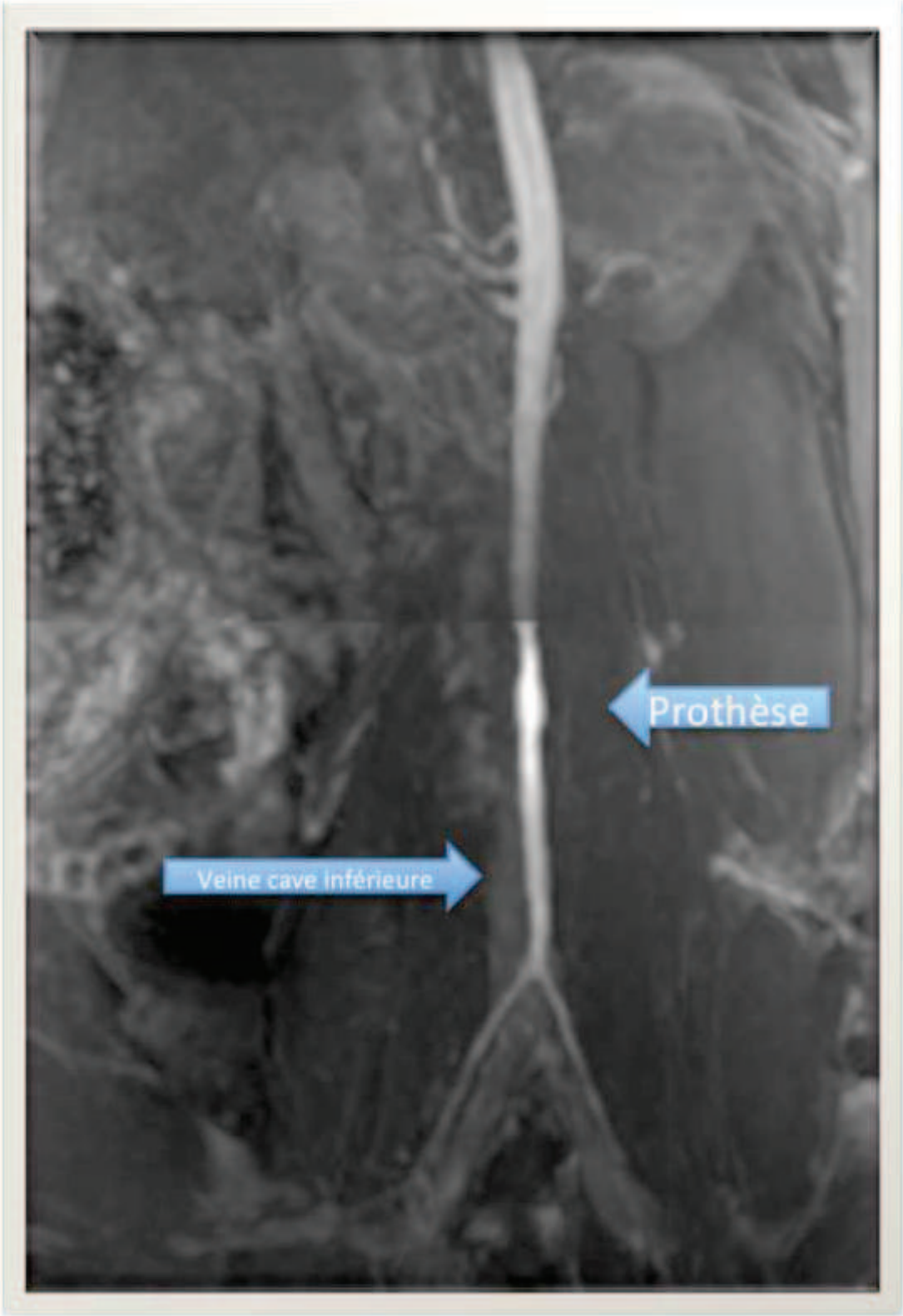


Figure 13 : ARM permettant une visualisation nette de la prothèse mais aussi de la veine cave inférieure.

Discussion

Les résulats principaux indiquent que :

- L'adjonction de gélatine, de façon optimale à hauteur de 1% améliore la perméabilité des tubes de PVA et cela a été confirmé plus haut.

- Le taux de perméabilité avec gélatine 1% est de 75% et surpasse tous les autres tubes ce qui a été confirmé histologiquement.

- Nous n'avons pas observé même à 3 mois d'anévrismes avec une encapsulation modérée.

Cette série est la plus importante à ce jour, pour l'utilisation de l'ARM pour l'évaluation de la perméabilité de greffes ou d'implant vasculaire sur l'aorte de rat. Ce dernier modèle est la base des études (28,62,63)sur le remplacement vasculaire de petit calibre.

La valeur predictive de cet examen, est tres bonne ans cette application puisque de 100%, en ce qui concerne la valeur predictive negative mais chez le rats et avec plusieurs observateurs.Avec injection chez l'humain l'ARM est performantes avec des valeurs predictives negatives et positives proches du scanner avec injection.(64,65)

L'intérêt de ce type d'imagerie est l'absence de radiations ionisantes et d'injection de produits de contraste. Ainsi la répétition des examens a pu se faire sans difficultés. Nous n'avons à déplorer aucun décès lies à l' examen. L'ARM nous a permis de confirmer la perméabilité des implants sur des implants d'un diamètre de 1.8 mm, avec un diagnostic fiable avec 3 observateurs. Au delà, l'ARM en temps de vol a permis la visualisation de l'artère de la queue du rat et de vaisseaux iliaques et fémoraux qui mesurent entre 0.3 et 0.8 mm .(66,67)De plus l'ARM se prête très bien à l'étude de prothèses en PVA car ce matériel a été utilisé comme fantôme(68,69) pour simuler les artères de petits calibres du fait de leur propriétés proches des vaisseaux organiques et à leur bonne visualisation par IRM.

La séquence TOF, d'après Gebhardt et al (70) est plus adaptée que d'autres séquences, comme 2D RARE sur le suivi de greffes aortiques hétéro et iso-géniques sur une série de 22 animaux (souris).

L'application de l'ARM à la cartographie des perforantes (70–72)est connu depuis longtemps afin d'éviter les radiations ionisantes mais nécessite tout de même l'injection de gadolinium, produit de contraste pour lequel il y a 2 à 4% de complications(73)(74)(75,76): des réactions allergiques, une néphrotoxicité et à stade ultime, une fibrose rénale systémique.

L'ARM en temps de vol, exclut les flux lents, et on ne visualise au total, que des vaisseaux fonctionnels.

Application humaine

Dans le cadre d'une reconstruction mammaire par lambeau libre perforant de type DIEP (Deep Inferior Epigastric Perforator flap), nous avons proposé à une de nos patientes de bénéficier de cet examen pour voir la faisabilité de celui-ci pour repérer les perforantes issues de l'artère épigastrique inférieure profonde.

Nous avons avisé le CPP de Paris VI, qui a accepté le principe de cette étude pilote.

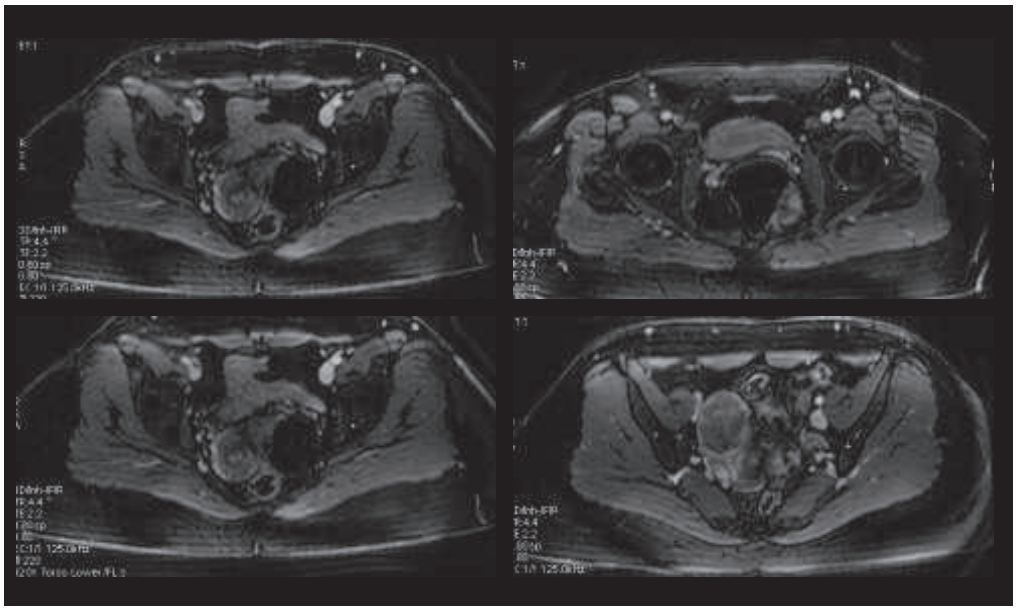


Figure 14 : Cliché d'ARM en temps de vol, en vue de lambeau libre micro-anastomosé DIEP. Repérage d'une perforante cutanée issue de l'artère épigastrique inférieure profonde reperée par une flèche bleue.

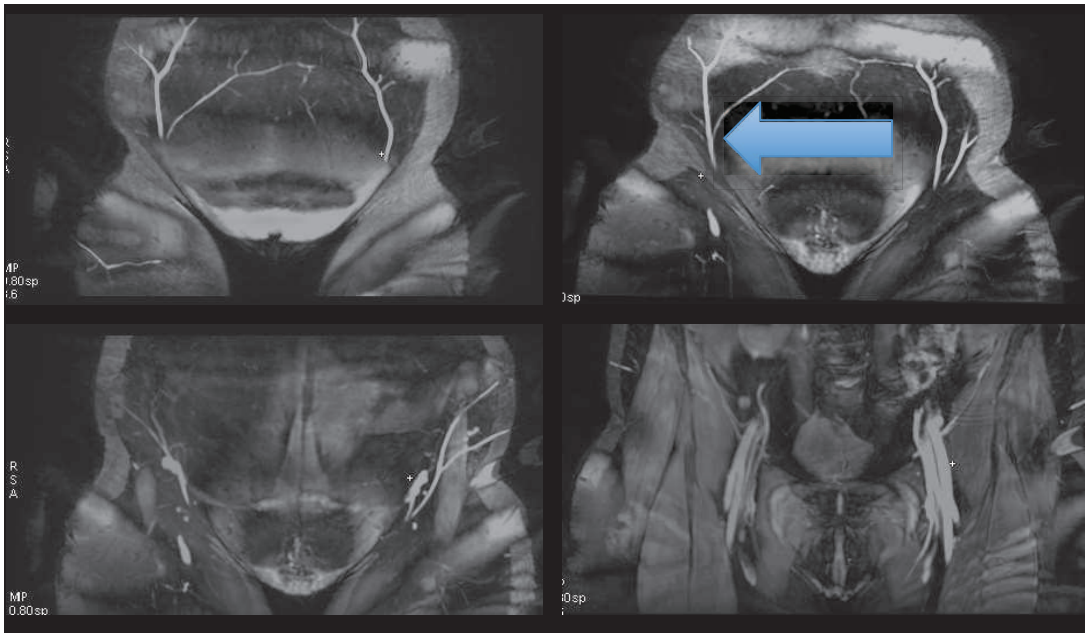


Figure 14 : ARM en temps de vol montrant l'arborisation dans le muscle de l'artère épigastrique inférieure profonde.(Flèche)

Nous avions déjà réalisé l'angio-TDM de la patiente, et lorsque nous avons l'ARM, nous avons constaté une concordance sur les informations apportées :

Nombre de perforantes, type d'arborisation dans le muscle, diamètre des perforantes, et meilleurs perforantes et trajet intra-musculaire. Selon Phalla OU, qui a interprété cet examen, la difficulté était liée au mouvement respiratoire. L'intervention chirurgicale, s'est déroulée correctement et nous avons pu confirmer la topographie et le diamètre des perforantes.

Ce cas présenté est le premier dans la littérature utilisant cette méthode de « mapping » par l'ARM en temps de vol, des perforantes dans le cadre de la reconstruction mammaire par lambeau DIEP.

Nous souhaiterions développer ce type d'exploration, d'après notre expérience sur les travaux sur le petit animal, et ce premier résultat est encourageant dans le cadre d'une étude pilote plus importante. Une etude comparative sera la bienvenue, avec les données du scanner avec injection car celui-ci reste l'examen de référence.

III) Enhancing the permeability of polyvinylalcohol based, microvascular implants, for small vessels remplacement with PVA heparin and PVA gelatin .

ABSTRACT: Poly (vinyl alcohol) (PVA) is an attractive synthetic polymer for vascular replacement due to the combination of properties such as its availability, biocompatibility, absence of toxicity and biodegradability. Ideal materials would prevent thrombosis and intimal hyperplasia by displaying hemo-compatibility and mechanical properties close to those of native vessels. Our team previously described a chemically cross-linked PVA scaffold which displayed outstanding mechanical properties (47,62). Although, PVA is too hydrophilic to support endothelial cell adhesion and the absence of luminal, endothelial cells might impair the long-term patency of this type of vascular graft. Indeed, endothelialization of bypass grafts is considered as a protective mechanism where the endothelial cells and the biochemical factors they secrete would exert favorable responses, including preventing platelet adhesion, lipid deposition and smooth muscle cell proliferation. PVA hydrogels modified by incorporation of heparin and gelatin (FDA-approved natural biomolecules) have been studied here. Each group was compared to pure PVA tubes. Analyses, including scanning electronic microscopy, mechanical testing, suture retention, and platelet adhesion were conducted to characterize the surface properties and the physical behavior of the materials. With a patency rate of 75 % at 1 month in rat, PVA/gelatin (99:1, w/w) appeared to be superior to other hybrids hydrogels. This is a promising material in order to improve endothelial cell attachment and thus to insure in situ endothelialization with very good biomechanical properties. Hybrids PVA/gelatin tubes are candidates to enhance permeability of vascular implants.

INTRODUCTION

Poly (vinyl alcohol) (PVA) is an attractive synthetic polymer due to the combination of properties(77) such as its availability, biocompatibility, absence of toxicity and biodegradability. It has been described as an ideal material for many applications for replacement of the cornea (63) cartilage(78)(79) ,tendon (80)skin, cardiac valve(81)wa and small artery(28,29)(82). Vascular materials should prevent thrombosis and intimal hyperplasia by displaying hemocompatibility and mechanical properties close to those of native vessels. Our team previously described a chemically crosslinked PVA scaffold which displayed outstanding mechanical properties. Although, PVA is too hydrophilic, to support endothelial cell adhesion and the absence of luminal, endothelial cells might impair the long-term patency of this type of vascular graft. Indeed, endothelialization of bypass grafts is considered as a protective mechanism where the endothelial cells and the biochemical factors they secrete would exert a range of favorable responses, including preventing platelet adhesion, lipid deposition and smooth muscle cells proliferation. In this study two type of modifications of the PVA have been studied: PVA/heparin blend tube and PVA /gelatin blend tubes. Indeed in situ endothelialization required cell adhesion and growth. Gelatin is a natural polymer, and the main constituentof connective tissues in humans and animals processed from collagen, retains the property to bind to integrins on the attaching cell surfaces. Gelatin exposes the Arg-Gly-Asp (RGD) cell recognition signal and, by that , allows the cell-membrane bound integrins to bind. Each group were compared to pure PVA tubes. Extensive analyses, including scanning electronic microscopy, mechanical testing, suture retention, and platelet adhesion were conducted to characterize the surface properties and the physical behavior of the materials.

2) MATERIALS AND METHODS

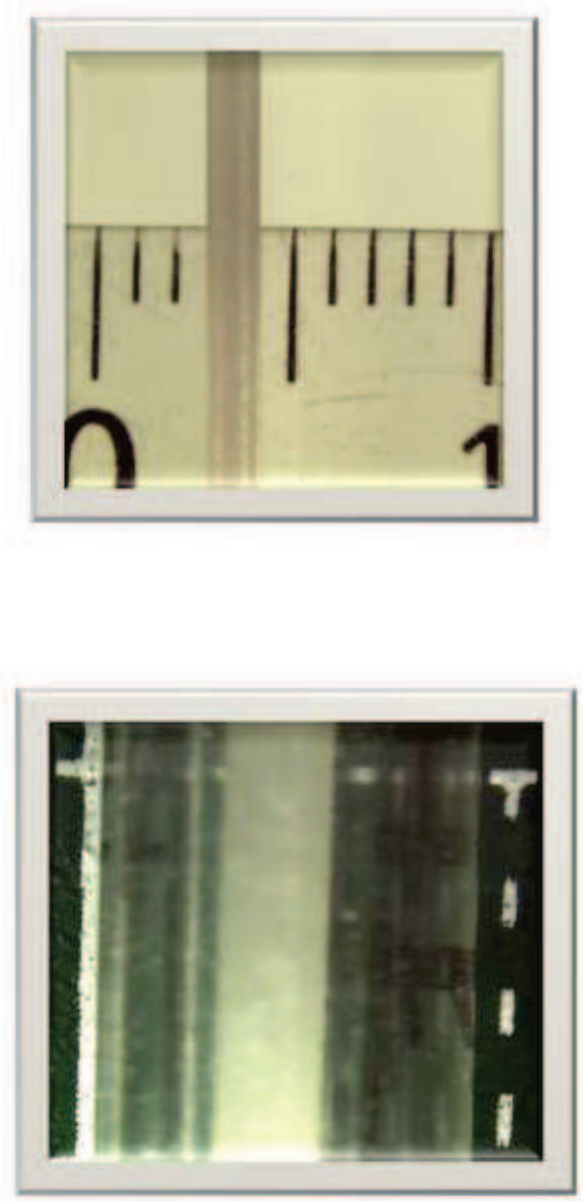
2.1 PVA and PVA/ gelatin, PVA heparin tube preparation

Hydrogels were prepared using a chemical crosslinking process described in our previous publication. Poly (vinyl alcohol) (PVA, Mw 84-124 kDa, saponification degree > 99.9%) and gelatin type B from bovine skin were dissolved in water under stirring at 90°C for 3 h. Blends were prepared with PVA and gelatin ratios set at 100:0 (PVA), 99:1, 99.5:0.5; 97.5:2.5 (w/w) and labeled PGX (X referring to the gelatin wt%). The solution was cooled down to room temperature. Nine grams were mixed with 750 µL of 15% (w/v) sodium trimetaphosphate (STMP) and 300 µL of 30% (w/v) sodium hydroxide progressively, and under constant agitation. To avoid air bubbles, the blend was centrifuged (4300 rpm for 10 min). The PVA and PVA gelatin solutions were cast in a mold centered by a rod (from an EPPENDORF combitip 0.1 ml) and centered with a silicon cap and stored at -80C for 15min for gelation. The mold was taken out when the material is in a jelly state and ready for a lyophilization process, which starts after 5 minutes at the room temperature, necessary to take out the mold, and to have the tube in a solid state centered by the rod.

The lyophilization process is conducted as follow: -Freezing cycle (A cooling phase to reach -20 °C for 5h30 - 0.1 °C/mn; A stationary phase of 1h30 at – 20°C); Primary Lyophilization: 0.050mbar (-18°C reached in 4min , rate + 0.5°C/min; - 5°C in 2h 10 min ,rate + 0.1°C/mn; a steady state of 8h00 , -5°C; 10°C reached in 1h15 , +0.2 °C/mn).

After one cycle of this lyophilization process, tubes were immerged in Phosphate Buffer

Solution (PBS) for 10 min in agitation and taken out from the rod(Figure 1) and cut in 1cm of length. Each tube was kept in PBS for 48 h to 15 days, prior to testing or implantation at 4°C. The rod measures 1.2 mm and the outer diameter of the mold 4 mm, the inner diameter 2 mm .



F

Figure1 : top) the rod which centered the implant, bottom) : the rod and mold. The PVA gel is injected in space between the two. The white square measures 5mm

2.2 Surgical protocol

In Vivo Implantation

The procedure and the animal care complied with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research. All rats were kept in with a 12-hour light/ dark cycle with a regular regimen. The studies were carried out under authorization number 006235 of the Ministere de l'Agriculture, France. Two seniors surgeons and 1 junior surgeon performed the implantations. Each surgeon was trained to get minimal hematoma and complication and to be able to perform with PVA tubes, more than 50% of patent anastomosis at one week controlled by Doppler Ultrasound. For this work, six groups of rats were tested with a blinded method for the type of implant, for a total of 62 rats. The surgeon was not aware of the type of vascular implant, which appears micro and macrospically identical. The histologist and the person in charge of the imaging were blinded too for the type of implant studied. PVA and hybrids microvascular implant, consisted in tubular grafts of 10 mm length, 2 mm in diameter, and were implanted into the abdominal aorta of adult male Wistar rats (mean weight 618g ;452-815). Rats were anesthetized with sodium pentobarbital intra-peritoneally (5 mg/100 g body wt.). In aseptic conditions, under an operating microscope and through a midline. laparotomy, the infrarenal aorta was exposed and aortic branches in this segment were ligated with 9/0 monofilament nylon sutures. A 10 mm segment of the infrarenal aorta was transected, and replaced by the PVA tubular grafts with end-to-end interrupted anastomosis using 10/0 Ethilon, sutures. The number of stitches used for each anastomosis ranged from 12 to 14. The mean ischemia time was 37–67 min. The graft patency was visually confirmed after anastomosis. Neither anticoagulants nor antiplatelet were administered post-surgery. We performed a first row of implantations, to evaluate the permeability at day 7. Permeability rate were evaluated by doppler ultrasound, for a

longer follow up with 3 to 4 rats per group each time period: graft permeability was assessed by angiography, doppler ultrasound or magnetic resonance angiography 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks. The rats were monitored daily for any signs of pain or disability and sacrificed at day post-surgery at various times, 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks.

2.3 Imaging

Ultrasound and Doppler non-invasive imaging (PowerVisions 6000 with Ultrasound Image Workstation 300A, Toshiba, Japan) were performed with a 14 MHz probe at day 7, and 8, 12 weeks. The animals were sacrificed to check the microvascular implant patency and to evaluate the graft luminal diameter. In two cases, an angiography was performed before sacrifice by injection of 1 mL of contrast agent, Hexabrix 320 (Guerbet, France) through the catheterised thoracic aorta and the blood flow was assessed using a Philips BV Endura device (Amsterdam, the Netherlands). 3D Time of Flight Magnetic Resonance Angiography was applied to evaluate implant mermeability. It has the great advantage to avoid ionizing radiation and the use of any vessel catheter. The diameter of the abdominal aorta of a rat is about 2mm, which is compatible with the use of this technique. The patency of the implants was assessed by this specific sequence with the Radiology department of X Bichat Hospital in Paris.

2.4 Explantation, tissue processing and histology

Histochemical and immunohistochemical analysis

The animals were then sacrificed to check the graft patency in parallel with imaging methods. Under general anesthesia, the aorta was clamped to permit the harvesting of 3mm above and under the vascular implant immediately after a rinsing the whole with saline 0.9% without any effraction of the lumen of the tube.

FIGURE: Implant after 2 months of implantation, 3mm of aorta are taken above and below the implant.

Microvascular implants, were then fixed in a 4% paraformaldehyde solution before being embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature compound) and frozen in isopentane cooled trhough a liquid nitrogen bath. Six microns-thick frozen transverse sections of the grafts in the middle of the tube for most tube, as well as longitudinal sections of the explant by a microtome. Sections of scaffolds and tissue environment were stained with hematoxylin/eosin, and digital photos were taken using phase contrast microscopy with high-resolution camera (OLYMPUS CK40, Å~100 and Å~400 magnification). Endothelial cells were stained with RECA1 (1:100, Serotec MCA970)) revealed by Alexa fluor 594 goat anti mouse (1:100, A11005 Invitrogen, Cergy-Pontoise, France.) Smooth muscle cells were stained with rabbit α-smooth muscle actin (Ab5694, 2 µg/mL, AbCam, France) revealed by Alexa-488 conjugated secondary antibody (A11034, dilution 1/50, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Nuclei were stained with DAPI (Sigma, 1:10000). Negative control sections were incubated with the secondary or isotypes antibodies from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Representative immunofluorescence photomicrographs were taken using a Leica DMRXA microscope (Leica Microsystems).

2.5 Tubes properties and material characterization

Suture retention / Burst Pressure/Compliance

Mechanical properties, such as compliance, burst pressure and suture retention, were also determined (n = 5). To measure the suture-retention strength, we pulled a single throw of 6/0 Prolene suture (Ethicon) through the tubes samples one to two mm from the free edge, and progressively increased the weight (gram force) until rupture. The burst pressure was evaluated by increasing the hydrostatic pressure within the tube from a carbon dioxide tank until failure, and the burst pressure was recorded from the tank gauge (n =6) and the value was recorded from the tank gauge. Compliance (C) was defined as the inverse of Peterson's elastic modulus and calculated on tubular samples by measuring the change in diameter while varying the pressure within the tube: C = (d120 – d80) / d80 where d80 and d120 are the diameters of the tube at the pressure of 80 and 120 mmHg, respectively.

Mechanical Properties

Young's modulus was calculated from stress–strain curves .; $\sigma x = E.\varepsilon x = E\ \Delta L/L0 = E\ (L- L0)/ L0$; L :Length, L0 Initial length; E : Young Modulus

Two types of measures have been done:

-Implants based on PVA and PVA gelatin at room temperature, not in a liquid condition.

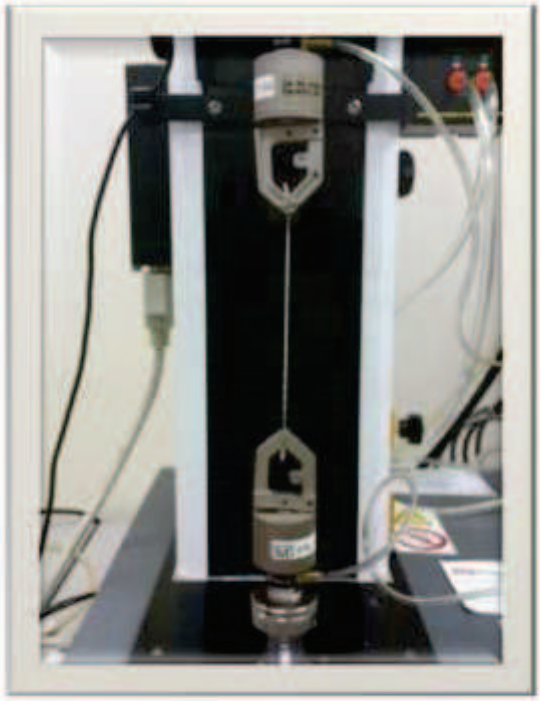


Figure 2; Instron, Uniaxial testing machine used for PVA Gelatin and PVA bases implants.

The tensile properties of the films were measured using a uniaxial tensile testing machine (Instron 3745 , Figure 2)above equipped with a 10 N load cell and a crosshead speed of 10 mm/min under standard room conditions. Samples of 20 mm - 3 5 mm (length 3 width) were mounted onto pneumatic grips and stretched to failure. Force versus elongation data were recorded and the stress–strain plots were generated. Values of the stress and elongation at break were an average of 5 separate measurements tested (N=4)

PVA , PVA gelatin based implants of different ages(time between fabrication and testing or implanataion) have been tested with this apparel.

The tensile properties of tubular PVA and PVA- 1% gelatin PVA were characterized using a uniaxial tensile testing machine (Electriforce apparatus, Bose) equipped with a

liquid chamber (NaCl 9% -35°C) and 20 Newton Cell force. Samples of 1cm length were tested fully immersed. The tubular samples were mounted with a 6-7 mm length between clamps and attention was paid to not trap any air bubbles in the lumen of the implant.. Elastic modulus (EM) measurements were measured with uniaxial tensile tests and were replicated minimum 4 times for each type of tube with a minimal number of samples per type= 4 and all tests were videos recorded. The tensile properties of tubular PVA and PVA-gelatin samples were characterized using a uniaxial tensile testing machine (Electroforce® apparatus, Bose) equipped with a liquid chamber and 20N cell force. Samples were tested fully immersed in physiological serum at 35°C.

The tubular samples were mounted with a 6-7 mm length between clamps and attention was paid not to trap air bubbles in the lumen of the tubes. The length at rest, L0, was defined by applying a slight preloading to 0.04N prior to testing. For each sample, a displacement controlled sinusoidal stretching was applied for 600cycles at 2Hz (in vivo pulse rate can range from

0.7 to 3 Hz) between 0 and 60% of L0. Measurements were repeated on 4 different samples for each sample type. The results are an expression of the stiffness. The stiffness is expressed in N/Unit of elongation. To obtain the young modulus, the measure has to be divided by the surface of the outer diameter minus surface of the inner diameter. In our case this factor is 1.00008. We could assume that the stiffness curve are a good reflect of the Young modulus.

$\sigma x = E.\varepsilon x = E\ \Delta L/L0 = E\ (L- L0)/\ L0$; L :Length; L0 Initial length; E : Young Modulus

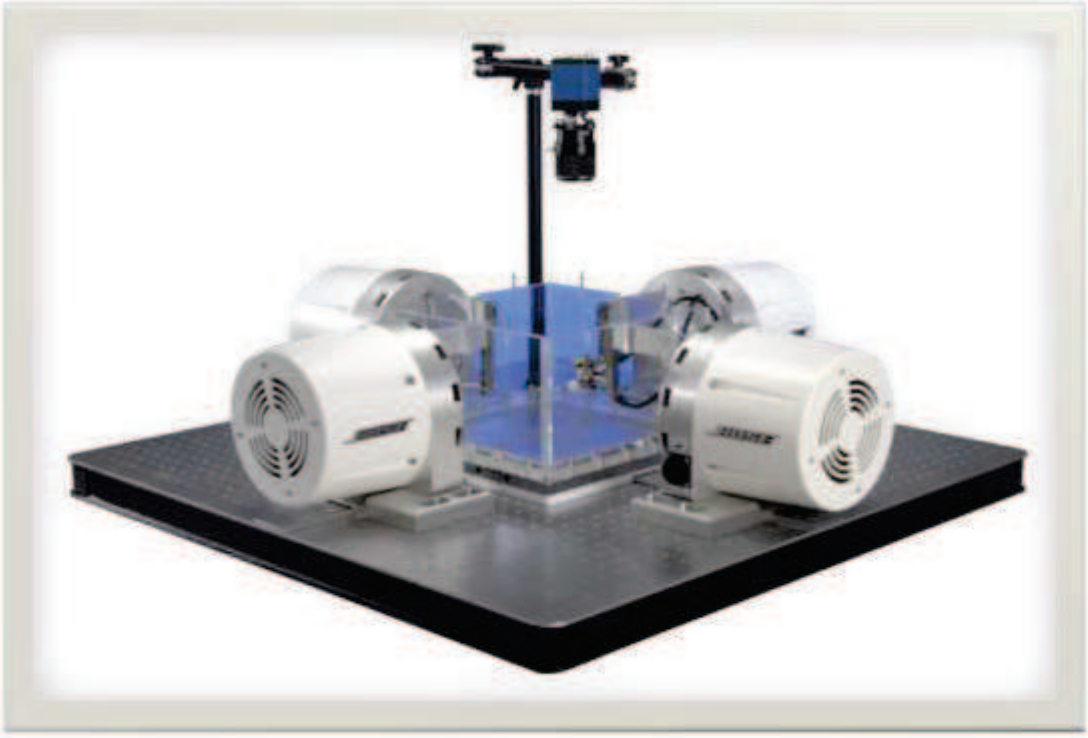
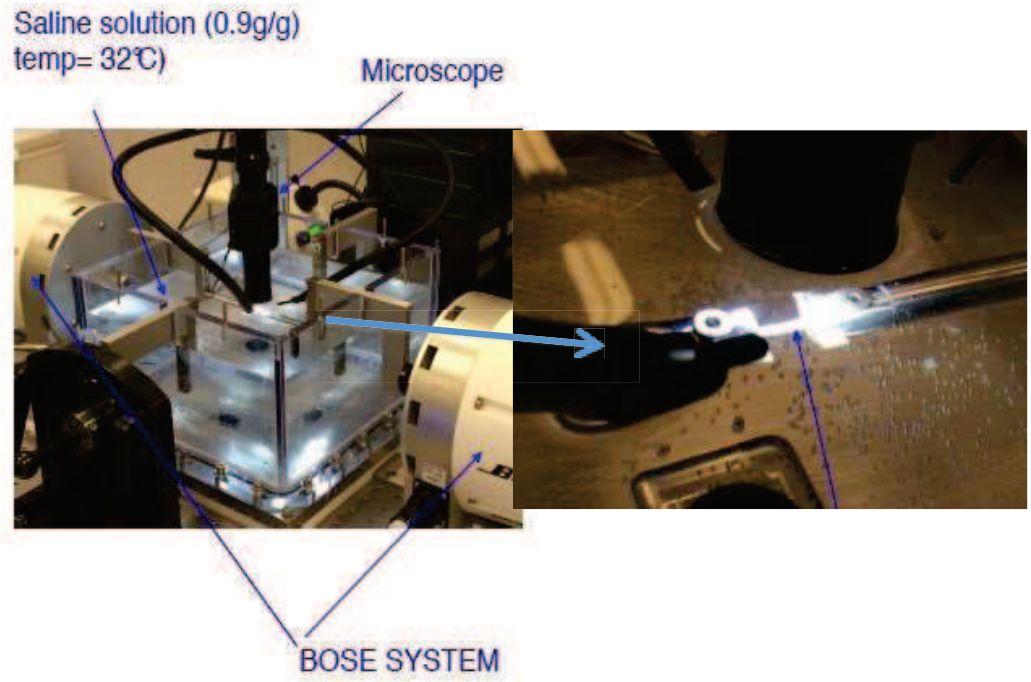


Figure 3 A,B: Bose, uniaxial Tensile machine, with the liquid chambers



2.6 Water content, heparin and gelatin release

Water Content

Hybrid tubes were cut into of 1cm long soaked in water at room temperature until a constant weight was obtained (Wh). Hydrated films were dried at 60°C for 48h then weighted (Wd). Water content (WC) was calculated by the following equation:

$$WC (\%) = (Wh-Wd) / Wh \times 100.$$

Heparin release

Samples of PVA heparin implants (5 mm long) were hydrated and immersed in water (700 .mu.l) at 37 ° C. Supernatants were collected at regular intervals and stored at 4 ° C for analysis. The amount of heparin in the supernatants was quantified according to a protocol with methylene blue. One hundred millimeter of a methylene blue solution (2.5 mM) are added to 650 ml of supernatant. The absorbance of this solution is measured at 631 nm. The absorbences were then normalized to the values of the PVA gels without heparin and compared to a calibration line produced from standard heparin solution.

Gelatin release

Quantification of gelatin using Indirect Competitive ELISA. The test is designed according to the Indirect Competitive ELISA type. It is a variant of the indirect ELISA which allows quantifying a specific antigen by inhibiting the binding of the antibodies to the same antigen immobilized on the wells of an ELISA microtiter plate. Seven PVA Gelatin tubes were placed in glasses flask with 5 ml of PBS for 61 days. Each bath was changed weekly with the same volume of PBS. Each aliquot of PBS was kept at -80 C. The conservation liquid was not changed for 4 tubes. Seven PVA tubes were placed in

glasses flask with 5 ml of PBS. Each bath was changed weekly with the same volume of PBS. Each aliquot of PBS was kept at -80 C.

2.7 Surface characterization

The inner surface (endoluminal) of the tube, morphology was assessed by scanning electronic microscopy (SEM) using a Philips XL 30 ESEM-FEG at an accelerating voltage of 15 keV at a pressure of 4 T. Prior to analysis, samples were freeze-dried for 24h and coated with gold/palladium. Four specimen were tested for each type tube based on PVA, PVA gelatin 0.05%, 1% 2.5, .5% and for PVA gelatin 48h versus 2months old.

2.8 Platelet adhesion

Preparation of blood samples

Static platelet adhesion was measured in vitro using 2 conditions, namely washed platelet suspensions and platelet-rich-plasma (PRP). Blood was harvested, from healthy volunteers into vacuum blood-collection tubes (Vacutainer® system, Beckton Dickinson), containing trisodium citrate acid-citric-dextrose or sodium citrate solutions when using platelet suspensions or PRP, respectively. Washed platelet suspensions and PRP were prepared by centrifugation of the blood, as previously reported.

Platelet adhesion

Platelets were resuspended at a final concentration of 2×10^{8} platelets/mL. PVA and PVA-Gel hybrids tubes were placed in contact with the platelets suspension or PRP at room temperature with rotation for 1 h. Adherent platelets were quantified by assessing the endogenous phosphatase activity using a pNPP buffer (0.1 M citrate, pH 5.4, 0.1% Triton X-100, 5 mm paranitrophenylphosphate). Supernatant absorbance was measured at 405 nm. A calibration curve was generated from a series of dilutions of a known platelet

concentration. BSA-coated and collagen-coated wells were used as negative and positive controls, respectively.

2.9 Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard errors. One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test was used to examine the significance of results between groups. A value of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant. Results are expressed as mean SEM for continuous variables. The unpaired t test was used to compare nonparametric values. The level of significance was set at $p<0.05$.

3) Results

3.1 Macroscopic analysis (Figure 4 ,5,6,7)

The solution of PVA or PVA Gelatin were transparent, as the gel obtained after 15 minutes at -80°C on the its rod. After freeze-drying, macrospically there was no differences between PVA, PVA heparin and PVA gelatin implants.

PVA and PVA gelatin tubes are white and opaque, even in a rehydrated state. They do not collapsed. The mean size (n=8) of the outer diameter is 1.8mm (+- 0.35) and the inner diameter is 1.4mm (+- 0.23). We found no differences between samples over the time. The fabrication process as a tube, give stable results for the size and the aspect.

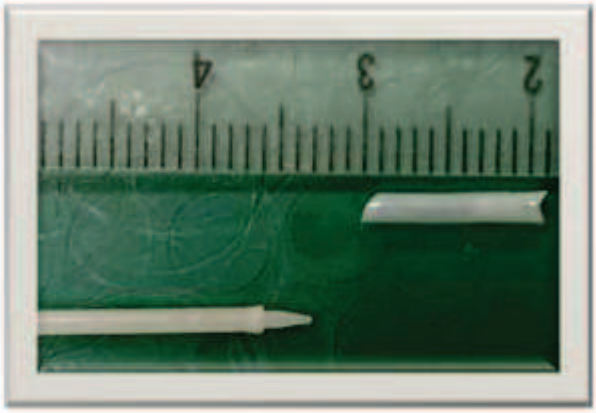


Figure 4: PVA tube

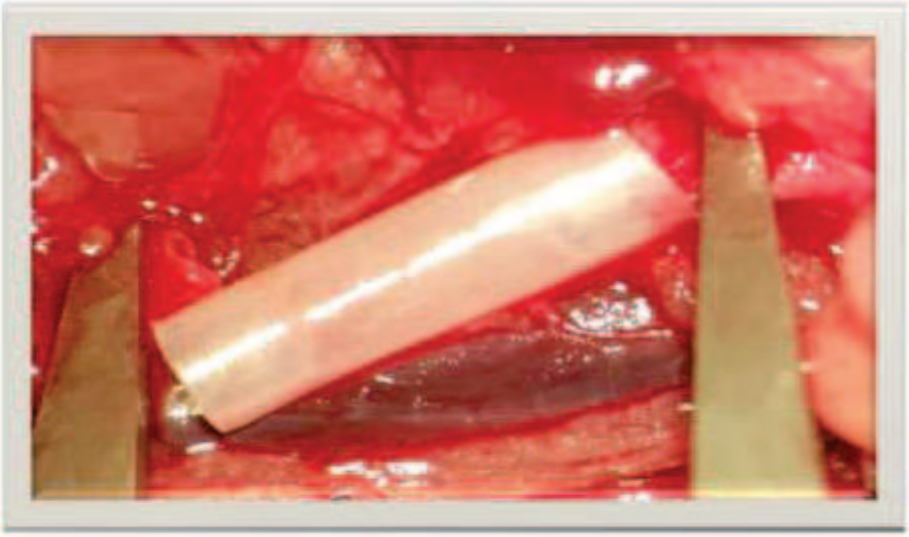


Figure 5: PVA tube of 1cm for the vascular replacement at the level of infra renal of the abdominal aorta. The handling of the graft was easy and the lumen stays, open The needle penetration in the materiel is easy, but more resistant than an healthy arterial wall.

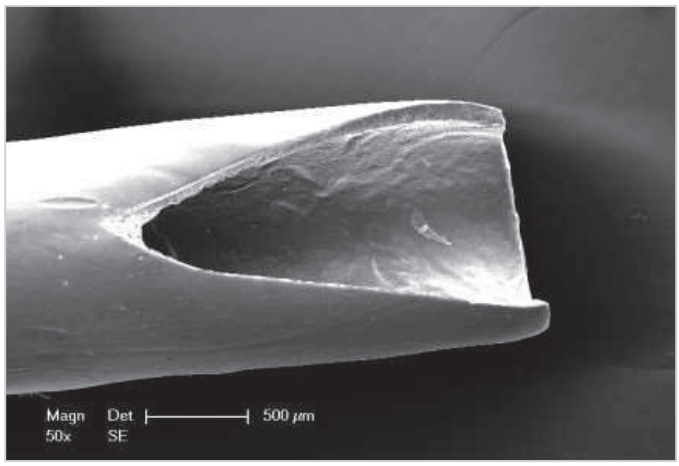


Figure 6 : SEM of a PVA implant

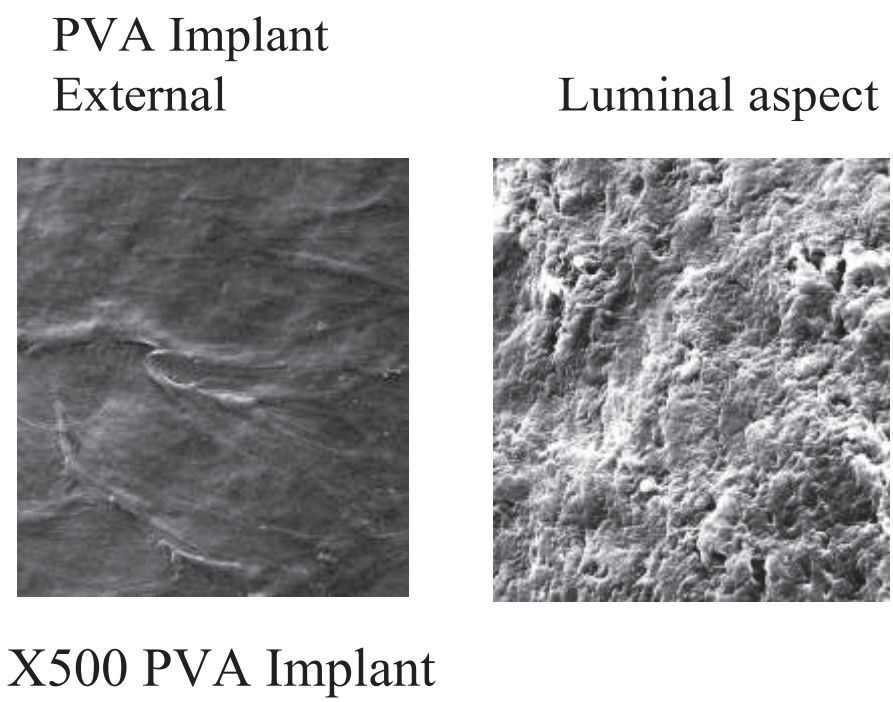
Figure 7; PVA heparin Implant

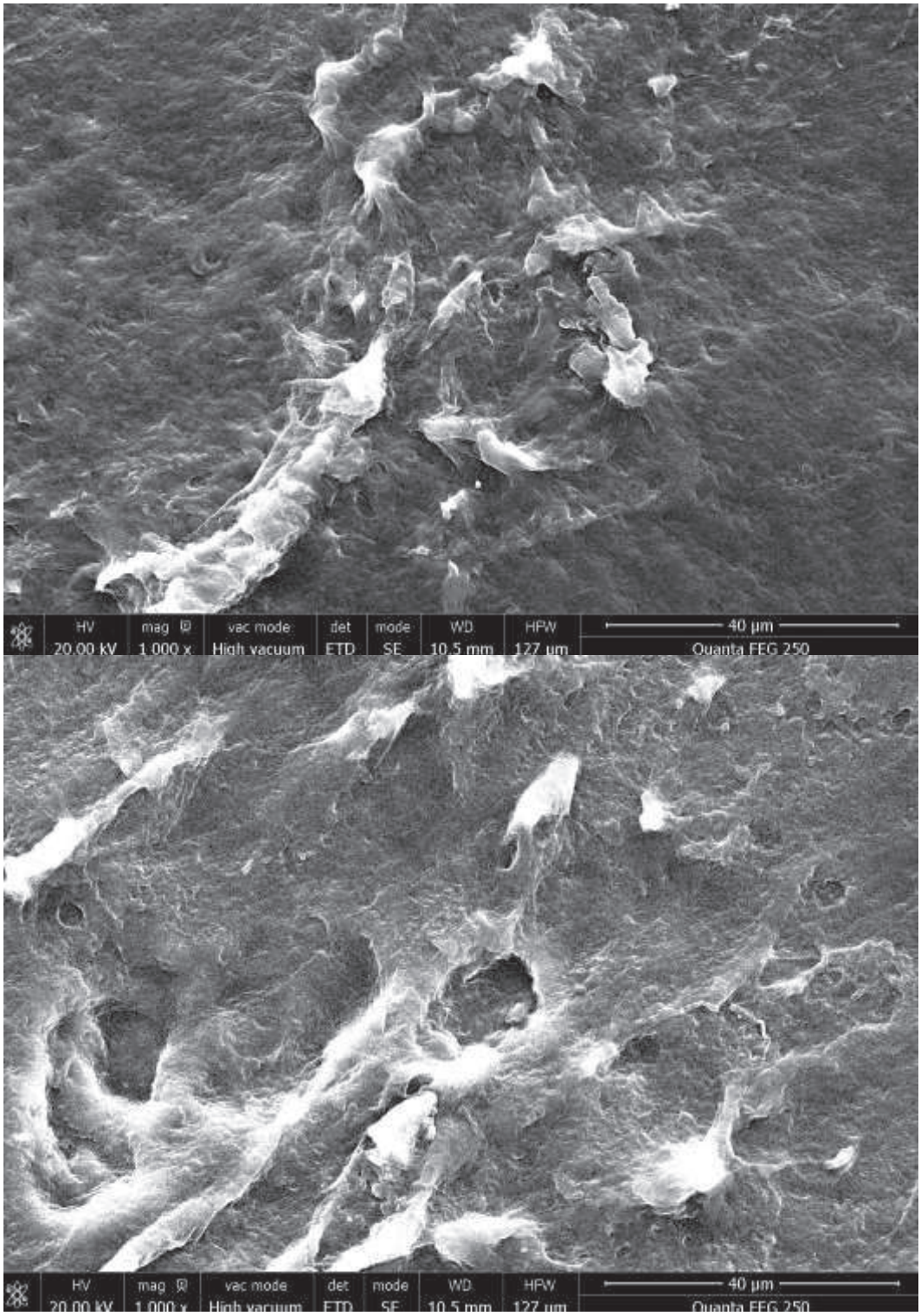
3.2 Surface characterization of the tubes and microstructure (Figure 8)

The external surface of the tubes is smoother than the luminal surface. Microcraters or micropores are seen on the luminal surface, as well as concaves structure of gelatin films with a regular organization for PVA 1% with small micropores (15-30 microns). For 0.05% gelatin content, the texturation is less obvious, in contrast to the 2.5% and 5% formulation where some regions displayed irregular micrometric asperities, shaped as craters or microdomains with diameters varying with gelatin content and with elevated ridges of 100 microns.

For PVA Gelatin 1% there is no change of the luminal texturation after two months with an irregular pores organization with ridges and

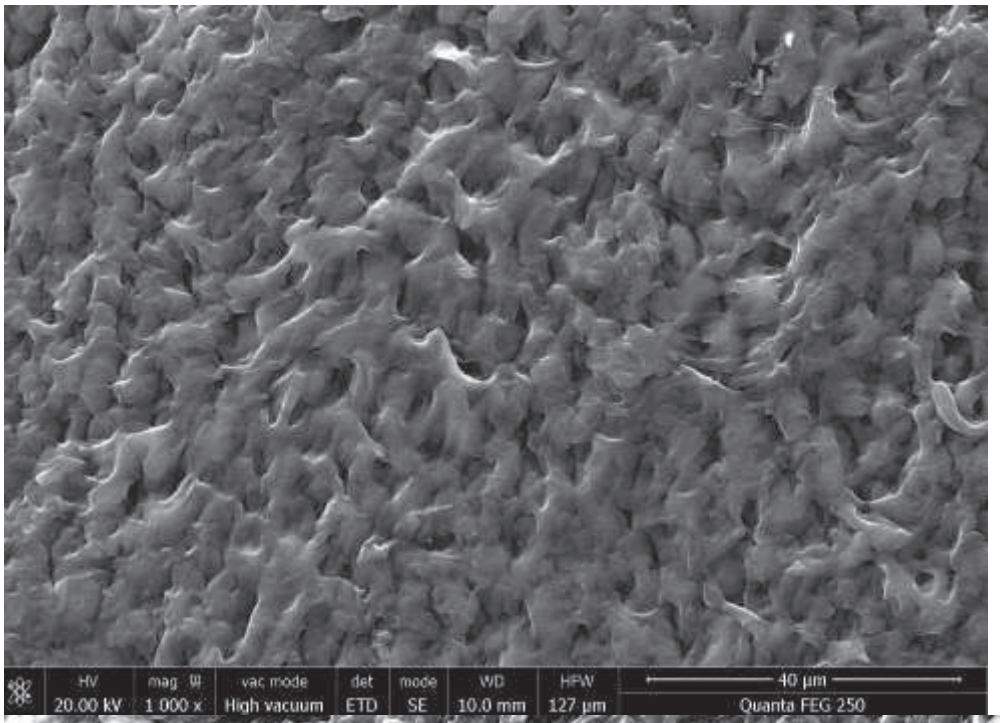
Figure 8:SEM View of the different texturation PVA

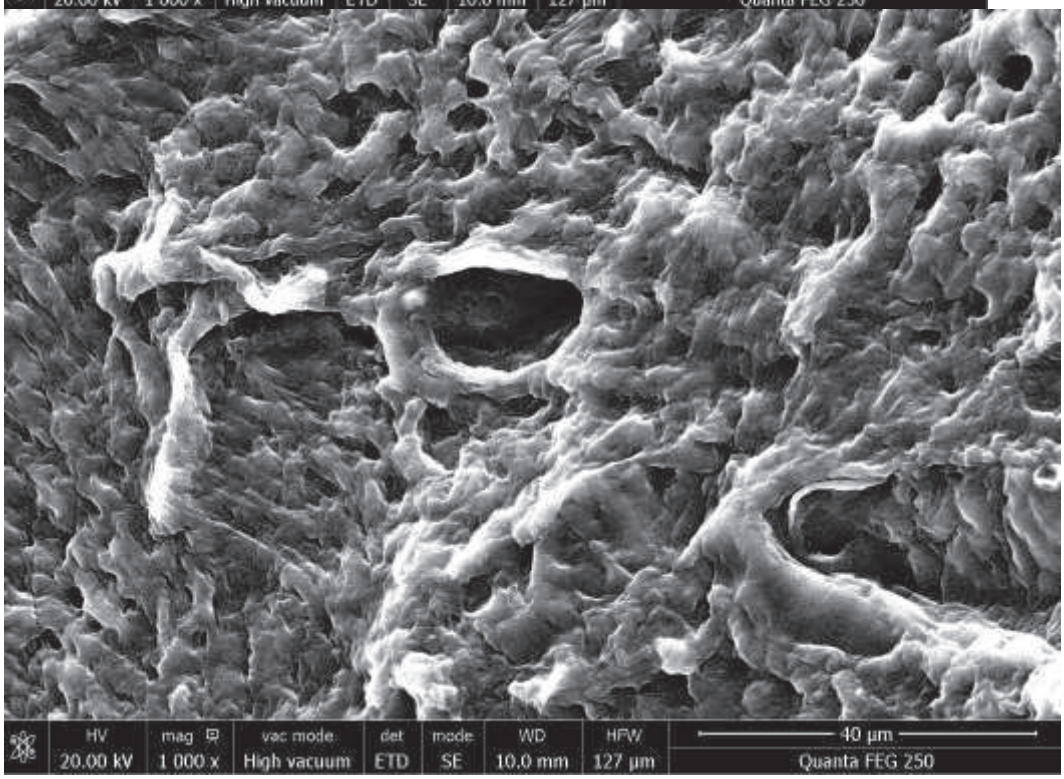


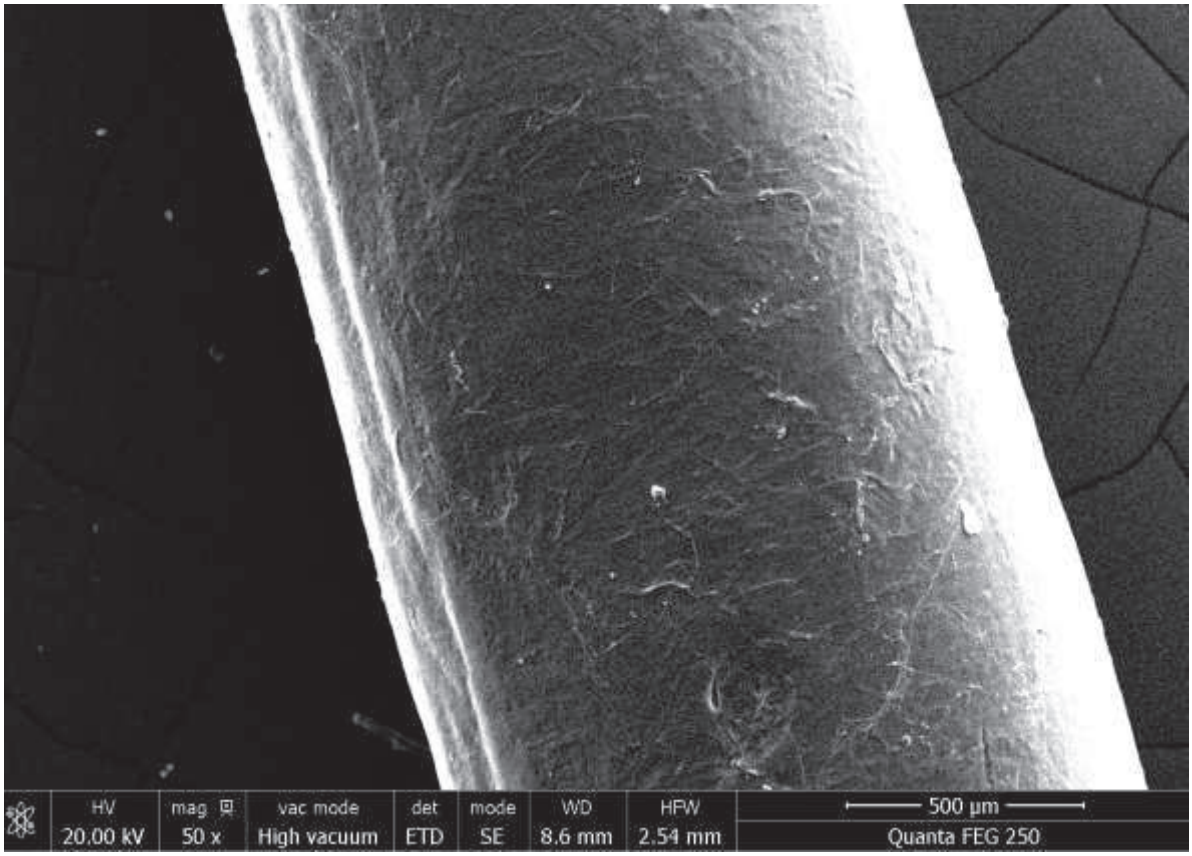


PVA IMPLANT : LUMINAL SURFACE ,is smoother and less accidental, the PVA gelati

LUMINALSURFACE
PVA gelatin(<48h old)

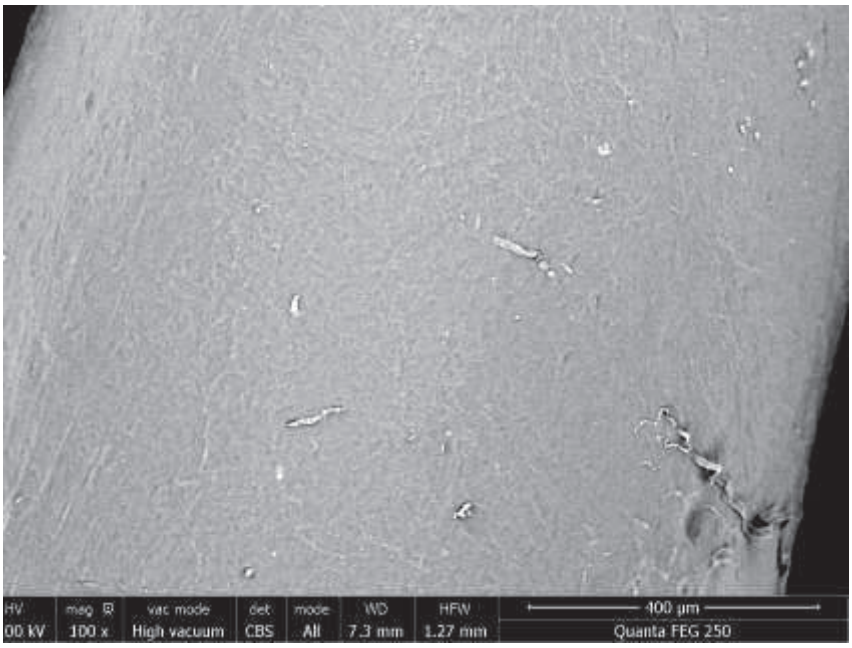




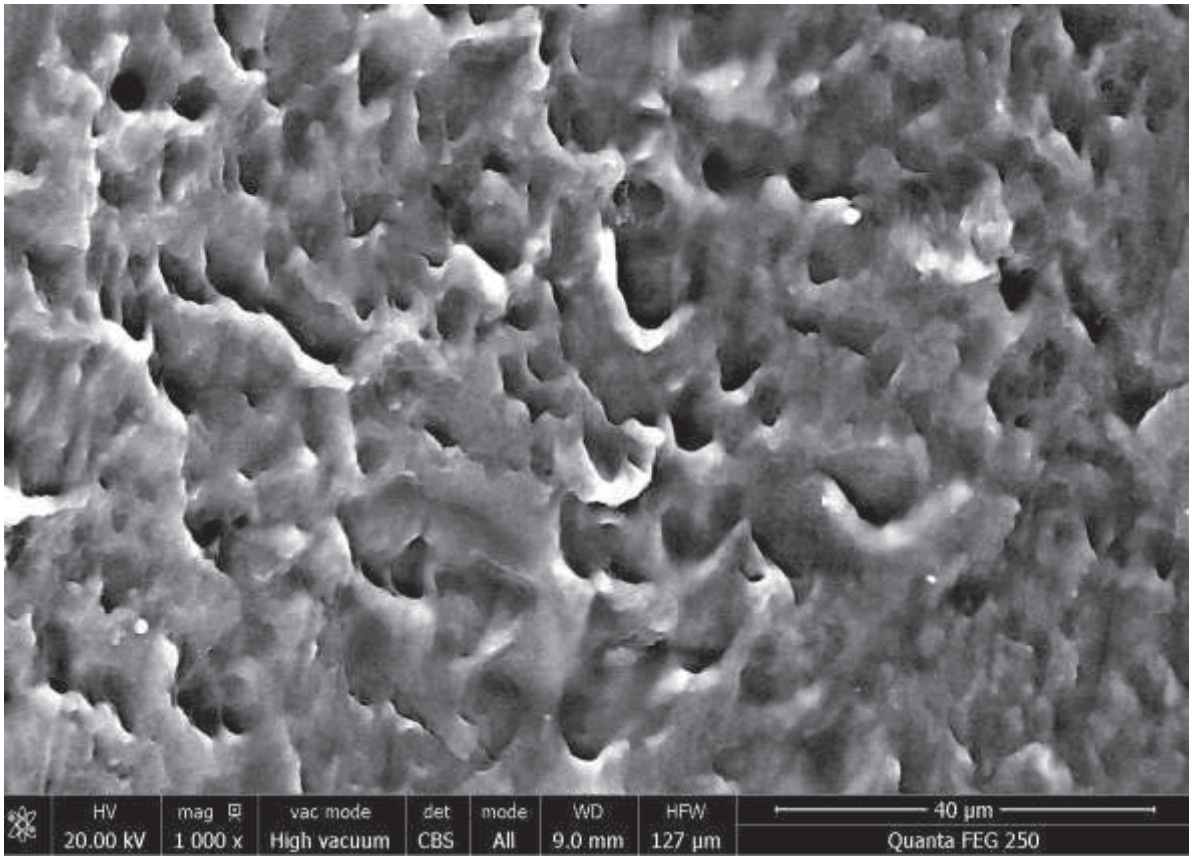


external texturation PVA G1%

PVA gelatin1% (2months old)
External

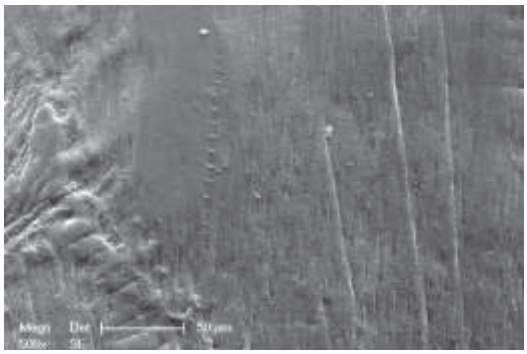


Luminal(right)

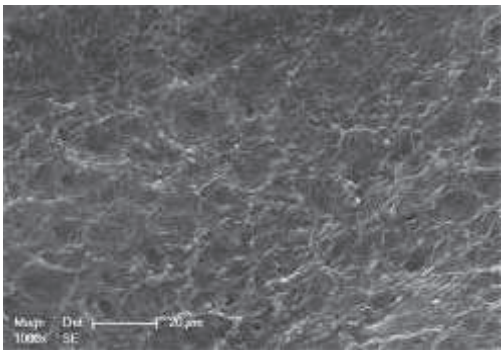


PVA gelatin 0.05%

EXTERNAL SURFACE

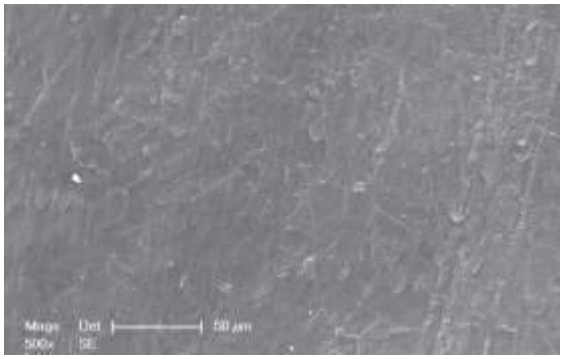


LUMINAL SURFACE

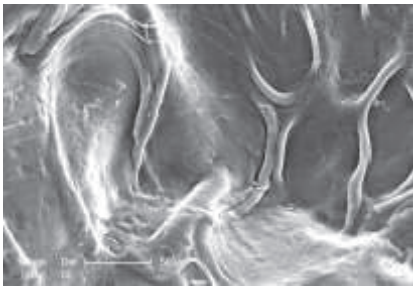


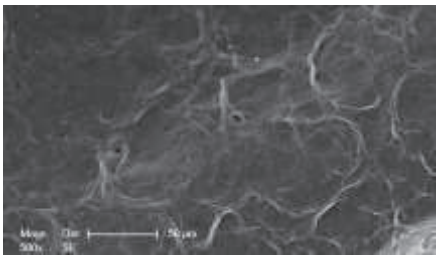
PVA gelatin 2.5%

EXTERNAL SURFACE



LUMINAL SURFACE





PVA Gelatin 5% Luminal Surface

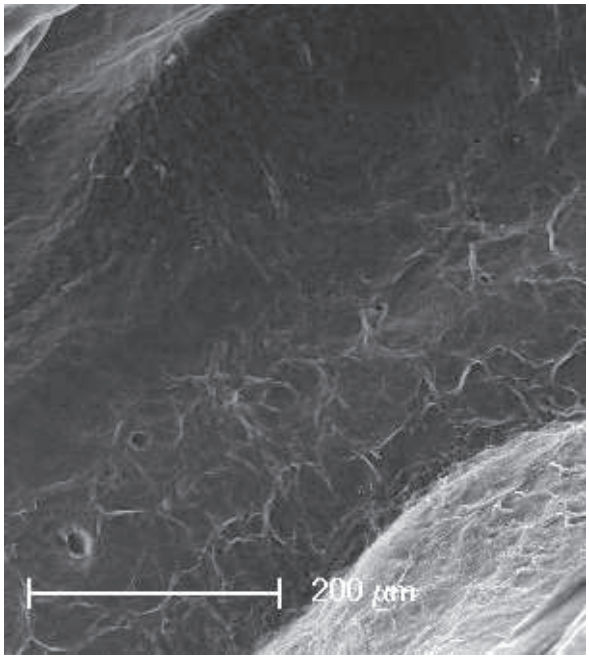


Figure 8: PVA , PVA gelatin evaluation by SEM, of the luminal surface and external surface of micro-implants.

3.4 Mechanical properties

The suture retention of microvascular implants was similar between PVA and PVA gelatin of less of 24h, but significatively higher ($p<0.05$) for PVA Gelatin of 2 months old(table 1) The compliance is higher with gelatin compared to PVA alone but the PVA 1% gelatin of 2months, kept at 37C showed decreased compliance

The burst pressure is lower than natural vessels, and higher for PVA gelatin of 2 months old.

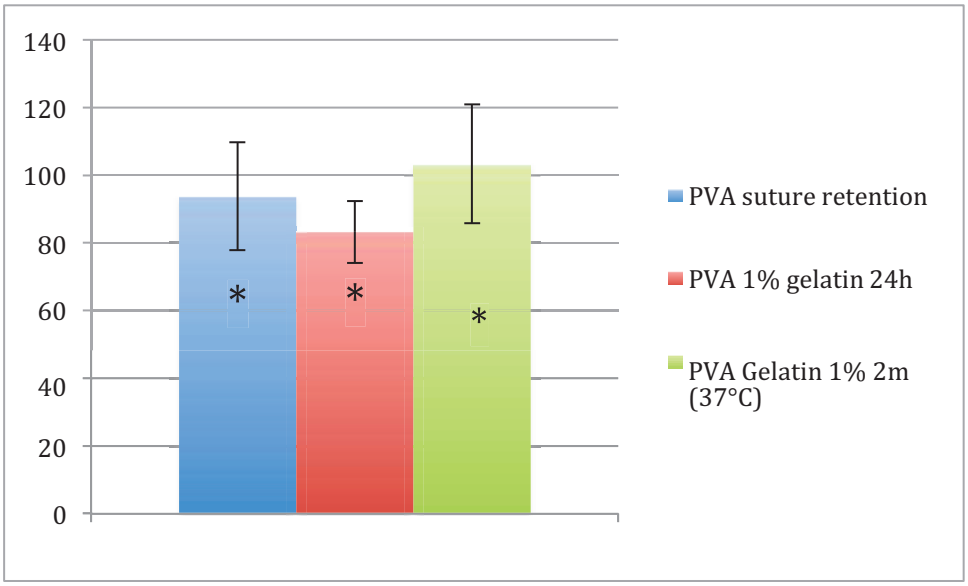


Figure 6: Suture retention of PVA versus PVA gelatin <24h versus PVA gelatin 2months (2m). Results were significatively different*p<0.0

Table 1: Burst pressure, Suture retention and compliance. Results are expressed as mean +-SEM.

	Burst pressure (mmHg) N=6/Tubes Ino et Al(62)		Suture retention (gmf) N=4/Tubes	Compliance(%) N=5 tubes
PVA	**703±17**	**673±27**	**93,06 ± 3,76**	**2,92 ± 0,4** p=0.004
PVA GEL 1%	**614±21**	**544±25**	**83,26 ± 5,93**	**3.9 ± 0.4** p<0.05
PVA GEL 1% 2 MONTHS 37C°	**802±21**	**N/A**	**103,98 ± 8,73**	**3,3±1.4** p < 0.05
RAT ABDOMINAL AORTA	**> 3000**		**6.4+-0.4**	**6.4± 0,4**
HUMAN INTERNAL MAMMARY ARTERY	**2031-4225**		**4.5- 6.2**	**4,5-6,2**
HUMAN SAPHENOUS VEIN	**1680-2273**		**0.7-1.5**	**0,7-1.15**
HUMAN UMBILICUS VEIN	**969.7**		**…**	**…**

Evaluation of the Elastic Modulus

We tested our specimens through 2 ways :

- a uniaxial tensile testing machine tested in “dry” condition : the mean elastic modulus was : 1.026+-0.086 for PVA gelatin1%, and 1.14+-0.11 for PVA(figure 9A,B,C)
- a uniaxial tensile testing machine (Electriforce apparatus, Bose) immersed with a liquid chamber (wet conditions)

We observe a trend of an decrease of the Elastic modulus with the Gelatin content, except for PVA 0.05% which is close to pure PVA (figure 13). In parallel , the strain at failure value, is proportional to the ratio of gelatin : PVA 5% gelatin implants : 41.75%+- 10 versus 28.5% for PVA 1% gelatin specimen.

Figure 9A: exemple of Young modulus, of a PVA 5%.

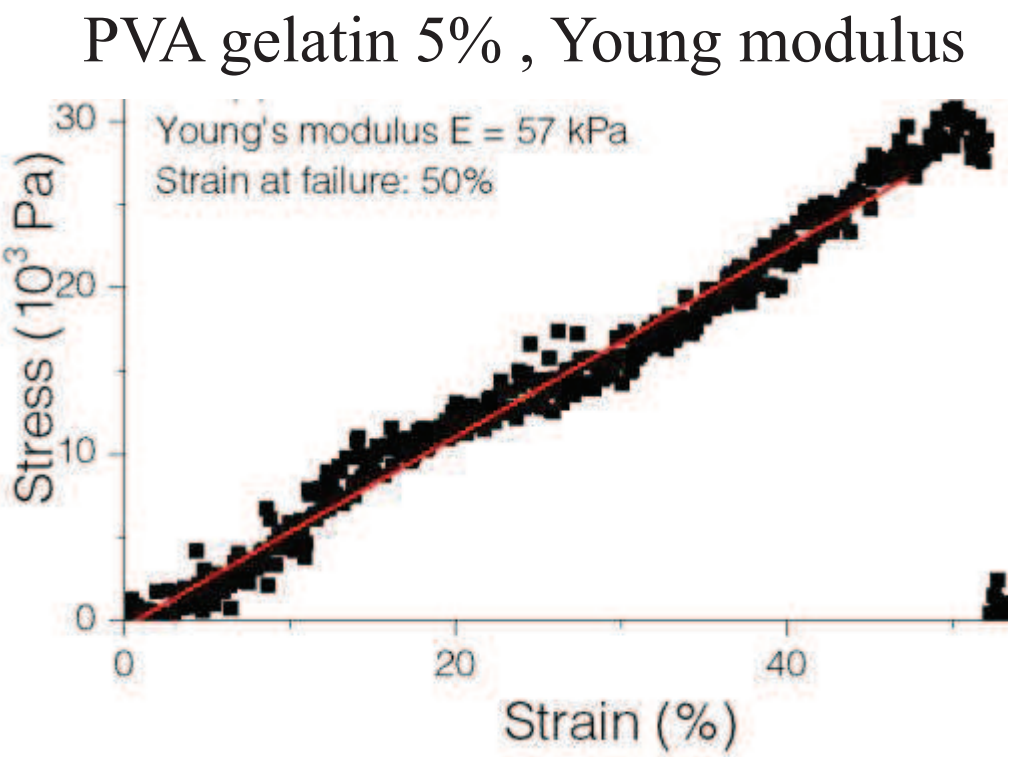


Figure 9B: Exemple of Young's modulus, of PVA 1%

PVA gelatin 1%

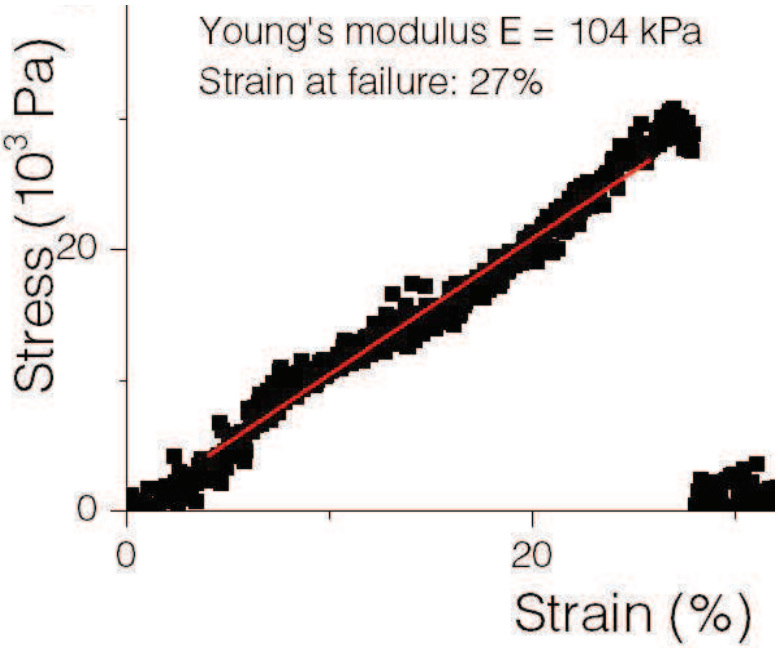
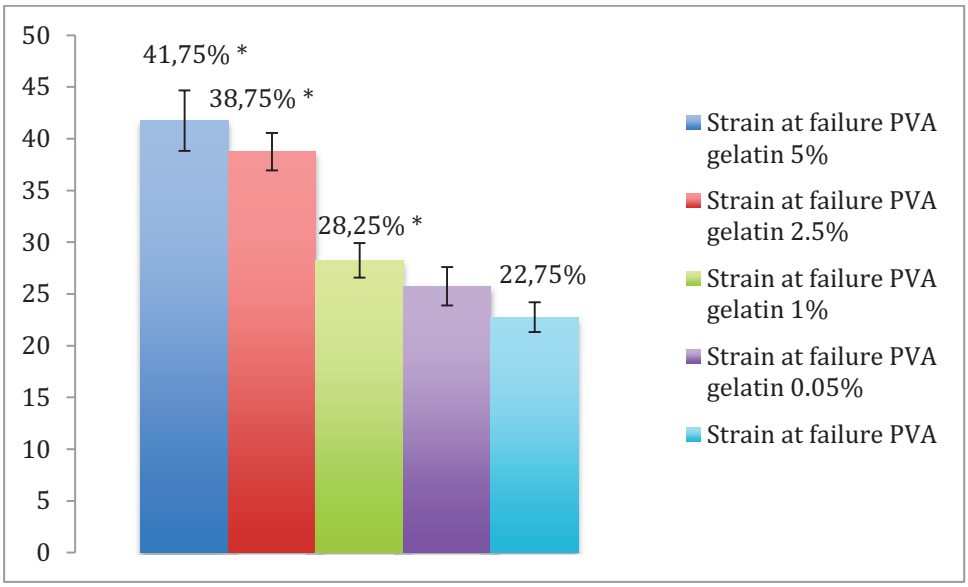


Figure 9C: Strain at failure in% of initial length ,for various ratio of PVA.* indicates signific



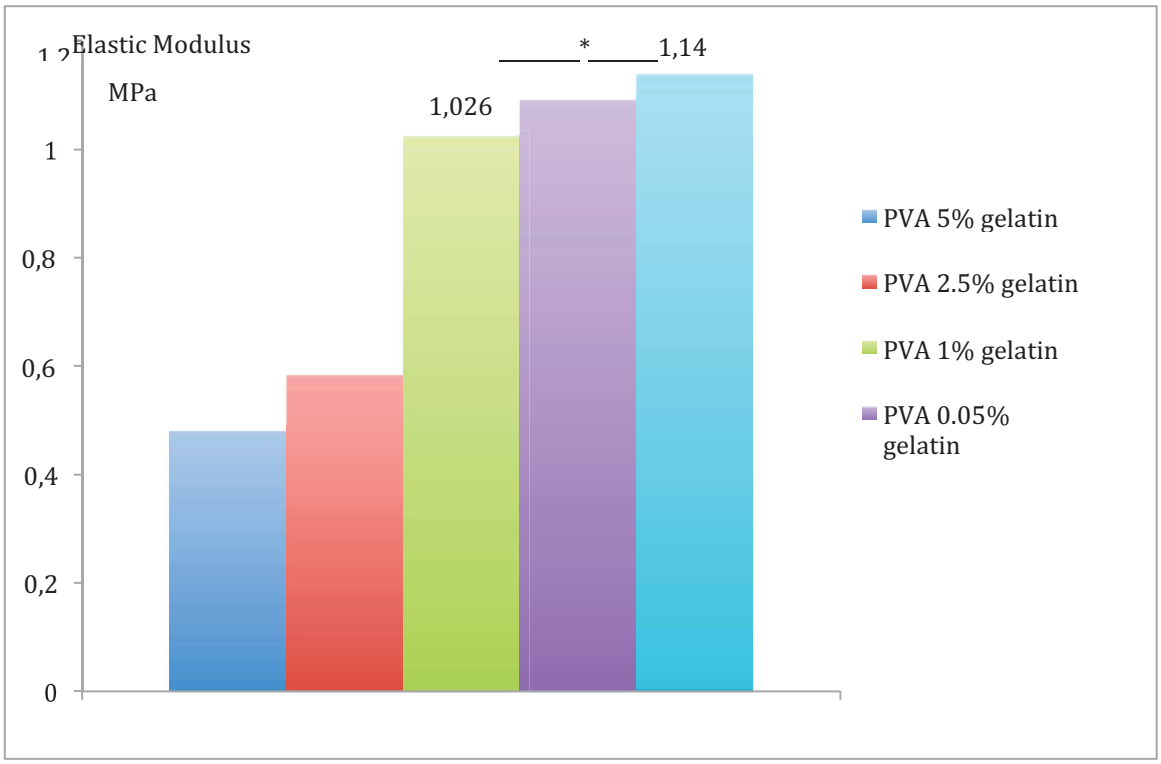


figure 9D ; Comparison of the Elastic modulus, between PVA ,PVA gelatin implants

For PVA Gelatin 1% and PVA , we used a uniaxial tensile testing machine (Electriforce apparatus, Bose) immersed with a liquid chamber (37°C Saline, 0.9%).

With these conditions of testing we found an increase of the elastic modulus (EM) with the increase of strain as well as a decrease of the EM for both samples after 500 cycles.

The mean elastic modulus, for these specimens of less than 48h of age, at the first cyle, is 1.326 MPa versus 0.709+- 5% for PVA gelatin 1%+- 6.1% for 20 % strain. For the same strain, after 500 cycle , the Young's modulus ,dropped at 0.326 +-5.9 % and 0.304 +6.7% for PVA and PVA gelatin 1% implants respectfully. At cycle 500, the stiffness is significantly lower compared to the first cycle for each sample.

The PVA 1% gelatin material was found significatively ($p<0.05$) stiffer with time, in contrast with PVA implants, which have a stable elastic modulus over the time with no significative differences, despite a slight increase of the elastic modulus after 500 cycles(Figure 10). Indeed for the first cycle, at 20% strain, the elastic modulus, reached 0.709+-5% for a PVA gelatin implant, of 48h age but after two months in a phosphate buffer solution, 37°C, the Young's modulus reached 1.083+-5.8%.The variability of the results (n=4-8) is low, with a maximum standard deviation of 8.3%.

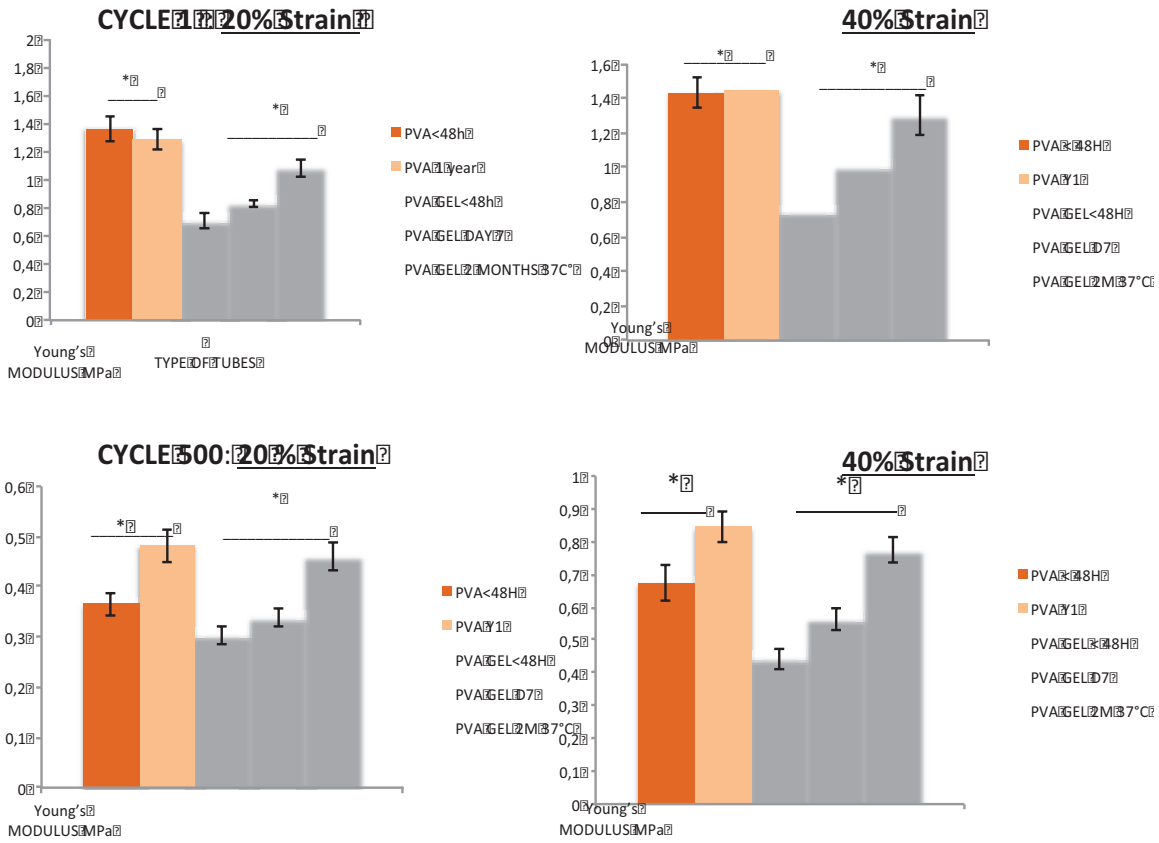


Figure 10 : Comparison of the Elastic Modulus measured in wet conditions, of PVA, PVA Gelatin for different conditions (Strain and number of cycles) and composition, and aged material.(PVA,PVA 1 year old,PVA gelatin <48h,7 days,2months)

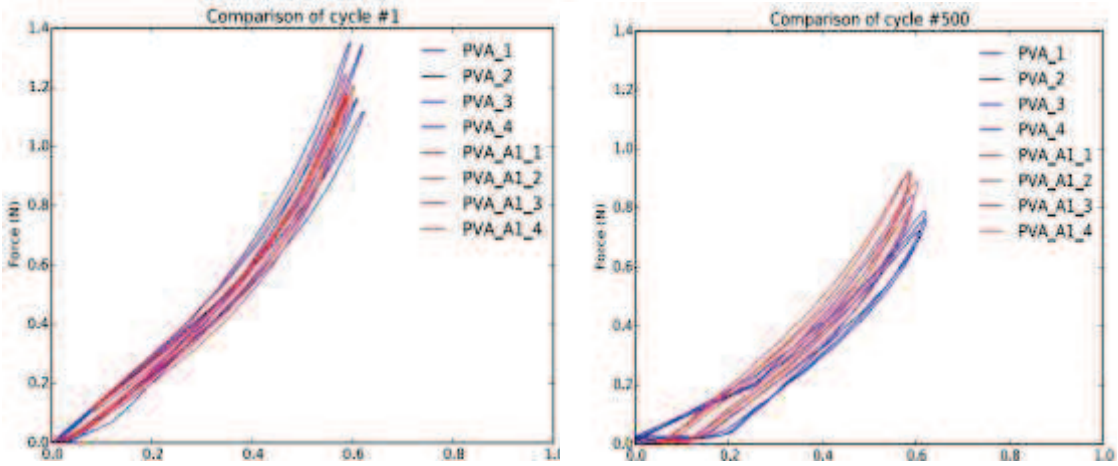


Figure 11 A: Strain-stress values of implants based on PVA: PVA_ 1;PVA_2;PVA_3;PVA_4 Stand for, less than 48h old PVA, versus PVA A1_1,PVA A1_2,PVA A1_3,PVA A1_4 after 1 year in PBS.

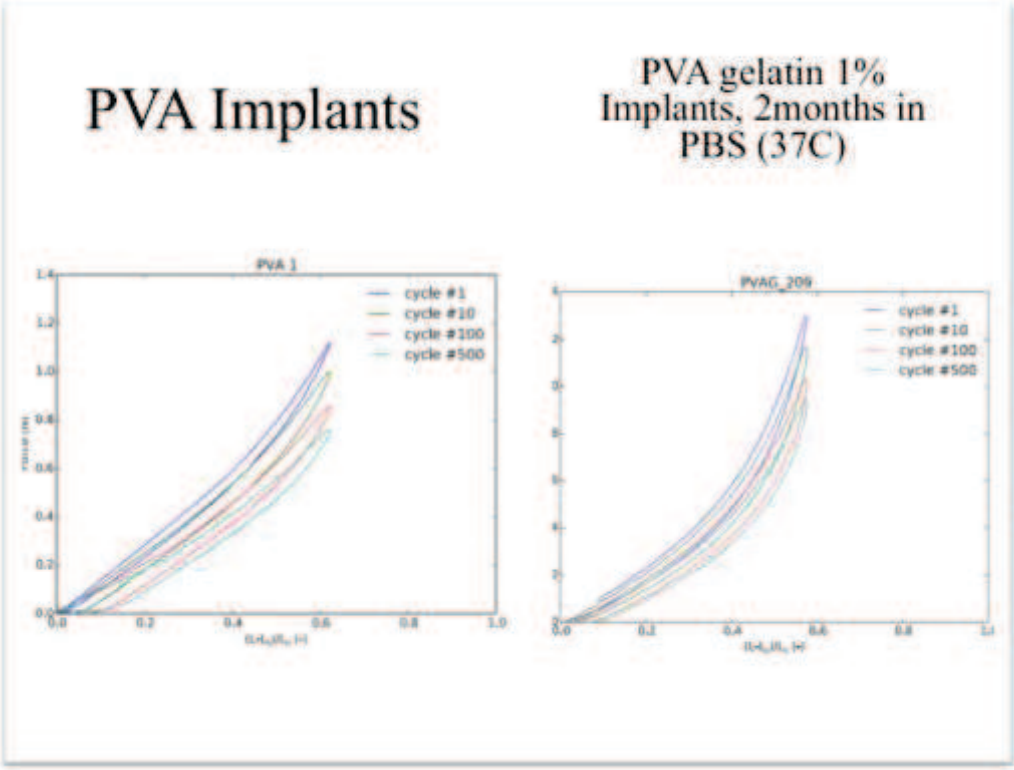


Figure 11 B : PVA gelatin implants, 2months old versus PVA 2 months old.

The trends of an higher elastic modulus was observed, after a one week of storage in the phosphate buffer saline, but it was not significatively different (Figure 10D)

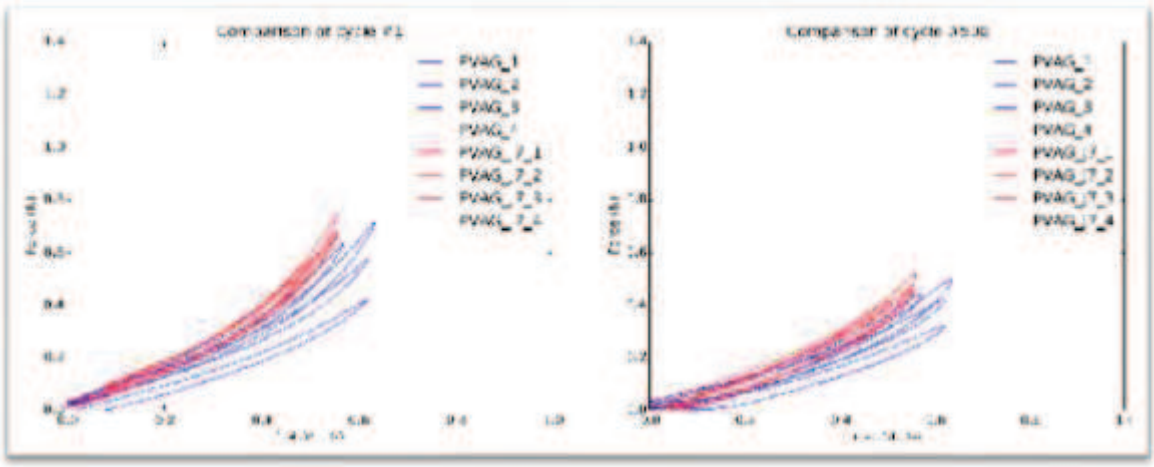


Figure 11 D: (Blue)24 old PVA gelatin 1% old implants/(Red)7 days old, PVA gelatin1% implants

Two months after, the differences between “new” PVA gelatin and old Implants were more pronounced with a stiffer material (figure 10) and considered as significatively different (p=0.0037).(fugure The effect was less pronounced when the temperature of storage was at 4°C (Figure 11 E,F).

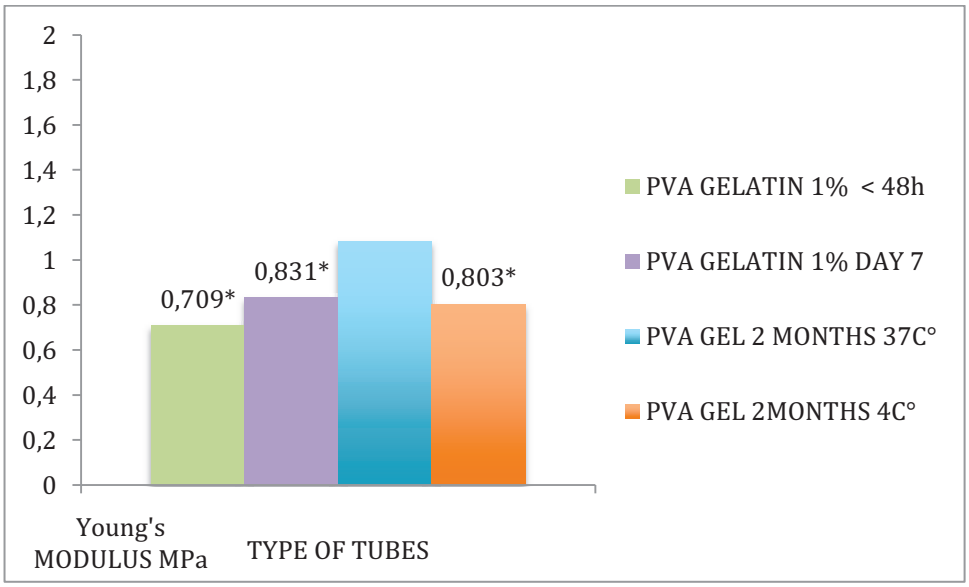


Figure 11 E,F :For PVA 1% gelatin tubes, the elastic modulus is increasing significatively (p=0.007) after 2 months in a phosphate buffer solution. '* 'means a significative difference between PVA gelatin 2 months 37°C and other implants. This increase after two months, is more obvious at 37°C (in blue) than at 4°C (Red).

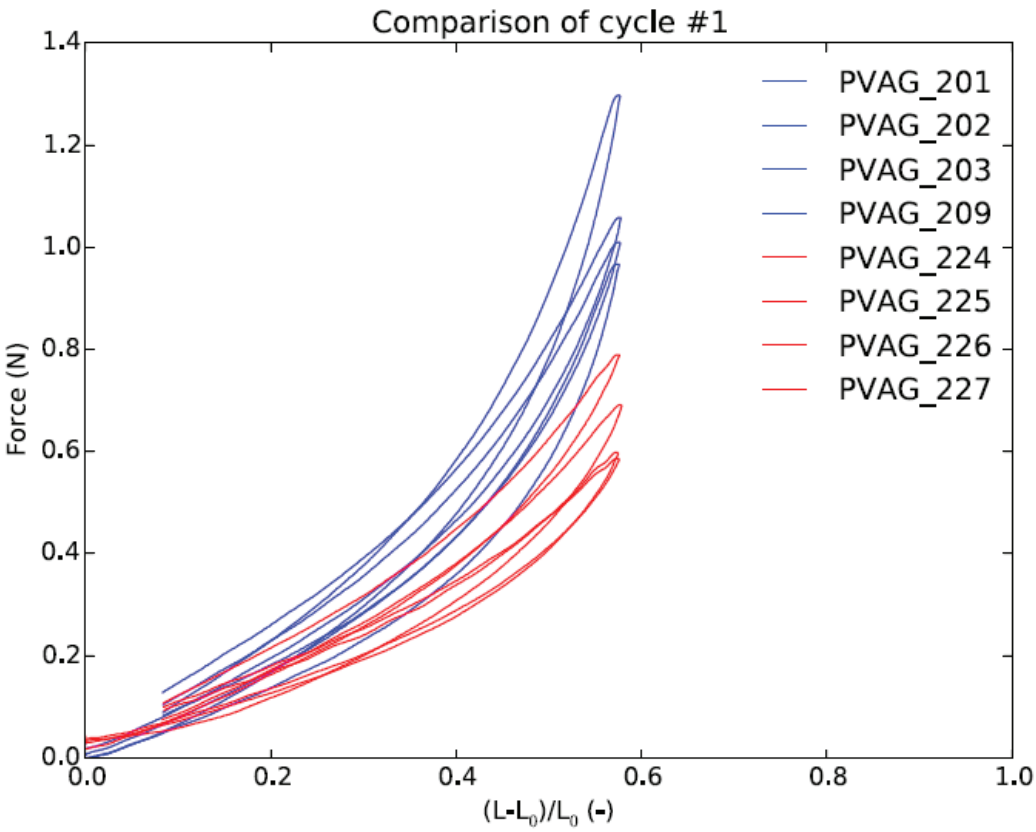


Figure 11 F: Difference of elastic Modulus between PVA gelatin 1% implant stored at 37°C (BLUE) and 4°C(RED)

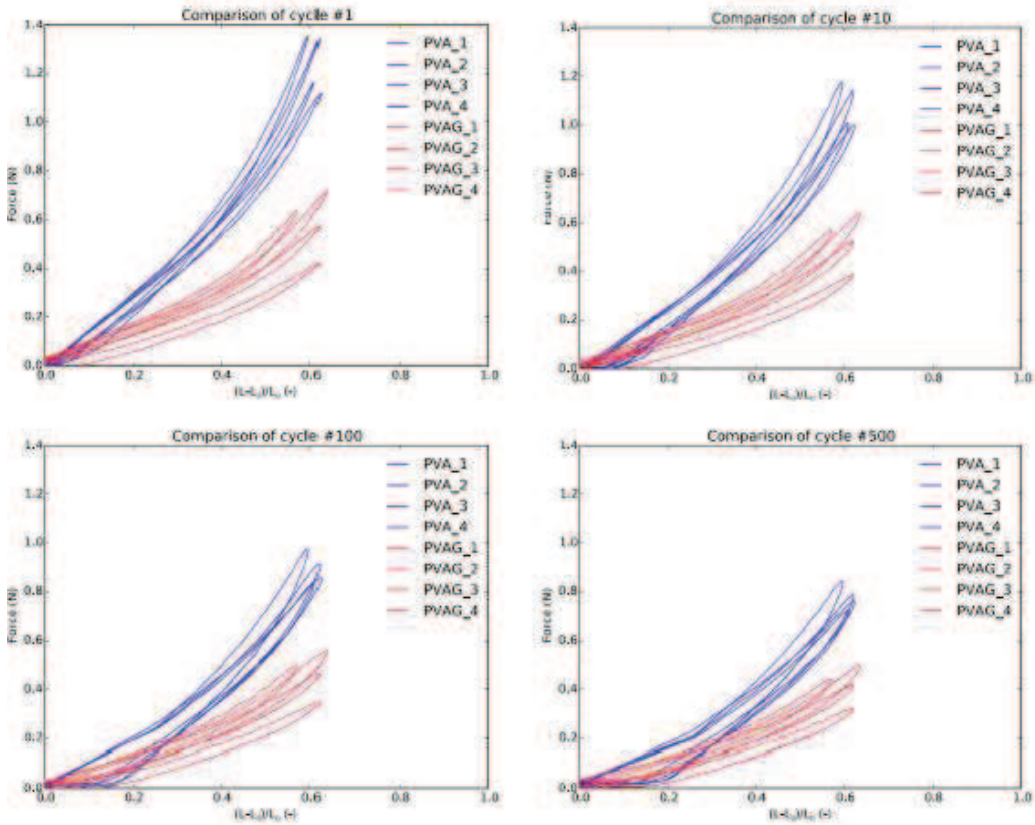


Figure 12: The PVA 1% gelatin implants (Red), exhibited a lower elastic modulus, than PVA (Blue) for the same storage time (< 48h)

The compliance follow the opposite trend, of the elastic modulus, with an increase of the young's modulus with the increase of gelatin(Figure 13)

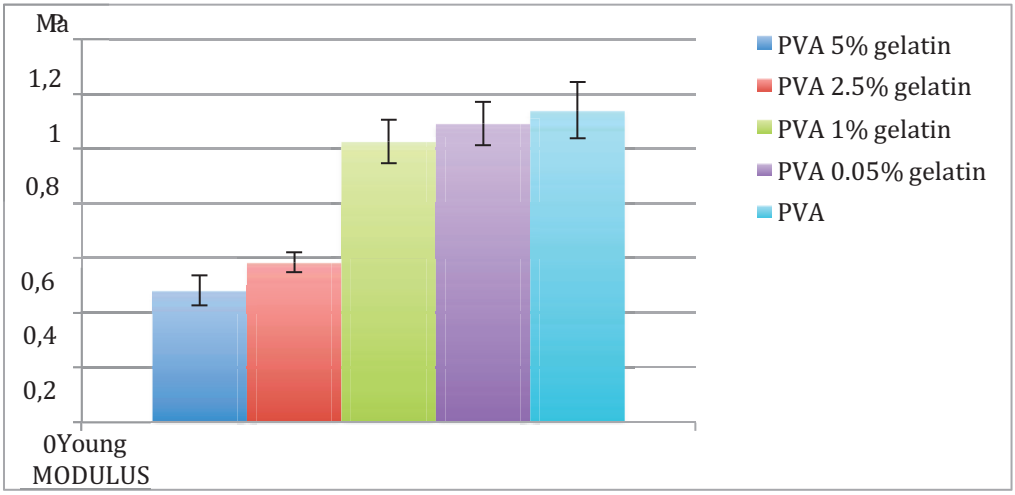
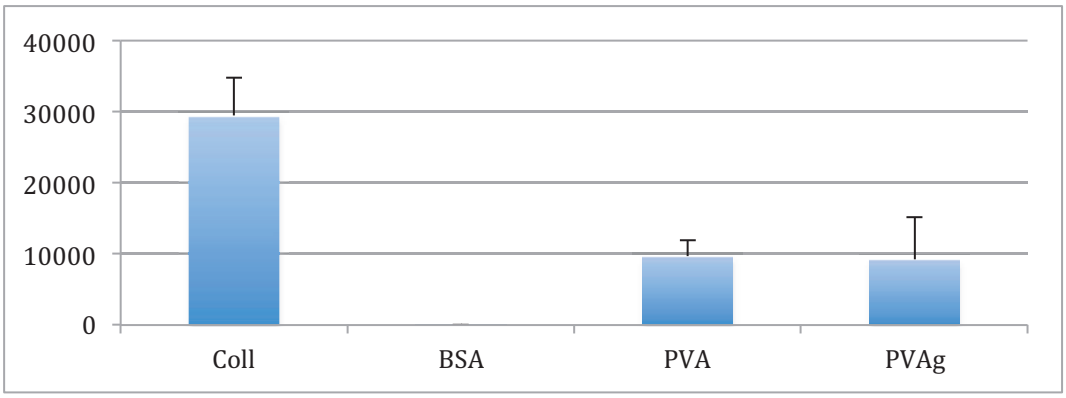
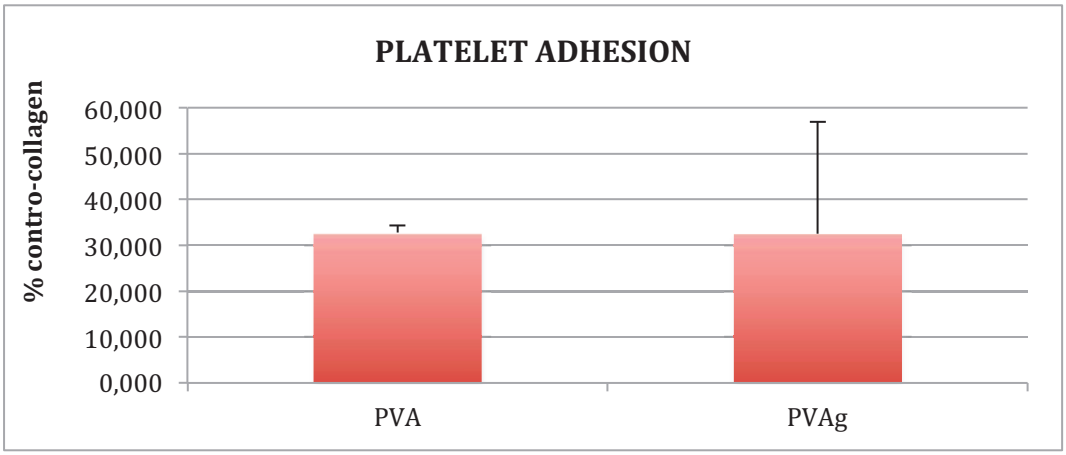


Figure 13: ELASTIC MODULUS comparison of PVA, PVA 0.05% gelatin, PVA 1% gelatin, PVA 2.5% gelatin, PVA 5% gelatin less than 24h after fabrication.

3.5 Platelet adhesion

For technical reason we have tested open tubes. Platelet adhesion was significantly lower than the positive control group (Collagen) ($p<0,05$) but not for the negative control group. PVA demonstrate 50% more platelet activation than PVA heparin tubes but this effect, dropped to same level as PVA after one month (Figure 14)





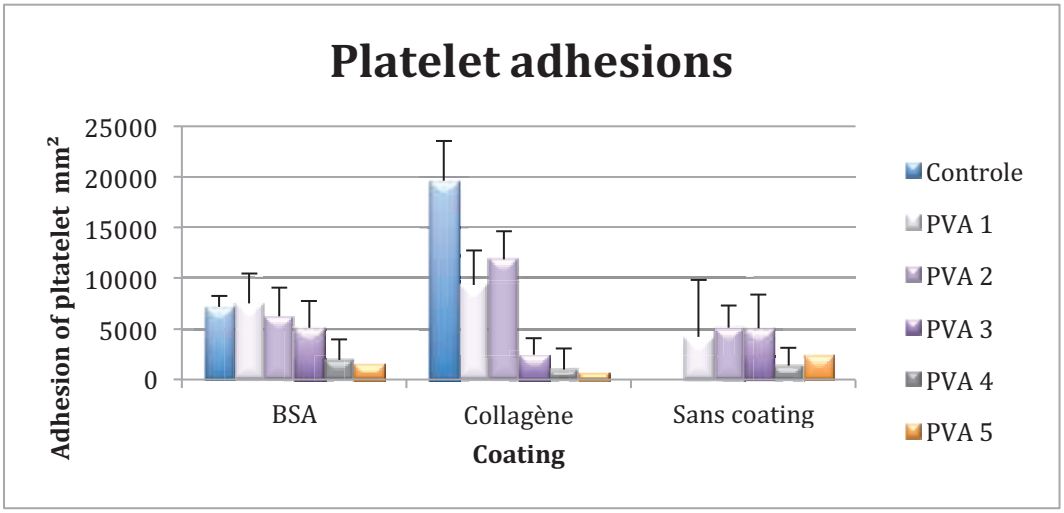


FIGURE 14 : platelet adhesion on PVA 1% gelatin samples (Number 1 to 5),

3.6 Heparin/Gelatin Release

Heparin release

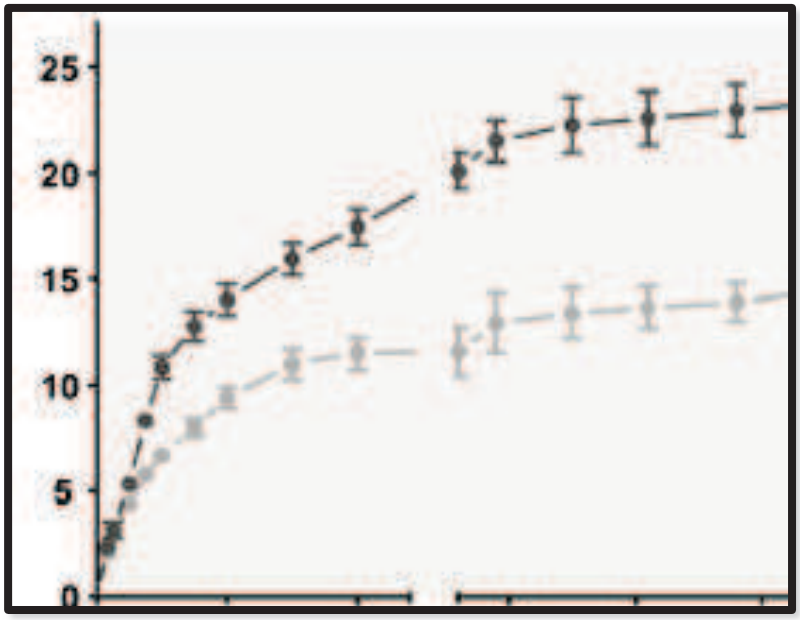


Figure 15: Y axis : % released heparin/total heparin; X axis: Days. Less than 25% of the total amount of heparin is released after 24h after rehydration , and stabilized after 1 month, 75% of the heparin is entrapped within the gel.

Gelatin Release (Table 2)

All samples demonstrated a rapid release of gelatin release in the PBS, between 8 days to 1 month with a stabilization at 61 days(Figure 15)

Days	Sample 1 gelatin content µg/5ml	sample 2 gelatin content µg/5ml	Sample 3 gelatin content µg/5ml	sample 4 gelatin content µg/5ml	sample 5 gelatin content µg/5ml
8	4,158	3,948	4,06	4,91	5,86
36	0,328	0,503	0,4	0,77	0,6
61	0,615	0,663	0,57	0,94	0,44

Table 2: Gelatin detected in the conservation bath, after 8 ,36,61 Days

The mean of gelatin in total released in the PBS at 37C is 5.46 µg (8.2% of the gelatin of the tube). For the 3 samples with no change stored at 37°C, the mean release is 21.7 µg/5ml for a total amount of gelatin within the tube of 45 µg.

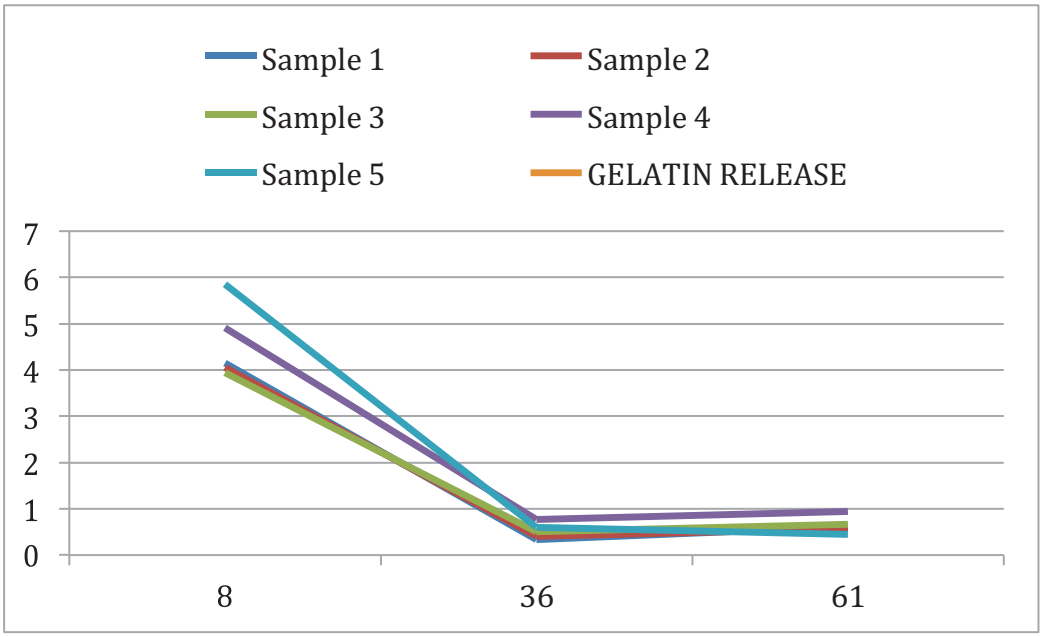


Figure 15: Gelatin release. Y axis: The gelatin concentration is expressed in micrograms for 5ml; X axis : days for PVA gelatin implants

3.7 Permeability rate

A preliminary study ws included at seven days, comparing PVA, PVA heparin, PVA 5%, 2.5%, 1%, 0.05% permeability and then for a longer follow up , to discriminate the best formula to insure a longer patency rate. Until sacrifice at 4, 8 weeks or 12 weeks, all animals (n=62) remained in good health and presented no sign of local or systemic infection and no visual ischemia of legs except for one abdominal abscess and one a abdominal wound dehiscence. The monitoring of the graft patency was done with ultrasound color Doppler and with the 3D-Time Of Flight MRI sequence or by angiography (for 8 animals). A positive patency rate by imaging was on the macroscopic view of the sample (no thrombus) confirmed by histology.

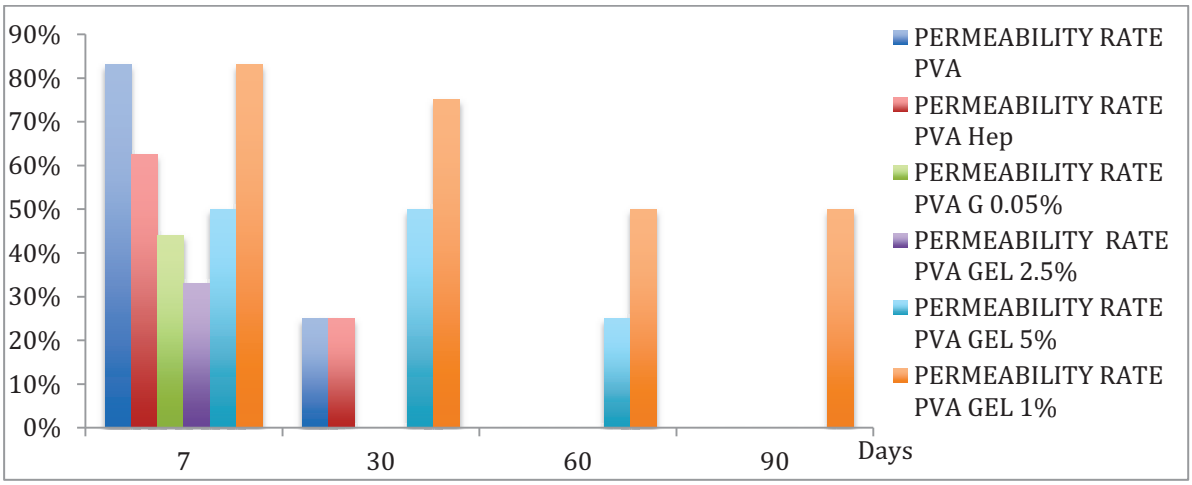


Figure 16: comparison of permeability rate, between PVA, PVA gelatin for various concentrations.X: time (days)/Y: Patency rate

		PATENCY RATE			
Group	**Effectif**	**Week 1**	**Week 4** sacrifice	**Week 8** sacrifice	**Week 12** sacrifice
PVA :CONTROL	12	7/12	1/4	0/4	0/4
PVA Heparin	8	5/8	0/4	--	--
PVA gelatin					
5%	9	4/9	0/3	0/3	0/3
2.5%	9	3/9	1/3	0/3	0/3
0,5%	12	6/12	2/4	1/4	0/4
1%	12	10/12	3/4	2/4	2/4

Table 3: Patency rate of PVA-PVA gelatin at 7 days,1,2,3 months.

The PVA 1%gelatin implants had the best performance at 1 month (75%) (table 3) and are still at 50% of permeability at 2 and 3 months, whereas other implants demonstrated

lower rates. No animals died after D 7, even with severe thrombosis or occlusion.

3.8 Histology and Imaging

Patent grafts presented a good integration with the adjacent arteries. Microimplants were not degraded and they kept their tubular shape. We did not observe any aneurysm or dilatation or any other major deformations of the implants. The implants were found encapsulated in a inflammatory body reaction µm (figure 17 and 18), explaining the difference of diameter between the tube 1.8mm and the MRI findings with a 2.4mm diameter. A confluent endothelium (with endothelial cells ,and smooth muscle cells) was found for PVA 1% gelatin implants for 5 rats among the 7 who were still permeable after 1 month.(figures 19 A et B)

Histology always confirmed the imaging . Examples of thrombosed and permeable implants are available on figure 19 ABCD ,20 and 21-24 (Doppler, Angiograms and most of the time, MRA).

Figure 17 : Specimen (3mm above and below anastomosis) harvested after 1 month exhibiting a moderate inflammatory reaction.

Figure 18: Histology of PVA gelatin implant 1 month old, with a continuous multilayered organization, with a confluent endothelium.

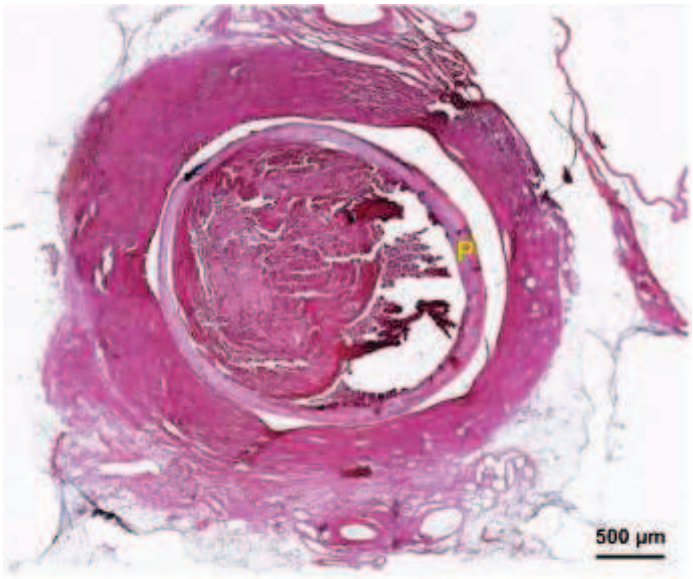


FIGURE 19 A: Thrombosed implant based on PVA heparin. P: stand for vascular prosthesis

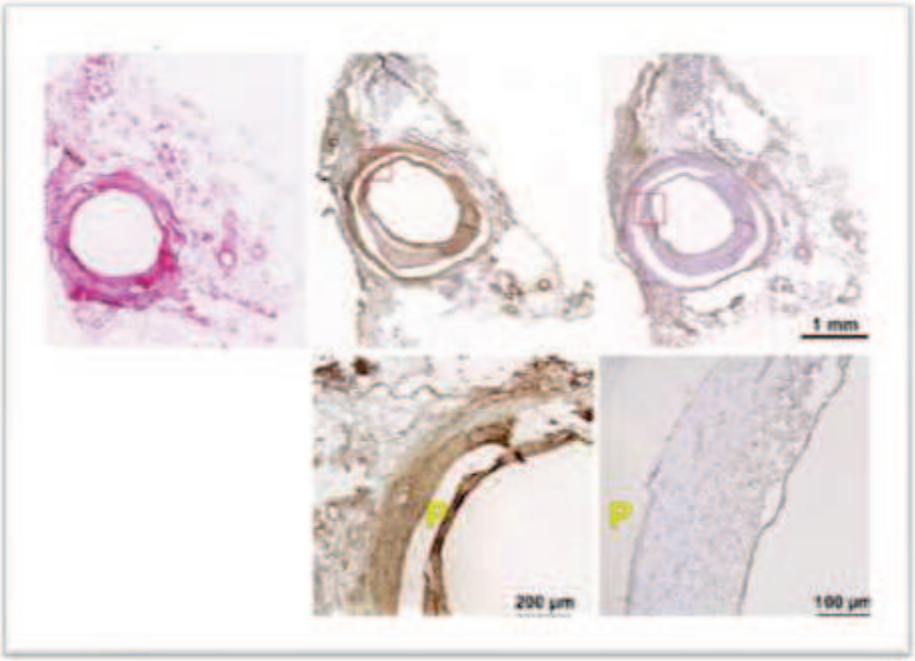


Figure 19 B: The permeable PVA implant at 1 month .

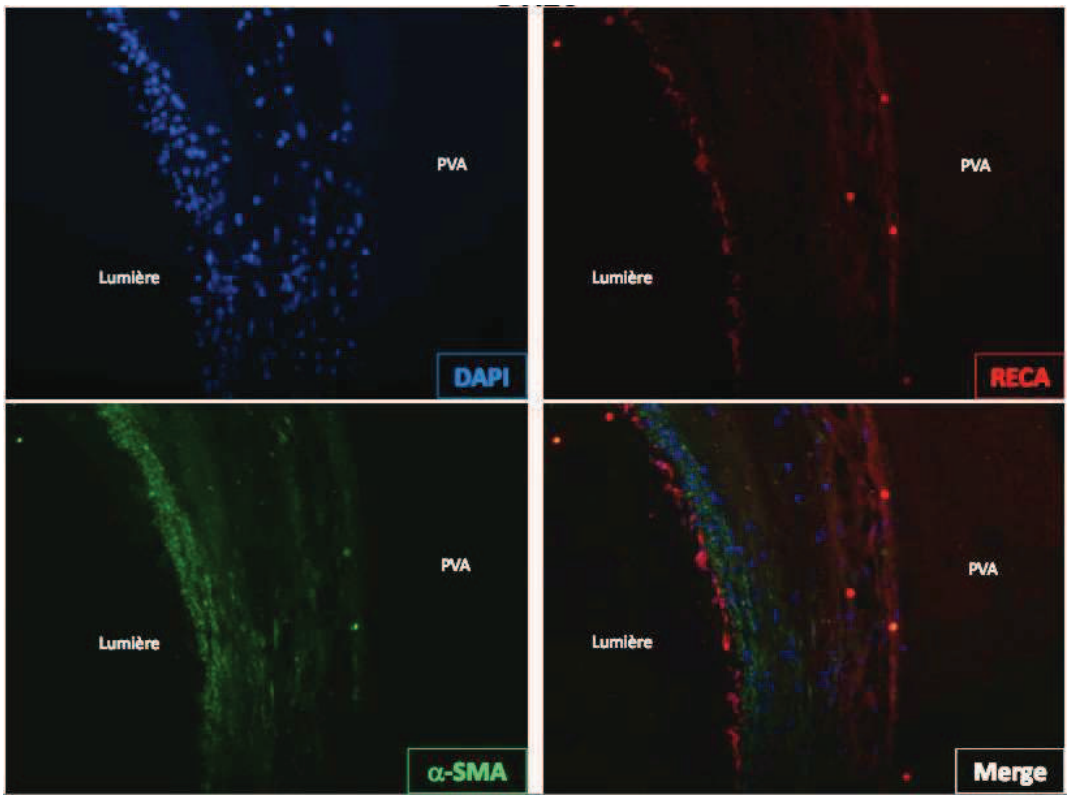


Figure 19C : Example of tubes with a positive patency rate at 3 months of PVA G1% with a confluent vascular endothelium. DAPI : Nucleus /Alpha Muscle Actinine : Smooth muscular cell/RECA: Endothelial cells

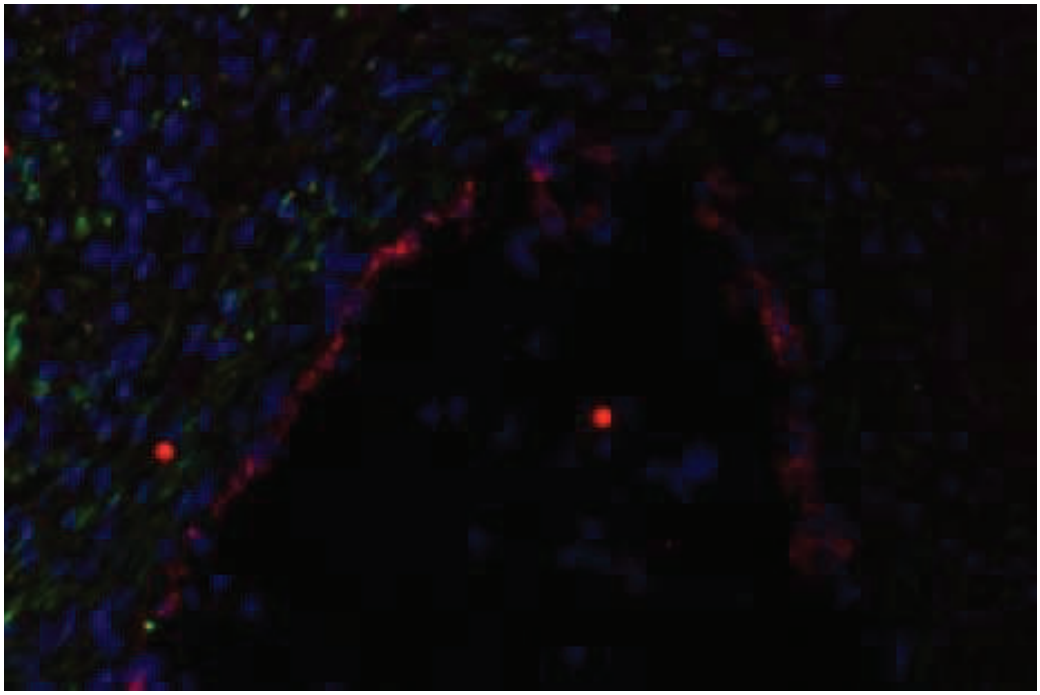


Figure 19 D: PVA gelatin 1% demonstrated a Mutilayer organization with a confluent endothelium.

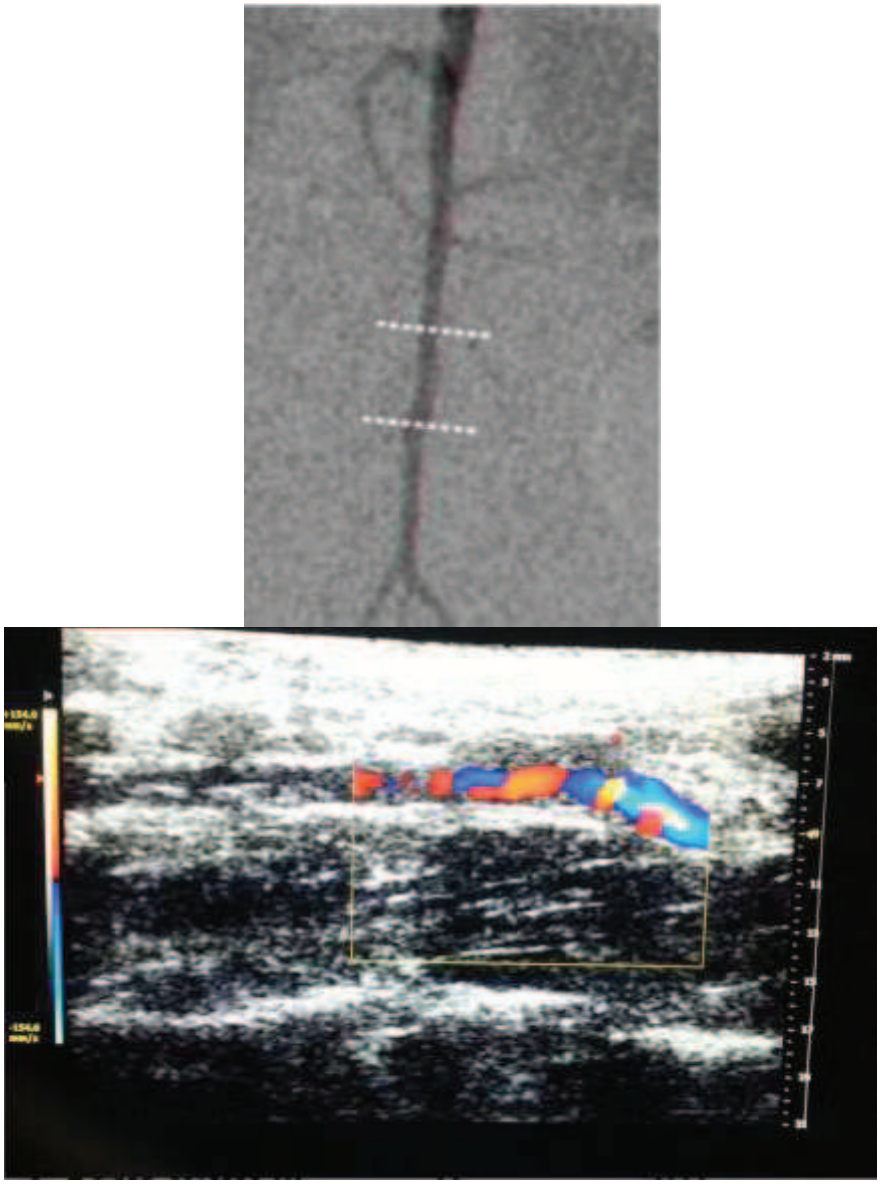


Figure 20 : Angiogram and US Doppler imaging after one week. Blood velocity within the implant is 120-220 mm/s which could reach at the entrance of the implant 800mm/s.

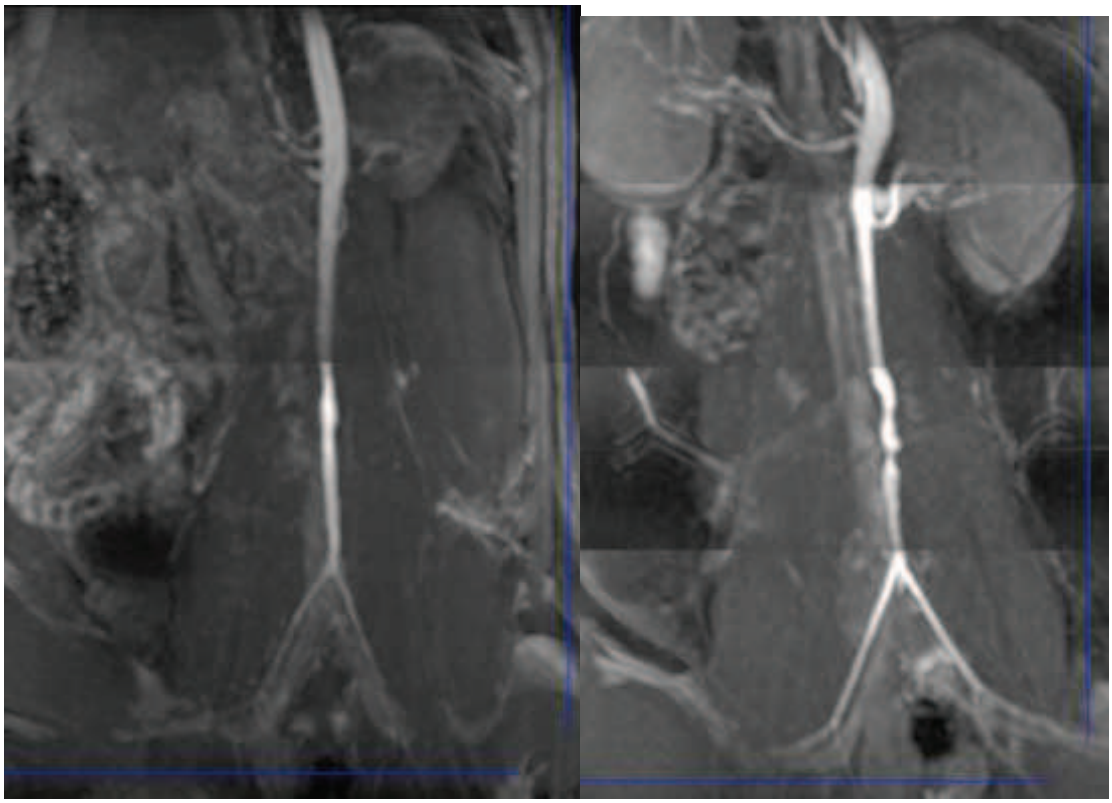


Figure 21: MRA, of a 2 months old PVA 1% gelatin, PVA 1 month,

On 54 cases tested with Time of Flight MRI, thrombosis was often accompanied with a developed collateral vascular network (Figures 22, 23).There was a good correlation between the diagnosis of the 3 observers histology: 100% of permeable implants(Figure 21) with MRA TOF were found with no histological thrombosis and thrombosed implants, were found with 100% histological thrombosis (Figures 23 and 24).

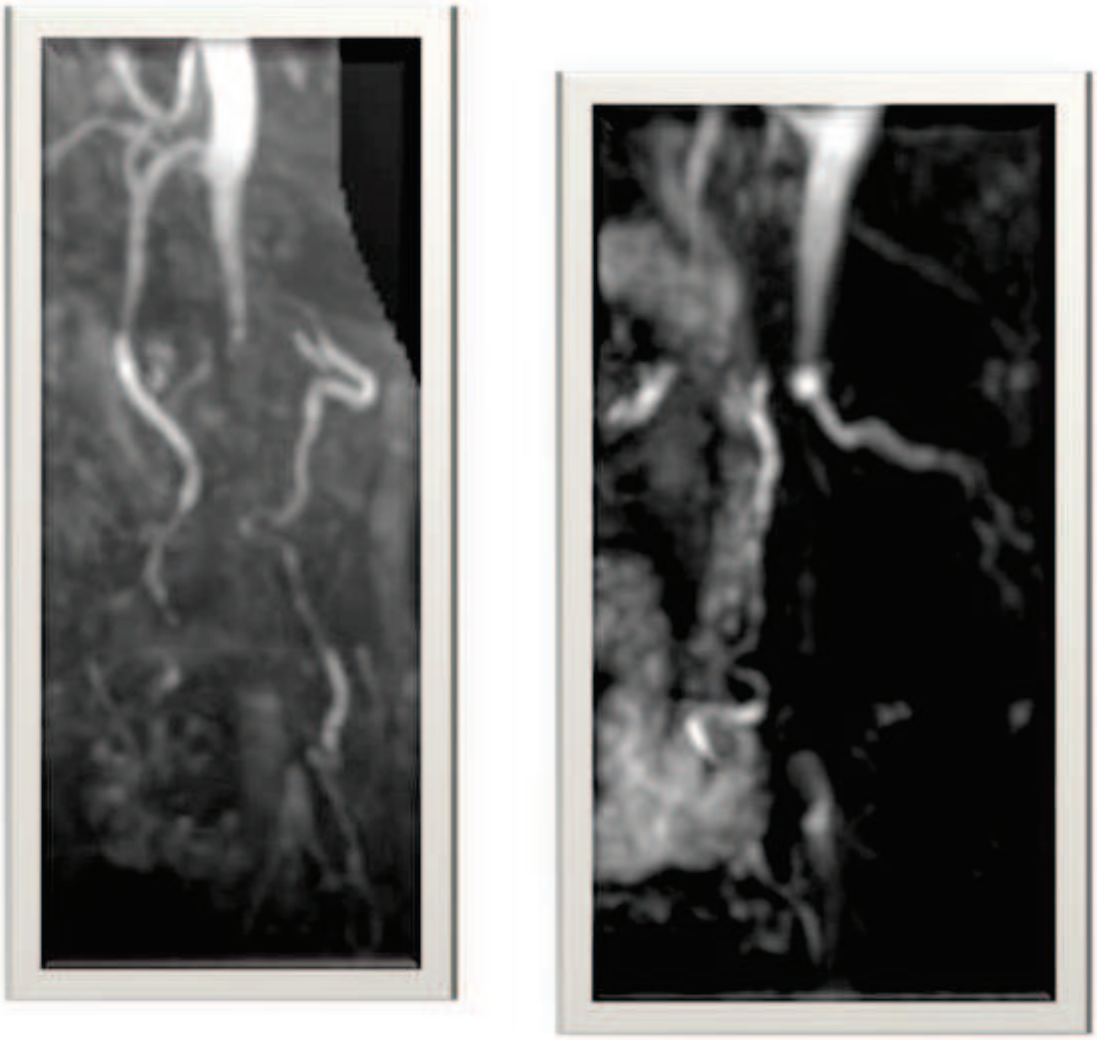


Figure 22 : Left Thrombosis at one month PVA gelatin 2.5%, right Thrombosis at 2 months PVA. Collaterality is highly developed.

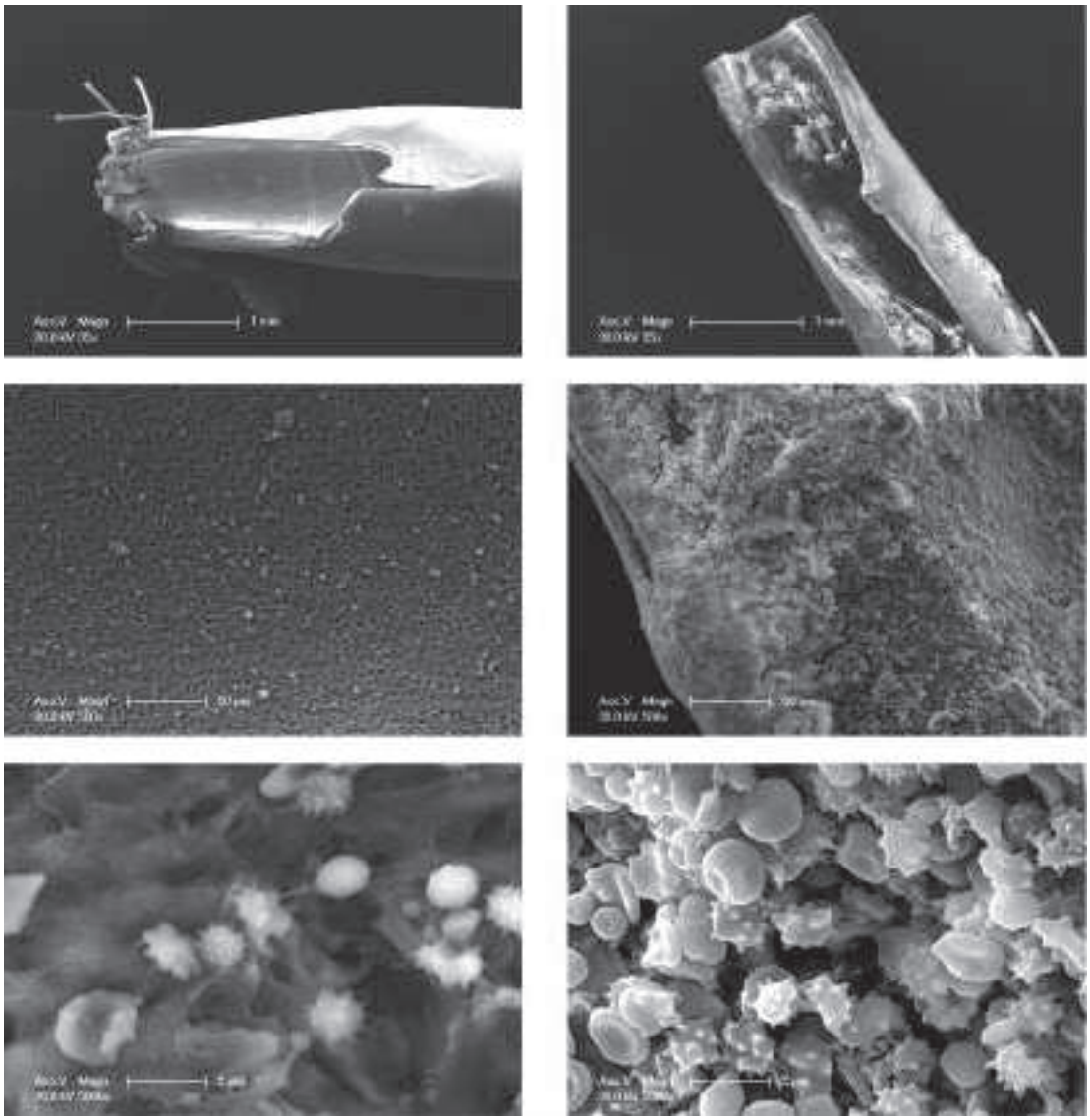


Figure 23 : (Left) a permeable implant of PVA with very few platelets on the luminal surface versus a thrombosed implant(right)

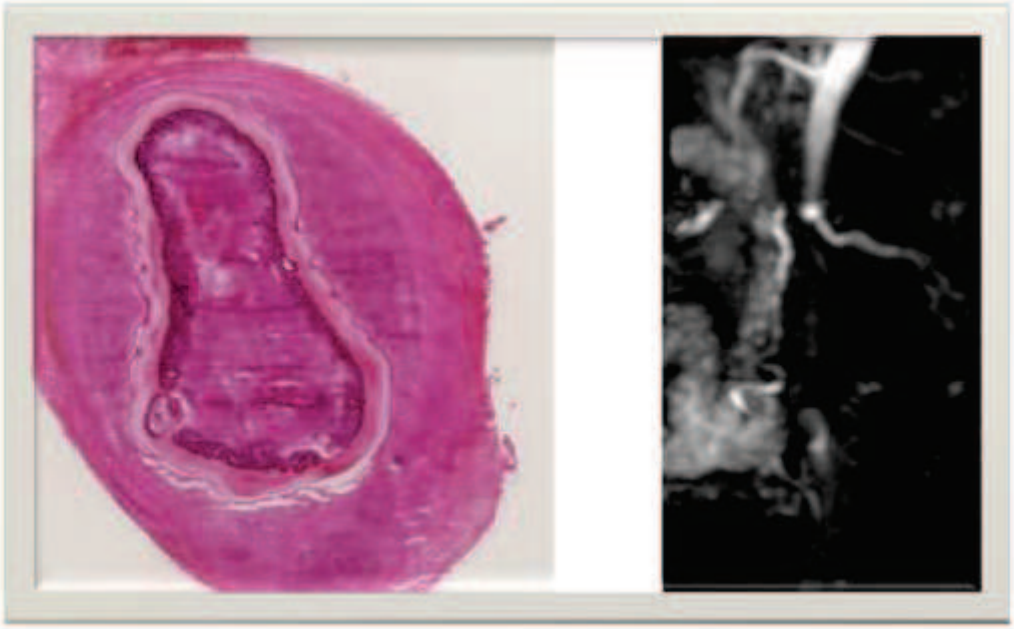


Figure 24 : Histologie (left) et ARM (right) à 3 month .PVA gelatine 1% : « Thrombosis ».

DISCUSSION

In vitro, PVA 1% gelatin films and sutured tubes, showed promising performance for cell adhesion, endothelial cell confluence, and good mechanical properties(27) .Our process of fabrication was standardized and controlled through lyophilization process, and allowed a tubular shape of implants, without the need of sutured or glued films folded on it self.

The hypothesis of a better patency rate of a microvascular implant, based on PVA gelatin 1%, than PVA alone, was confirmed in this work comparing to PVA or other content of gelatin.

For PVA and PVA gelatin based implants, this is the longest and best patency rate reported in the literature. For 7 PVA 1% gelatin implants (still permeable after 1 month, 2 months and 3 months), we found in 70 % of endothelial cell confluence and proliferation. After 1 month the patency rate decreased at 50% at 2 and 3 months, which is higher than, any tubes tested in our work for this follow up. We did not find major inflammatory reaction (foreign body reaction), as could be found with other PVA blend (PVA – Dextran)(83) compared to PVA alone.

PVA heparin tubes were thrombosed early, despite a low heparin release (20%) and low platelet adhesion rate. Because of these disappointing results we did not explore further the biomechanical properties of this material. The “protecting” anti platelet effect of the heparin was probably present during the first week.That could explained the 62.5% permeability rate at 7 days, but the entrappement of the heparin within the PVA probably limited its biodisponibility and was not sufficient to insure any permeability or

endothelialization, that could explained the thrombosis of all PVA heparin implants at 1month and after.

The use of Time Of flight MRI (TOF) angiography to assess permeability of vascular graft was a success and will be published in a separate paper. It avoids the use of a contrast agent, and gave us reliable information on permeability. Another advantage of the Time of Flight MRI angiography MR is not an operator-dependent test as ultrasound. Moreover, it could allow to analyze the information retrospectively for difficult cases. No case detected as “permeable” with the MRI has been found histologically with thrombosis. Among the main proteins used for vascular scaffold composition are collagens, fibrin and gelatin and have been shown to support endothelial progenitor cells differentiation and vessel formation (30,84).The capacity of circulating endothelial cell progenitors to bind integrins and to grow on gelatin is an advantage of using this material derived from collagen and easily available. Moreover, fibronectin adsorption (involved in endothelial cell proliferation and fonction) is increased by gelatin.

The gelatin, a natural biodegradable polymer contains many functional groups (glycine, proline, glutamic acid, hydroxyproline, arginine, alanine, aspartic acid, and other amino acids). Gelatin exposes the Arg-Gly-Asp (RGD) cell recognition signal(81,85–87)(79,88,89) and allows the cell-membrane bound integrins to bind. Modified PVA with RGD promotes Human Umbilical Vein endothelial cell, adhesion and proliferation. Owing to its excellent biocompatibility and biodegradability properties, gelatin has been widely used and studied in regards to many biomedical applications including wound or burn dressings, surgical treatments, nerve regeneration(90), angiogenesis in critical limb injury (91)tissue engineering of bone skin, a scaffold for fat grafting and engineering small vessels for microfluidic and more recently for myocardial patch as a scaffold for cardiomyocytes graft to treat myocardial necrosis(87,92).

The addition of gelatin to the PVA, was found to be effective to allow cell adhesion and proliferation (70) for the in situ endothelialization (75% of patency).; as well as Hydrophilicity for PVA gelatin which was found to be superior to the PVA alone according to Bae et al(93). Hydrophilicity could enhance cell adhesion and proliferation.

Although pure gelatin derived from collagen is highly thrombogenic, the hydrogel of gelatin through a chemical crosslinking (Ca(OH)2), has demonstrated a low thrombogenic activity and enhances cell adhesion for myocardial patch for cardiomyocytes implantation. Alobaid et al(94)(77) showed an enhanced attachment and increased endothelial outgrowth when endothelial

progenitor cells were cultured on RGD-coated well-plates and Ferreira et al.(95) reported a 20-fold increase in EC differentiation from embryonic stem cells when these cells were encapsulated in a dextran-based hydrogel containing the RGD peptide which gelatin contains.

For platelet adhesion, we did not found differences between PVA and PVA 1% gelatin despite that previous work found a decrease platelet adhesion in gelatin films.

It was important to determine if the PVA hydrogels modified by incorporation of gelatin still exhibited sufficient mechanical strength and elasticity for arterial replacement. The compliance of the PVA tubes, found to be 2.92+- 0.2% which is consistent with latest results (62) with PVA 1% gelatin chemically crosslinked (STMP) and thaw at the room temperature. In comparison, PVA/gelatin hybrid tubes displayed a higher compliance (6.3–7.2 %) than the human saphenous vein (0.7-1.5%) (which is known not to be first choice of arterial graft) but comparable to that of the human artery (4.5–6.2 %) and abdominal aorta of the rat .(21,96–98)Suture retentions of PVA tubes were found to be lower than that of human vessels, but close to rat aorta, and compatible for human application. For comparison, Konig et al. (21) established at 50 gmf the minimal suture retention for a vascular graft to avoid any surgical or post-implantation anastomotic complications.

The burst pressure found in our study was similar to those found by Ino (27)but slightly higher 673+-27 versus 703+-17 mmHg for PVA tubes and 544+-25 versus 614 +- 21 mmHg representing more than 2.5 times higher than the systolic arterial pressure of rats or healthy arteries, and at least two times higher than the peak systolic pressure in conditions of maximum stress or disease .Our engineering process is different in tubes, and could explain these differences, because the previous tubes were formed by a PVA film wrapped and suture on itself.

Our implants were white and opaque aspect as opposed to PVA implants of Chaouat et al (28)which were transparent. This difference could be related to the separation phase (77,99)the size of micropores, or crystallites formation during freeze thaw process(88,100,101).

No heterogeneity was observed regarding the solubility and miscibility of these solutions. Because water is a poor solvent for PVA, gelatin in the form of emulsion particles is stabilized in the PVA solution by the interaction between PVA and gelatin molecules. If this state remains unchanged during drying, micelles will be formed in the blend. This phenomenon explained the white and non transparent aspect, as silk fibroin (78–80) which is very closed to gelatin.

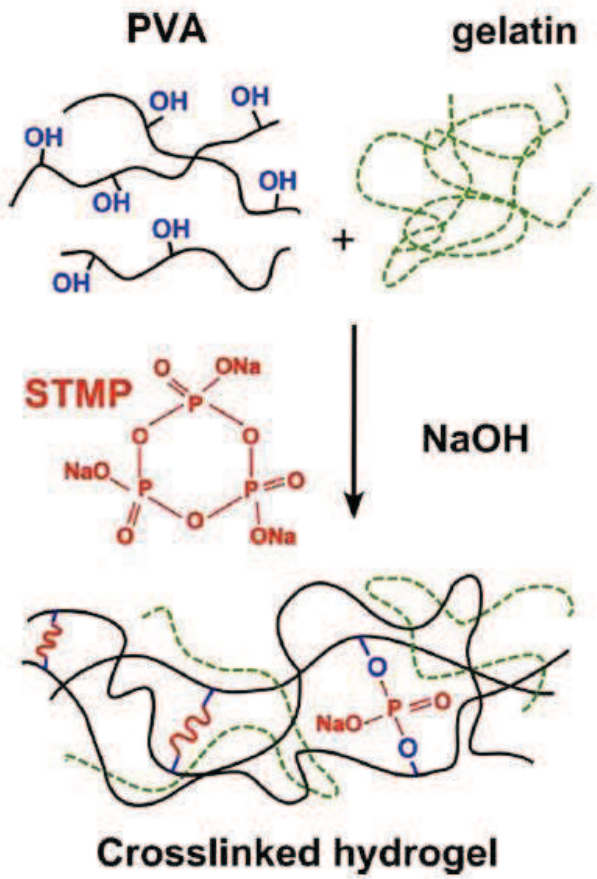
PVA and PVA/gelatin films were prepared using a crosslinking technique with STMP and a casting method through a freezing-thawing process by lyophilization. We demonstrated that gelatin release is maximum after a week, and minimal after one month, which could explain the high patency rate, by the protective effect of the gelatin to initiate the "in situ endothelialization" process. The loss of gelatin during the first week has been confirmed by others through indirect methods (29,93)with hydroproline (product of degradation of the gelatin) measurements or weight differences over the time. We found the same phenomen of release of gelatin in the PBS with a very good accuracy (5 nanograms) through a direct test by ELISA.

With an indirect test, based on the weight of the tubes over the time, Bae et al(71) used a film of PVA gelatin, for an anti adhesion membrane after surgery using an UV crosslinking. The degradation of the gelatin was very fast at the beginning and depleted its content. After 14 days of incubation the PVA gelatin (50/50) membrane has lost around 77.8 % of its mass whereas the PVA/Gel (10/90) membrane lost almost 91.1 of its mass. High concentration of gelatin membrane showed that the mass loss rate became faster than other sample.

This phenomenon probably occurs in the physiological condition and most of the gelatin release occurred during the first week. To explain the crosslinking process of the PVA, according to Lack et al (102)(27,93)under alkaline conditions, the STMP cycle is opened by an alcohol moiety and reacts with a second alcohol moiety. This coupling leads to the formation of a phosphate bridge between two hydroxyl groups of the polymer chains.

The chemical crosslinking of gelatin is usually performed using glutaraldehyde, which links to free amino groups, or carbodiimides which induce a bond between gelatin's primary amino and carboxylic acid groups. Ino et al, did not succeed in preparing a crosslinked hydrogel of pure gelatin with STMP suggesting that gelatin does not react with this specific crosslinker. We can only assume that gelatin macromolecules are entrapped in the dense PVA network (figure 23).

Figure 23 : Gelatin entrapment mechanisms into PVA (Ino et al)



A coagulation treatment by immersing in a solution of 1M KOH and 1M NA2SO4(31,100,103)(104) at room temperature under constant mixing for 1 hour, have been used by others to stabilize the gelatin within the PVA .

Other materials not based on PVA are also promising, but using more expensive, complex, rare materials or with a longer process of fabrication, such as :

i) PCL(62,105)or Polycaprolactone (100% patency rates at 18 weeks months and 50% at 24 weeks); ii) Fibroin silk (106,107)(85% one-year patency rate); iii) Electrospinning with PVA and gelatin are developed by other authors with interesting results(108)(109),because of the specific patterning on the luminal surface that could influence cell proliferation; iv) Ex vivo multilayered cell culture in tube form tissue engineering by self-assembly (TESA) from N. L'Heureux's team, minimum time 4 weeks(21,110–113);v) Accelularized vessels modified with peptide which enhanced endothelialization(93)(94)(113,114).

The phenomenon of gelatin release could not be the unique explanation of the late thrombosis (50% at 2 and 3 months) despite a good permeability rate 75% at one month because most of gelatin is not released (because entrapped) and it's a time-limited mechanism.

The PVA 1% gelatin implant with less than 24 h of fabrication is more supple and compliant than PVA, but the aging process leads a stiffer material after 2 months stored at 37°.

The PVA gelatin elastic modulus reached after 2 months at 37°C, the level of PVA Young's modulus. Pure PVA based implant has at one month , a permeability of 25% rate versus 75% for PVA gelatin. The biomechanical properties of PVA alone may not match enough, with the physiological characteristics of the native vessels to insure a long-term permeability rate. Although we have demonstrated, that the addition of gelatin (a more supple material than PVA) , decreased, the elastic modulus , we are not able yet to prove ,through this work, if the hardening, of the PVA gelatin 1% over the time is related to gelatin release.

The aging of the PVA has been extensively studied by Holloway and al (115,116)by comparing, aged samples of PVA solution with different concentration without any freeze–thaw cycles, store at room temperature for periods of up to 31 days in closed containers wrapped with parafilm. The authors compared these specimens for the crystallinity, tensile strength, and microstructure to different hydrogels prepared with freeze thaw cycles. The aged PVA solutions based materials, exhibited crystallinity ratio and elastic modulus compatible for vascular implantation, but lower than PVA hydrogels processed with multiple freeze thaw cycle. Cristallinity, tensile strength increased with aging,polymer concentration and the osmotic or non osmotic nature of the liquid of conservation(115) .Moreover the temperature of conservation of the implants has to be controlled because, the increase of elastic modulus, was higher between 2 months at 37°C and samples kept 2months at 4°C.

One of the limitations of our work is that every implants were not exactly at the same age (48h- 15 days), and this condition was not controlled perfectly, although the aging is limited by the storage at 4°C.

One could expect a low elastic modulus, not suitable for implantation, with only one freeze -thaw process (99) comparing with authors testing PVA cryogels , with 3 or more freeze-thaw cycle(117). One of the explanation could the use of 2 simultaneous ways of crosslinking, one through the freeze thaw process and one through the chemical crosslinking with the STMP as Ino(62) et Chaouat(10). In their work, even with a slow rate of thawing (lower rate of crystallinity), the chemical crosslinking was efficient enough to give to their material a good tensile strength

In addition we used a high molecular weight PVA (84000-124000 kDa, fully hydrolyzed) with one FT cycle immediately after a first period of freezing at very low temperature (-80°C). All these factors are involved in the crystallites formation, which are very important for improving tensile strength. The addition of gelatin, which is softer material than PVA, decrease the young's modulus but the mechanical properties appear to be dominated by PVA as stated by Liu et al..

The generally accepted model is that cycling to low temperatures causes the formation of ice crystals, which increases the polymer concentration in the surrounding, unfrozen regions, inducing PVA crystallization. During exposure to cold temperatures water freezes, expelling PVA and forming regions of high PVA concentration. As the PVA chains come into close contact with each other, crystallite formation and hydrogen

bonding occurs. The PVA gelatin blends consist of PVA-poor pores within a continuous PVA-rich domains. Willcox et al (118) proposed a model for the formation of these cryogels , whereby ice crystals formed during the low-temperature phase of the thermal cycles concentrate the polymer solution in regions between the ice crystals, promoting the formation of PVA crystallites. The formation of crystallites occurs initially, at cold temperature, and expells PVA and creates rich PVA domains. These interactions remain intact following thawing and create a non-degradable three-dimensional hydrogel network. Phase separation facilitates the formation of PVA crystalline domain and remains after thawing. For each cycle the water freezes and expands, pushes the PVA chains closer, and facilitates the hydrogen bonding and crystallite formation.

One per cent ratio gelatin is low, but has potential effect on mechanical properties through microstructure characteristics (109,119)and on a luminal texturation. Ino et al found with fluorescence, that gelatin was not uniformly distributed, for higher concentrations, but gelatin accumulated on the edges of the micro-domains observed with electronic microscopy .Cascone et al (120)reported a similar result for a PVA/dextran hydrogel system. The hydroxyl groups of PVA are able to form hydrogen bonds within chains or between chains, which lead to small crystallites scattered in an unordered, amorphous polymer matrix (104). With additional freeze-thaw cycles, the crystalline domain grows due to the strengthened hydrogen bonding, which is associated with an increase in chain stiffness. This increases the glass transition temperature of the hydrogel. Another polymer solution phase exists in the PVA crosslinked matrix, namely the PVA "solution" phase: the part of the PVA solution, which has not been physically cross-linked during freeze-thaw cycle or through the STMP process. This part of PVA solution can be stabilized and precipitated when treated with the coagulation bath. This is why coagulation treatment increased the polymer fractions and improved the mechanical

properties of hydrogels: the crystallite domains served as crosslinks to hold the three dimensional structure together and enhancing the strength whereas a bath with 7.5% KOH and 1M Na2SO4, (a non-solvent system for PVA and gelatin) decreased the cristalinity(31) .

We were not able to conclude, if the gelatin have an effect on aging, in our study but the increase of the stiffness was more important for PVA gelatin blend than for PVA tubes. The thermal treatment (freeze-thaw cycles) increased the strength of hydrogels by growing the crystal domains in PVA matrix, which acted as the crosslinks to withstand external stresses.

In our work, the PVA implants with various amount of gelatin, were not equivalent for the permeability rates, because there are difference of the microstructures on the luminal side, and for biomechanical properties. We found major differences between PVA and PVA gelatin implant, is the luminal texturation. The number of freeze thaw cycle, as well as phase separation increases gel porosity and micropore size. Cell adhesion and proliferation (27,101,108,121)depends on the size of the pore, related to the endothelial cell size . The size and the morphology of pores could promote, in some conditions, cell to cell contact and migration (105)(69)(106).

The 1% gelatin blend, showed pores sizes of 20 μm which is consistent with micropores of PVA Gelatin 1% based film of Ino et al, which are not enough to easily entrapped endothelial cells.

The gelatin is responsible of pore's formation, and promotes the attachment and development of cells. (88,122,123).

The PVA itself has anti-ice nucleating property (109,110), and this cryoptrotective effect could limit crystallization and could limit ice growth, that could explain the

smoother aspect of PVA tubes , whereas PVA gelatin implant with less PVA, present a more accidental aspect. Other authors(83) showed a bottom up organization of gelatin cryogels in the presence of a crosslinker, with large size pore externally (interface with air) and micropore (100 microns) at the interface with cooling system. In our process, a plastic rod centered the PVA gel, previously, formed, and kept in a cylindrical form through gelation. The differences of microstructure between the external surface of the tube and the luminal surface (micropores) could be explained by such a phenomenon.

The high swelling capacity of the gelatin could have an impact on the pores size too (65). The optimal concentration of concentration of gelatin (1% in our study), was consistent with previous studies (27,124)using the PVA as a matrix for cell adhesion and the exvivo endothelialization with multilayered organization. But itself a gelatin based tube could not support the biomechanical demands and is not suitable to replace vessels.).

To illustrate the impact of gelatin, Ohya et Al (119) using a Poly (N-isopropylacrylamide)-grafted gelatin (P/G), films, shows that the best cell adhesion and biomechanical performance, were found with the highest P/G ratio.

We have not study the effect of the plastic rod on the texturation of the luminal surface. We cannot exclude that during the freeze-drying, the rod that centered the mold, could imprint a specific pattern on the PVA, which could influence endothelialization. Indeed Cutiongco et al (125)showed that specific patterning of the PVA leads to a better adhesion and proliferation of the Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVEC). Nanotopographic modification of the luminal surface, material has shown promising results on cell adhesion, differenciation, orientation (121,126–128)(94,108,109) .

The specific pattern of the texturation of the luminal surface, may have an influence on mechanical properties too, since Ohya et al, found for Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel that concave and convex regions are respectively softer and stiffer.

Because the difference of shear modulus at body temperature and room temperature (25 degrees C°) is within 10% , (96)it was important to test samples at body temperature. This one of the reason to test our samples, with uniaxial tensile testing machine (Electriforce apparatus, Bose) equipped with a liquid chamber with a controlled temperature. Test the tensile strength, in a “liquid environnement”, take into account the swelling of the PVA. The swelling depends on the initial polymer concentration (but not on the number of freeze thaw cycling), and swelling itself may increase the tensile modulus. (115,116,129).

Our microvascular implant, which was directly engineered here in a tube form (and not films or wrapped films) allowed us to compare our results with native vessels and to avoid factors such as gluing or suturing a film on itself.

The elastic modulus of the PVA and PVA gelatin microvascular implants are lower but in

the range of the longitudinal and transveral value of the elastic modulus of the rat aorta tested in immersed condition(97): 5Mpa for the abdominal aorta, but 0,785 Mpa for the thoracic aorta . The maximum strain applied to the tubes during the tensile force evaluation, was 60% of the initial length comparing to the physiological range of strain of the animal aorta or in human vascular tissue whereas the longitudinal stretch of the human artery in the physiological condition is 20% of the initial length. The approximate average strain between diastole and systole for porcine aortic root ranges between 20 and 30%, and the strain range has also been reported to be between 17 and 49% strain.(97,98,130)

Our method of crosslinking (chemical and physical) through crystallization could explain why our PVA tubes were stiffer than INO et al.

Moreover chemically crosslinked polymer, especially PVA exhibits lower stiffness than physically crosslinked PVA(79,96). The fabrication process of chemical and physical crosslinking, allowed us to form the material as a tube without any need for suturing (or using glue) to fold a film on itself.

Moreover the process was reproductible and gave us a stable material with very few variations especially for biomechanical properties .

We primarily choose the freeze thaw technique through lyophilization to insure a reliable method and to avoid a variable “room temperature” with controlled conditions, and a stable recipe of the lyophilization.Indeed , Ino et al (27,28)and Chaouat et al found very different Elastic Modulus, with the same technique of manufacturing, PVA Films with a step of drying until complete evaporation at room temperature.

The load (78,96,104,127) (ie : blood pressure on the arterial wall, on the material in the case of microvascular implant) has a positive influence on crystallinity too. Native vessels such as the porcine aorta , has a higher strength in the circumferential direction. Millon (82)et al produced a PVA , using freeze thaw technique and some specimen were preconditioned, with a desired strain in one direction (of 25, 50, 75, or 100% of the original length) to give them, anisotropic mechanical properties through the arrangement of the cristallites perpendicular to the direction of the strain . The material still exhibited very good biomechanical properties with an elastic modulus comparable to our result. The crosslinking process is both physically through freeze thaw cycle and chemical through the STMP. To improve stability of the gelatin material chemical cross linking with biocompatible agents like genipin, aldehydes and so forth has been already investigated. However the chemical crosslinking has always been dwarfed the superior biocompatibility of the polymers despite better stability in aqueous environment.

CONCLUSION

Through a double crosslinking process, chemical (STMP) and physical (freeze thaw), and

the addition of gelatin, at 1% ratio, PVA based implants with promising properties of in situ endothelialization, showed a very good patency rate in rats (75% at one month , 50% at 2 and 3 months) and biomechanical properties, close to those of human arterial blood vessels.

Gelatin is a major factor to initiate cell adhesion, through luminal microstructure (micropores), cell contact and migration. Aging of PVA has to be taken account in future works, as well as the conditions of measure of the elastic modulus. With the gelatin release, the ageing of PVA could be responsible of the decreased permeability rate of this implant after 1 month.

Ackowledgement

This study was supported by Inserm, Universities Paris Diderot and Paris 13. The authors would like to thank F. Nadaud (UTC Compiègne, France) for SEM images, Matthieu Roche (Laboratoire de physique des solides).

C) Conclusions et perspectives

Notre modèle d'implants a montré des propriétés interessantes, et une perméabilité à 1mois et au dela qui n'avait jamais obtenue avec le materiel PVA gélatine.

De plus nous avons fiabilisé , le processus de fabrication des implants vasculaires, directement sous forme de tubes, sans necessité de coller ou suturer des films de PVA sur eux-memes.Il nous faut encore évaluer les effets de la gélatine sur le PVA et de la lyophilisation congelation, du PVA qui ont entrainé des modifications de la surface luminale.D'autres voies d'exploration seraient possibles comme l'impression sur le moule utilisé pour la fabrications des implants,de micro voire des nano-motifs (patterns) dont les caractéristiques améliorent l'adhérence et la prolifération cellulaire. L'utilisation de technologie, type imprimante 3D serait intéressante à évaluer soit pour créer le moule soit pour directement "imprimer" le tube en sachant que le PVA pure sans agent de réticulation est utilisé comme matériel d'impression , il faudrait alors après impression utiliser le processus de lyophilisation(Congelation-séchage) pour entrainer une réticulation physique ou inclure du STMP dans les fils.De plus, ces travaux ont mis en évidence l'intérêt de ce matériel pour ses bonnes propriétés mécaniques, de compliance, résistance à la suture, résistance à l'éclatement, module de Young. Cependant celles- ci ne se maintiennent pas dans le temps, et le vieillissement du matériel augmente son module élastique jusqu'à rejoindre celui du PVA, dont les prothèses se thrombosent dans 75% des cas , à un mois alors que l'effet de vieillissement est peu important pour le PVA seul. Ce phénomène doit être pris en compte dans nos futurs travaux et pourrait être maitrisé par des bains de coagulation, ou une maitrise plus fine des cycles de congélation/séchage au travers de la lyophilisation. Lors du stockage des implants, une température de 4C limite les effets du vieillissement, et la durée de conservation idéale reste à définir.

L'essai des ces implants, chez le gros animal le temps de l'autonomisation de lambeaux libres seraient une étape interessante si nous confirmons la bonne permeabilité à 1 mois et

serait peut etre une solution à proposer dans les situations de “déplétion” vasculaire en situation humaine.

Nous restons sur notre ligne d’endothélialisation in situ, par fonctionnalisation de notre materiel ,le PVA plutot que la voie de l’ingeniérie tissulaire.

L’intérêt pédagogique de ce substitut vasculaire a été une suprise qui nous pousse à continuer à travailler sur ce sujet de la simulation microchirurgicale.

Le projet Mitrad est ambitieux et vise à la fois à fournir à tous les formateurs un moyen objectif de formation, une évaluation standardisée voire automatisée mais aussi de limiter l’utilisation du modèle vivant pour des raisons économiques, éthiques et pratiques.

Nous espérons que Robo-Mitrad sera opérationnel dans 2 ans.

L’Angiographie par résonance magnétique, s’est révélé être un moyen d’exploration, robuste, suffisamment puissant, délivrant des informations pertinentes, de façon rapide et sans injection de produit de contraste. C’est la première application humaine en chirurgie plastique pour le repérage des vaisseaux perforants, pour la réalisation d’un lambeau microanastomosé de type DIEP. Il faudrait donc comparer ce moyen de repérage à l’angio TDM qui est l’examen de référence. C’est évidemment un travail translationnel que nous poursuivons avec un étudiant en Master II. Ce nouveau champ de recherches d’exploration d’imagerie vasculaire sans injection de produit fait donc parti de nos objeectifs au sein de l’unité.

D) Bibliographie et annexes

BIBLIOGRAPHIE

1. Krishnan NM, Purnell C, Nahabedian MY, Freed GL, Nigriny JF, Rosen JM, et al. The cost effectiveness of the DIEP flap relative to the muscle-sparing TRAM flap in postmastectomy breast reconstruction. Plast Reconstr Surg. 2015 Apr;135(4):948–58.

2. Garvey PB, Buchel EW, Pockaj BA, Casey WJ, Gray RJ, Hern??ndez JL, et al. DIEP and Pedicled TRAM Flaps: A Comparison of Outcomes: Plast Reconstr Surg. 2006 May;117(6):1711–9.

3. Bottero L, Lefaucheur J-P, Fadhul S, Raulo Y, Collins ED, Lantieri L. Electromyographic assessment of rectus abdominis muscle function after deep inferior epigastric perforator flap surgery. Plast Reconstr Surg. 2004 Jan;113(1):156–61.

4. Man L-X, Selber JC, Serletti JM. Abdominal Wall following Free TRAM or DIEP Flap Reconstruction: A Meta-Analysis and Critical Review: Plast Reconstr Surg. 2009 Sep;124(3):752–64.

5. Tamai S. History of microsurgery. Plast Reconstr Surg. 2009 Dec;124(6 Suppl):e282–94.

6. Tamai S. History of microsurgery--from the beginning until the end of the 1970s. Microsurgery. 1993;14(1):6–13.

7. Qassemyar Q. [A little story of microsurgery]. Ann Chir Plast Esthét. 2014 Oct;59(5):301–5.

8. Yamamoto T, Yoshimatsu H, Koshima I. Navigation lymphatic supermicrosurgery for iatrogenic lymphorrhea: supermicrosurgical lymphaticolymphatic anastomosis and lymphaticovenular anastomosis under indocyanine green lymphography navigation. J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS. 2014 Nov;67(11):1573–9.

9. Tashiro K, Yamashita S, Saito T, Iida T, Koshima I. Proximal and distal patterns:

Different spreading patterns of indocyanine green lymphography in secondary lower extremity lymphedema. J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS. 2015 Nov 5;

10. Yoshimatsu H, Yamamoto T, Narushima M, Iida T, Koshima I. The guide wire method: a new technique for easier side-to-end lymphaticovenular anastomosis. Ann Plast Surg. 2014 Aug;73(2):231–3.

11. Yamamoto T, Koshima I. A prospective analysis of 100 consecutive lymphovenous bypass cases for treatment of extremity lymphedema. Plast Reconstr Surg. 2014 Jun;133(6):887e – 888e.

12. Chang K-H, Liao H-T, Chen J-P. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 2013 Nov;9(11):9012–26.

13. Chang DW. Lymphaticovenular Bypass for Lymphedema Management in Breast Cancer Patients: A Prospective Study: Plast Reconstr Surg. 2010 Sep;126(3):752–8.

14. Atlan M. La place de la chirurgie des lymphatiques dans les lymphœdèmes subaigus et chroniques acquis. J Mal Vasc. 2013 Mar;38(2):100.

15. Feng LJ. Recipient vessels in free-flap breast reconstruction: a study of the internal mammary and thoracodorsal vessels. Plast Reconstr Surg. 1997 Feb;99(2):405–16.

16. Ballyk PD, Walsh C, Butany J, Ojha M. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. J Biomech. 1998 Mar;31(3):229–37.

17. Jensen LP, Lepäntalo M, Fossdal JE, Røder OC, Jensen BS, Madsen MS, et al. Dacron or PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. a multicenter randomised study. Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg. 2007 Jul;34(1):44–9.

18. Uhl C, Hock C, Betz T, Greindl M, To pel I, Steinbauer M. Comparison of venous and HePTFE tibial and peroneal bypasses in critical limb ischemia patients unsuitable for endovascular revascularization. Vascular. 2015 Dec 1;23(6):607–13.

19. Post S, Kraus T, Müller-Reinartz U, Weiss C, Kortmann H, Quentmeier A, et al. Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg. 2001 Sep;22(3):226–31.

20. Rychlik IJ, Davey P, Murphy J, O'Donnell ME. A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass. J Vasc Surg. 2014 Aug;60(2):506–15.

21. Konig G, McAllister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. Biomaterials. 2009 Mar;30(8):1542–50.

22. Davidovic L, Vasic D, Maksimovic R, Kostic D, Markovic D, Markovic M. Aortobifemoral grafting: factors influencing long-term results. Vascular. 2004 Jun;12(3):171–8.

23. Neville RF, Capone A, Amdur R, Lidsky M, Babrowicz J, Sidawy AN. A comparison of tibial artery bypass performed with heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene and great saphenous vein to treat critical limb ischemia. J Vasc Surg. 2012 Oct;56(4):1008–14.

24. Allen BT, Mathias CJ, Sicard GA, Welch MJ, Clark RE. Platelet deposition on vascular grafts. The accuracy of in vivo quantitation and the significance of in vivo platelet reactivity. Ann Surg. 1986 Mar;203(3):318–28.

25. Zdrahala RJ. Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art. J Biomater Appl. 1996 Apr;10(4):309–29.

26. Schmedlen RH, Masters KS, West JL. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. Biomaterials. 2002 Nov;23(22):4325–32.

27. Ino JM, Sju E, Ollivier V, Yim EKF, Letourneur D, Le Visage C. Evaluation of hemocompatibility and endothelialization of hybrid poly(vinyl alcohol) (PVA)/gelatin polymer films: Hemocompatibility And Endothelialization Of Hybrid PVA/Gelatin Polymer Films. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013 Nov;101(8):1549–59.

28. Chaouat M, Le Visage C, Baille WE, Escoubet B, Chaubet F, Mateescu MA, et al. A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. Adv Funct Mater. 2008 Oct 9;18(19):2855–61.

29. Ino JM, Chevallier P, Letourneur D, Mantovani D, Le Visage C. Plasma functionalization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for cell adhesion enhancement. Biomatter. 2013 Dec;3(4).

30. Liu Y, Geever LM, Kennedy JE, Higginbotham CL, Cahill PA, McGuinness GB. Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels. J Mech Behav Biomed Mater. 2010 Feb;3(2):203–9.

31. Liu Y, Vrana NE, Cahill PA, McGuinness GB. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Aug;90(2):492–502.

32. Grober ED, Hamstra SJ, Wanzel KR, Reznick RK, Matsumoto ED, Sidhu RS, et al. The Educational Impact of Bench Model Fidelity on the Acquisition of Technical Skill: The Use of Clinically Relevant Outcome Measures. Ann Surg. 2004 Aug;240(2):374–81.

33. Wanzel KR, Hamstra SJ, Caminiti MF, Anastakis DJ, Grober ED, Reznick RK. Visual-spatial ability correlates with efficiency of hand motion and successful surgical performance. Surgery. 2003 Nov;134(5):750–7.

34. Lascar I, Totir D, Cinca A, Cortan S, Stefanescu A, Bratianu R, et al. Training program and learning curve in experimental microsurgery during the residency in plastic surgery. Microsurgery. 2007;27(4):263–7.

35. Osborn HA, Kuthubutheen J, Yao C, Chen JM, Lin VY. Predicting Microsurgical Aptitude. Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol. 2015 Aug;36(7):1203–8.

36. Campbell RD, Hecker KG, Biau DJ, Pang DSJ. Student Attainment of Proficiency in a Clinical Skill: The Assessment of Individual Learning Curves. Launois P, editor. PLoS ONE. 2014 Feb 20;9(2):e88526.

37. Alzakri A, Al-Rajeh M, Liverneaux PA, Facca S. État des lieux de l'enseignement des techniques microchirurgicales en France et à l'étranger. Chir Main. 2014 Jun;33(3):219–23.

38. Shurey S, Akelina Y, Legagneux J, Malzone G, Jiga L, Ghanem AM. The Rat Model in Microsurgery Education: Classical Exercises and New Horizons. Arch Plast Surg. 2014;41(3):201.

39. Guerreschi P, Qassemyar A, Thevenet J, Hubert T, Fontaine C, Duquennoy-Martinot V. Reducing the number of animals used for microsurgery training programs by using a task-trainer simulator. Lab Anim. 2014 Jan;48(1):72–7.

40. Belykh E, Byvaltsev V. Off-the-job microsurgical training on dry models: Siberian experience. World Neurosurg. 2014 Aug;82(1-2):20–4.

41. Ramachandran S, Chui CH-K, Tan B-K. The Chicken Aorta as a Simulation-Training Model for Microvascular Surgery Training. Arch Plast Surg. 2013;40(4):327.

42. Prunières GJ-C, Taleb C, Hendriks S, Miyamoto H, Kuroshima N, Liverneaux PA, et al. Use of the Konnyaku Shirataki noodle as a low fidelity simulation training model for microvascular surgery in the operating theatre. Chir Main. 2014 Apr;33(2):106–11.

43. Oliveira Magaldi M, Nicolato A, Godinho JV, Santos M, Prosdocimi A, Malheiros JA, et al. Human Placenta Aneurysm Model for Training Neurosurgeons in Vascular Microsurgery: Neurosurgery. 2014 Dec;10:592–601.

44. Erel E, Aiyenibe B, Butler PEM. Microsurgery simulators in virtual reality: review.

Microsurgery. 2003;23(2):147–52.

45. Kazemi H, Rappel JK, Poston T, Hai Lim B, Burdet E, Leong Teo C. Assessing suturing techniques using a virtual reality surgical simulator. Microsurgery. 2010 Sep;30(6):479–86.

46. Carey JN, Rommer E, Sheckter C, Minneti M, Talving P, Wong AK, et al. Simulation of plastic surgery and microvascular procedures using perfused fresh human cadavers. J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS. 2014 Feb;67(2):e42–8.

47. Ramachandran S, Ong Y-S, Chin AY, Song I-C, Ogden B, Tan B-K. Stepwise Training for Reconstructive Microsurgery: The Journey to Becoming a Confident Microsurgeon in Singapore. Arch Plast Surg. 2014;41(3):209.

48. Nugent E, Joyce C, Perez-Abadia G, Frank J, Sauerbier M, Neary P, et al. Factors influencing microsurgical skill acquisition during a dedicated training course. Microsurgery. 2012 Nov;32(8):649–56.

49. Hopmans CJ, den Hoed PT, van der Laan L, van der Harst E, van der Elst M, Mannaerts GHH, et al. Assessment of surgery residents' operative skills in the operating theater using a modified Objective Structured Assessment of Technical Skills (OSATS): a prospective multicenter study. Surgery. 2014 Nov;156(5):1078–88.

50. Martin JA, Regehr G, Reznick R, MacRae H, Murnaghan J, Hutchison C, et al. Objective structured assessment of technical skill (OSATS) for surgical residents. Br J Surg. 1997 Feb;84(2):273–8.

51. Dumestre D, Yeung JK, Temple-Oberle C. Evidence-Based Microsurgical Skills Acquisition Series Part 2: Validated Assessment Instruments—A Systematic Review. J Surg Educ. 2015 Jan;72(1):80–9.

52. Temple CLF, Ross DC. A New, Validated Instrument to Evaluate Competency in Microsurgery: The University of Western Ontario Microsurgical Skills Acquisition/Assessment Instrument [Outcomes Article]: Plast Reconstr Surg. 2011

Jan;127(1):215–22.

53. Remie R. The PVC-rat and other alternatives in microsurgical training. Lab Anim. 2001 Oct;30(9):48–52.

54. Spetzger U, von Schilling A, Brombach T, Winkler G. Training models for vascular microneurosurgery. Acta Neurochir Suppl. 2011;112:115–9.

55. Komatsu S, Yamada K, Yamashita S, Sugiyama N, Tokuyama E, Matsumoto K, et al. Evaluation of the Microvascular Research Center Training Program for Assessing Microsurgical Skills in Trainee Surgeons. Arch Plast Surg. 2013;40(3):214.

56. Sutherland LM, Middleton PF, Anthony A, Hamdorf J, Cregan P, Scott D, et al. Surgical simulation: a systematic review. Ann Surg. 2006 Mar;243(3):291–300.

57. Vaughn CJ, Kim E, O'Sullivan P, Huang E, Lin MYC, Wyles S, et al. Peer video review and feedback improve performance in basic surgical skills. Am J Surg [Internet]. 2015 Nov [cited 2015 Dec 25]; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000296101500608X

58. McGoldrick RB, Davis CR, Paro J, Hui K, Nguyen D, Lee GK. Motion Analysis for Microsurgical Training: Objective Measures of Dexterity, Economy of Movement, and Ability. Plast Reconstr Surg. 2015 Aug;136(2):231e – 240e.

59. Onoda S, Kimata Y, Sugiyama N, Tokuyama E, Matsumoto K, Ota T, et al. Analysis of 10-Year Training Results of Medical Students Using the Microvascular Research Center Training Program. J Reconstr Microsurg. 2015 Dec 4;

60. Spruit EN, Band GPH, Hamming JF. Increasing efficiency of surgical training: effects of spacing practice on skill acquisition and retention in laparoscopy training. Surg Endosc. 2015 Aug;29(8):2235–43.

61. Ghanem AM, Hachach-Haram N, Leung CCM, Myers SR. A systematic review of evidence for education and training interventions in microsurgery. Arch Plast Surg. 2013 Jul;40(4):312–9.

62. Pektok E, Nottelet B, Tille J-C, Gurny R, Kalangos A, Moeller M, et al. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly(-Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. Circulation. 2008 Dec 9;118(24):2563–70.

63. Jiang H, Zuo Y, Zhang L, Li J, Zhang A, Li Y, et al. Property-based design: optimization and characterization of polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel and PVA-matrix composite for artificial cornea. J Mater Sci Mater Med. 2014 Mar;25(3):941–52.

64. Schaverien MV, Ludman CN, Neil-Dwyer J, McCulley SJ. Contrast-enhanced magnetic resonance angiography for preoperative imaging of deep inferior epigastric artery perforator flaps: advantages and disadvantages compared with computed tomography angiography: a United Kingdom perspective. Ann Plast Surg. 2011 Dec;67(6):671–4.

65. Swanson EW, Hsu Y-C, Cheng H-T. CTA and contrast-enhanced MRA are equally accurate for localizing deep inferior epigastric perforator flap arteries: a systematic review. J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS. 2015 Apr;68(4):580–1.

66. Mofikoya BO, Ugburo AO, Bankole OB. Does open guide suture technique improve the patency rate in submillimeter rat artery anastomosis? Handchir Mikrochir Plast Chir Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Für Handchir Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Für Mikrochir Peripher Nerven Gefässe Organ Ver Dtsch Plast Chir. 2014 Apr;46(2):105–7.

67. Yamanami M, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, et al. 3-Tesla magnetic resonance angiographic assessment of a tissue-engineered small-caliber vascular graft implanted in a rat. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jan;92B(1):156–60.

68. Iravani A, Mueller J, Yousefi A-M. Producing homogeneous cryogel phantoms for medical imaging: a finite-element approach. J Biomater Sci Polym Ed. 2014;25(2):181–202.

69. Surry KJM, Austin HJB, Fenster A, Peters TM. Poly(vinyl alcohol) cryogel phantoms for use in ultrasound and MR imaging. Phys Med Biol. 2004 Dec

21;49(24):5529–46.

70. Gebhardt J, Budinsky L, Reulbach U, Weyand M, Hess A, Ensminger S. Noninvasive Magnetic Resonance Imaging of Vessels Affected by Transplant Arteriosclerosis in an Experimental Mouse Aortic Allograft Model. Thorac Cardiovasc Surg. 2011 Mar;59(02):85–92.

71. Chernyak V, Rozenblit AM, Greenspun DT, Levine JL, Milikow DL, Chia FA, et al. Breast Reconstruction with Deep Inferior Epigastric Artery Perforator Flap: 3.0-T Gadolinium-enhanced MR Imaging for Preoperative Localization of Abdominal Wall Perforators [1]. Radiology. 2009 Feb;250(2):417–24.

72. Greenspun D, Vasile J, Levine J, Erhard H, Studinger R, Chernyak V, et al. Anatomic Imaging of Abdominal Perforator Flaps without Ionizing Radiation: Seeing Is Believing with Magnetic Resonance Imaging Angiography. J Reconstr Microsurg. 2010 Jan;26(01):037–44.

73. Elias Junior J, Santos AC dos, Koenigkam-Santos M, Nogueira-Barbosa MH, Muglia VF. Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética. Radiol Bras. 2008 Aug;41(4):263–7.

74. Natalin RA, Prince MR, Grossman ME, Silvers D, Landman J. Contemporary Applications and Limitations of Magnetic Resonance Imaging Contrast Materials. J Urol. 2010 Jan;183(1):27–33.

75. Foss C, Smith JK, Ortiz L, Hanevold C, Davis L. Gadolinium-Associated Nephrogenic Systemic Fibrosis in a 9-Year-Old Boy. Pediatr Dermatol. 2009 Sep;26(5):579–82.

76. Rose TA, Choi JW. Intravenous Imaging Contrast Media Complications: The Basics That Every Clinician Needs to Know. Am J Med. 2015 Sep;128(9):943–9.

77. Hassan CM, Peppas NA. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In:

Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2000 [cited 2015 Oct 25]. p. 37–65. Available from: http://link.springer.com/10.1007/3-540-46414-X_2

78. Stammen JA, Williams S, Ku DN, Guldberg RE. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. Biomaterials. 2001 Apr;22(8):799–806.

79. Spiller KL, Laurencin SJ, Charlton D, Maher SA, Lowman AM. Superporous hydrogels for cartilage repair: Evaluation of the morphological and mechanical properties. Acta Biomater. 2008 Jan;4(1):17–25.

80. Bach JS, Detrez F, Cherkaoui M, Cantournet S, Ku DN, Corté L. Hydrogel fibers for ACL prosthesis: Design and mechanical evaluation of PVA and PVA/UHMWPE fiber constructs. J Biomech. 2013 May;46(8):1463–70.

81. Wan WK, Campbell G, Zhang ZF, Hui AJ, Boughner DR. Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. J Biomed Mater Res. 2002;63(6):854–61.

82. Millon LE, Mohammadi H, Wan WK. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel for cardiovascular applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006 Nov 1;79B(2):305–11.

83. Alexandre N, Ribeiro J, Gärtner A, Pereira T, Amorim I, Fragoso J, et al. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting- *In vitro* and *in vivo* studies: Biocompatibility and Hemocompatibility of PVA Hydrogel. J Biomed Mater Res A. 2014 Feb;n/a – n/a.

84. Caiado F, Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. Fibrogenesis Tissue Repair. 2012;5(1):4.

85. Massia SP, Hubbell JA. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin

alpha 4 beta 1. J Biol Chem. 1992 Jul 15;267(20):14019–26.

86. Hudson SD, Hutter JL, Nieh M-P, Pencer J, Millon LE, Wan W. Characterization of anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel by small- and ultra-small-angle neutron scattering. J Chem Phys. 2009;130(3):034903.

87. Nakajima K, Fujita J, Matsui M, Tohyama S, Tamura N, Kanazawa H, et al. Gelatin Hydrogel Enhances the Engraftment of Transplanted Cardiomyocytes and Angiogenesis to Ameliorate Cardiac Function after Myocardial Infarction. Minamino T, editor. PLOS ONE. 2015 Jul 17;10(7):e0133308.

88. Dubruel P, Unger R, Van Vlierberghe S, Cnudde V, Jacobs PJS, Schacht E, et al. Porous Gelatin Hydrogels: 2. In Vitro Cell Interaction Study. Biomacromolecules. 2007 Feb;8(2):338–44.

89. Koshy ST, Ferrante TC, Lewin SA, Mooney DJ. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels. Biomaterials. 2014 Mar;35(8):2477–87.

90. Hato N, Nota J, Komobuchi H, Teraoka M, Yamada H, Gyo K, et al. Facial nerve decompression surgery using bFGF-impregnated biodegradable gelatin hydrogel in patients with Bell palsy. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2012 Apr;146(4):641–6.

91. Marui A, Tabata Y, Kojima S, Yamamoto M, Tambara K, Nishina T, et al. A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 2007 Aug;71(8):1181–6.

92. Navaei A, Truong D, Heffernan J, Cutts J, Brafman D, Sirianni RW, et al. PNIPAAm-based Biohybrid Injectable Hydrogel for Cardiac Tissue Engineering. Acta Biomater. 2015 Dec 12;

93. Bae S-H, Son S-R, Kumar Sakar S, Nguyen T-H, Kim S-W, Min Y-K, et al. Evaluation of the potential anti-adhesion effect of the PVA/Gelatin membrane:

PVA/Gelatin Membrane. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 May;102(4):840–9.

94. Alobaid N, Salacinski HJ, Sales KM, Ramesh B, Kannan RY, Hamilton G, et al. Nanocomposite Containing Bioactive Peptides Promote Endothelialisation by Circulating Progenitor Cells: An In vitro Evaluation. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006 Jul;32(1):76–83.

95. Ferreira LS, Gerecht S, Fuller J, Shieh HF, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. Biomaterials. 2007 Jun;28(17):2706–17.

96. Deng SX, Tomioka J, Debes JC, Fung YC. New experiments on shear modulus of elasticity of arteries. Am J Physiol. 1994 Jan;266(1 Pt 2):H1–10.

97. Assoul N, Flaud P, Chaouat M, Letourneur D, Bataille I. Mechanical properties of rat thoracic and abdominal aortas. J Biomech. 2008 Jul;41(10):2227–36.

98. Hansen B, Menkis AH, Vesely I. Longitudinal and radial distensibility of the porcine aortic root. Ann Thorac Surg. 1995 Aug;60(2 Suppl):S384–90.

99. Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. J Biomed Mater Res. 1977 May;11(3):423–34.

100. Wu X, Liu Y, Li X, Wen P, Zhang Y, Long Y, et al. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. Acta Biomater. 2010 Mar;6(3):1167–77.

101. Bobyn JD, Wilson GJ, MacGregor DC, Pilliar RM, Weatherly GC. Effect of pore size on the peel strength of attachment of fibrous tissue to porous-surfaced implants. J Biomed Mater Res. 1982 Sep;16(5):571–84.

102. Lack S, Dulong V, Picton L, Le Cerf D, Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. Carbohydr Res. 2007 May 21;342(7):943–53.

103. Peng HT, Martineau L, Hung A. Hydrogel–elastomer composite biomaterials: 4.

Experimental optimization of hydrogel–elastomer composite fibers for use as a wound dressing. J Mater Sci Mater Med. 2008 Apr;19(4):1803–13.

104. Vrana NE, Cahill PA, McGuinness GB. Endothelialization of PVA/gelatin cryogels for vascular tissue engineering: Effect of disturbed shear stress conditions. J Biomed Mater Res A. 2010;9999A:NA – NA.

105. Wise SG, Byrom MJ, Waterhouse A, Bannon PG, Ng MKC, Weiss AS. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. Acta Biomater. 2011 Jan;7(1):295–303.

106. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. J Vasc Surg. 2010 Jan;51(1):155–64.

107. Fukayama T, Takagi K, Tanaka R, Hatakeyama Y, Aytemiz D, Suzuki Y, et al. Biological Reaction to Small-Diameter Vascular Grafts Made of Silk Fibroin Implanted in the Abdominal Aortae of Rats. Ann Vasc Surg. 2015 Feb;29(2):341–52.

108. Merkle VM, Martin D, Hutchinson M, Tran PL, Behrens A, Hossainy S, et al. Hemocompatibility of Poly(vinyl alcohol)–Gelatin Core–Shell Electrospun Nanofibers: A Scaffold for Modulating Platelet Deposition and Activation. ACS Appl Mater Interfaces. 2015 Apr 22;7(15):8302–12.

109. Linh NTB, Min YK, Song H-Y, Lee B-T. Fabrication of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and evaluation of their material properties. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Oct;95B(1):184–91.

110. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. Nat Med. 2006 Mar;12(3):361–5.

111. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered

vascular graft: a multicentre cohort study. Lancet Lond Engl. 2009 Apr 25;373(9673):1440–6.

112. Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. J Vasc Surg. 2014 Nov;60(5):1353–7.

113. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. J Vasc Access. 2011 Mar;12(1):67–70.

114. Mahara A, Somekawa S, Kobayashi N, Hirano Y, Kimura Y, Fujisato T, et al. Tissue-engineered acellular small diameter long-bypass grafts with neointima-inducing activity. Biomaterials. 2015 Jul;58:54–62.

115. Holloway JL, Lowman AM, Palmese GR. Aging behavior of PVA hydrogels for soft tissue applications after in vitro swelling using osmotic pressure solutions. Acta Biomater. 2013 Feb;9(2):5013–21.

116. Holloway JL, Spiller KL, Lowman AM, Palmese GR. Analysis of the in vitro swelling behavior of poly(vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement. Acta Biomater. 2011 Jun;7(6):2477–82.

117. Fromageau J, Gennisson J-L, Schmitt C, Maurice RL, Mongrain R, Cloutier G. Estimation of polyvinyl alcohol cryogel mechanical properties with four ultrasound elastography methods and comparison with gold standard testings. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2007 Mar;54(3):498–509.

118. Willcox PJ, Howie DW, Schmidt-Rohr K, Hoagland DA, Gido SP, Pudjijanto S, et al. Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling. J Polym Sci Part B Polym Phys. 1999;37(24):3438–54.

119. Ohya S, Kidoaki S, Matsuda T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical

property of surface regions and cell adhesiveness. Biomaterials. 2005 Jun;26(16):3105–11.

120. Cascone MG, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G, Lazzeri L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(3):267–81.

121. Chong DST, Lindsey B, Dalby MJ, Gadegaard N, Seifalian AM, Hamilton G. Luminal Surface Engineering, "Micro and Nanopatterning": Potential for Self Endothelialising Vascular Grafts? Eur J Vasc Endovasc Surg. 2014 May;47(5):566–76.

122. Gutiérrez MC, García-Carvajal ZY, Jobbágy M, Rubio F, Yuste L, Rojo F, et al. Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. Adv Funct Mater. 2007 Nov 23;17(17):3505–13.

123. Wang H-Y, Inada T, Funakoshi K, Lu S-S. Inhibition of nucleation and growth of ice by poly(vinyl alcohol) in vitrification solution. Cryobiology. 2009 Aug;59(1):83–9.

124. Hasan A, Paul A, Memic A, Khademhosseini A. A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. Biomed Microdevices [Internet]. 2015 Oct [cited 2015 Oct 25];17(5). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10544-015-9993-2

125. Cutiongco MFA, Anderson DEJ, Hinds MT, Yim EKF. In vitro and ex vivo hemocompatibility of off-the-shelf modified poly(vinyl alcohol) vascular grafts. Acta Biomater [Internet]. 2015 Jul [cited 2015 Sep 11]; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115300374

126. Liliensiek SJ, Wood JA, Yong J, Auerbach R, Nealey PF, Murphy CJ. Modulation of human vascular endothelial cell behaviors by nanotopographic cues. Biomaterials. 2010 Jul;31(20):5418–26.

127. McCracken KE, Tran PL, You DJ, Slepian MJ, Yoon J-Y. Shear- vs. nanotopography-guided control of growth of endothelial cells on RGD-nanoparticle-nanowell arrays. J Biol Eng. 2013;7(1):11.

128. Ayres CE, Jha BS, Sell SA, Bowlin GL, Simpson DG. Nanotechnology in the design

of soft tissue scaffolds: innovations in structure and function. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010 Jan;2(1):20–34.

129. Holloway JL, Lowman AM, Palmese GR. The role of crystallization and phase separation in the formation of physically cross-linked PVA hydrogels. Soft Matter. 2013;9(3):826–33.

130. Lee JM, Haberer SA, Boughner DR. The bovine pericardial xenograft: I. Effect of fixation in aldehydes without constraint on the tensile viscoelastic properties of bovine pericardium. J Biomed Mater Res. 1989 May;23(5):457–75.

PUBLICATION SCIENTIFIC REPORT NATURE

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Design, characterization and *in vivo* performance of synthetic 2 mm-diameter vessel grafts made of PVA-gelatin blends

Received: 17 November 2017
Accepted: 24 April 2018
Published online: 09 May 2018

M. Atlan[1,2], T. Simon-Yarza[1], J. M. Ino[1], V. Hunsinger[1,2], L. Corté[3,4], P. Ou[1], R. Aid-Launais[1,5], M. Chaouat[1,6] & D. Letourneur[1]

Since the development of the first vascular grafts, fabrication of vessel replacements with diameters smaller than 6 mm remains a challenge. The present work aimed to develop PVA (poly (vinyl alcohol))-gelatin hybrids as tubes suitable for replacement of very small vessels and to evaluate their performance using a rat abdominal aorta interposition model. PVA-gelatin hybrid tubes with internal and external diameters of 1.4 mm and 1.8 mm, respectively, composed of 4 different gelatin ratios were prepared using a one-step strategy with both chemical and physical crosslinking. By 3D Time of Flight MRI, Doppler-Ultrasound, Computed Tomography angiography and histology, we demonstrated good patency rates with the 1% gelatin composition until the end of the study at 3 months (50% compared to 0% of PVA control grafts). A reduction of the patency rate during the time of implantation suggested some loss of properties of the hybrid material *in vivo*, further confirmed by mechanical evaluation until one year. In particular, stiffening and reduction of compliance of the PVA-gelatin grafts was demonstrated, which might explain the observed long-term changes in patency rate. These encouraging results confirm the potential of PVA-gelatin hybrids as ready-to-use vascular grafts for very small vessel replacement.

Since the construction of the first tissue engineered blood vessels[1], using a Dacron mesh as support, there are still only two types of synthetic materials used in the clinic for vessel replacement, namely polyethylene terephthalate (Dacron®) and polytetrafluoroethylene (PTFE)[2]. However, the use of these materials as first choice strategy is only established for middle to large vessels with diameters greater than 6 mm. For smaller vessels the gold standard is the autograft using patient saphenous vein (SV) or internal thoracic artery (ITA). Nevertheless, issues related to the use of autologous grafts are numerous: autologous vessels are not always available, their quality is often compromised and the extraction causes donor site morbidity. Moreover, autografts present important failure rates, as in the case of SV grafting with coronary artery bypass grafting and femoropopliteal bypass grafts that performed 50% failure rate at 10 years[3,4]. Despite promising tissue-engineering studies and intensive industrial development on the last decade on arterio-venous shunts for haemodialysis using autologous or allogenic cells, these products did not reach the market[5–8]. It is thus appropriate to develop ready-to-use materials that can be used as synthetic vascular grafts with diameters less than 6 mm.

Numerous materials are being explored, to be used as vascular grafts for small vessel replacement, such as polycaprolactone[9], polylactide[10], bi-hybrid polyurethane/poly (ethylene terephthalate)[11], bacterial nanocellulose[12] and decellularized aorta from animals[13]. In the last years, promising results by our group[14] and others[15,16] have already been obtained for the development of vascular grafts based on poly (vinyl alcohol) (PVA). PVA

[1]INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, X. Bichat Hospital, Paris Diderot University, Paris 13 University, 75018, Paris, France. [2]Faculty of Medicine, University Pierre et Marie Curie, Plastic Surgery Department, Hôpital Tenon, Paris, France. [3]MINES ParisTech, PSL Research University, MAT - Centre des Matériaux, CNRS UMR 7633, BP 87 91003, Evry, France. [4]ESPCI-Paris, PSL Research University, Matière Molle et Chimie, CNRS UMR 7167, Paris, 75005, France. [5]FRIM, INSERM UMS 034 Paris Diderot University, X. Bichat Hospital, 75018, Paris, France. [6]Plastic Surgery Department, Burn Unit, Paris Diderot University, Hôpital Saint Louis, Paris, France. M. Atlan and T. Simon-Yarza contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A. (email: Michael.atlan@aphp.fr) or T.S.-Y. (email: teresa.simon-yarza@inserm.fr)

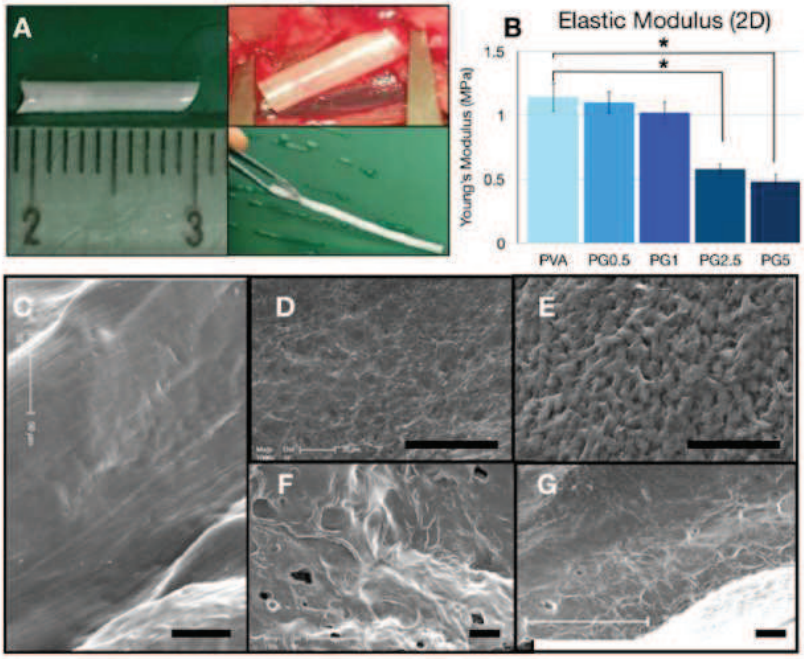


Figure 1. (A) PVA tube of 1 cm and handling of the grafts for the vascular replacement at the level of the abdominal aorta was easy and without collapse of the lumen. (B) Elastic modulus of PVA, PG0.5, PG1, PG2.5 and PG5 dry membranes measured at room temperature after less than 48 h after their manufacturing. (C–G) Scanning electron microscopy images of vascular grafts. Luminal surface of PVA (C) presented smooth surface, while addition of gelatin was associated to the formation of microscale irregularities in the luminal side (D–G). In the case of PG0.5 (D) and PG1 (E) quite homogeneous pores of 15–30 μm were observed, whereas higher gelatin content led to ridges larger than 100 μm (F: PG2.5; G: PG5). Scale bar: 50 μm. Graph represents average ± s.e.m.; $^*p < 0.05$.

has demonstrated to be an attractive synthetic polymer due to the combination of important properties such as availability, biocompatibility and low cost. It has been proposed for numerous tissue engineering applications, namely replacement of the cornea[17], vitreous[18], cartilage[19], ligament[20], skin[21] and cardiac valve[22]. In order to fulfil the requirements to be used as vascular graft, a previous work explored the combination of films of PVA with gelatin to prepare 2D hybrid materials[14]. Very satisfactory results were obtained in terms of mechanical properties, haemocompatibility and endothelial cell adhesion. The present work aims to further develop PVA-gelatin hybrids as tubes suitable for small vessel replacement (<2 mm) and to evaluate their performance as vascular grafts in an animal model. Using an innovative strategy in one step with both chemical (sodium trimetaphosphate, STMP) and physical (freezing) crosslinking, PVA-gelatin hybrid blend tubes with different gelatin ratios have been prepared and characterized. A first short *in vivo* study was performed to evaluate graft patency and select the best composition (1% gelatin) for a longer 3-month *in vivo* evaluation. Those *in vivo* performances at 3 months were assessed using several imaging techniques and histological evaluation. They were completed by measurement of released gelatin and mechanical characterization under *in vivo*-simulated conditions to investigate the effect of material aging.

Results

Grafts preparation and characterization. All the PVA and PVA-gelatin solutions were transparent, as well as the materials obtained after chemical cross-linking. Physical crosslinking by freeze-drying caused macroscopically visible changes and the 2D films and tubes became white and opaque, even after rehydration in PBS (Fig. 1A). There were no macroscopically detectable differences within the samples with different compositions. None of the tubes collapsed during the preparation or under storage conditions. The mean size of the outer diameter and inner diameter was very homogenous: 1.8 ± 0.4 mm and 1.4 ± 0.2 mm respectively (n = 8). Manufacturing process was highly reproducible and led to stable results for the dimensions and the macroscopic appearance.

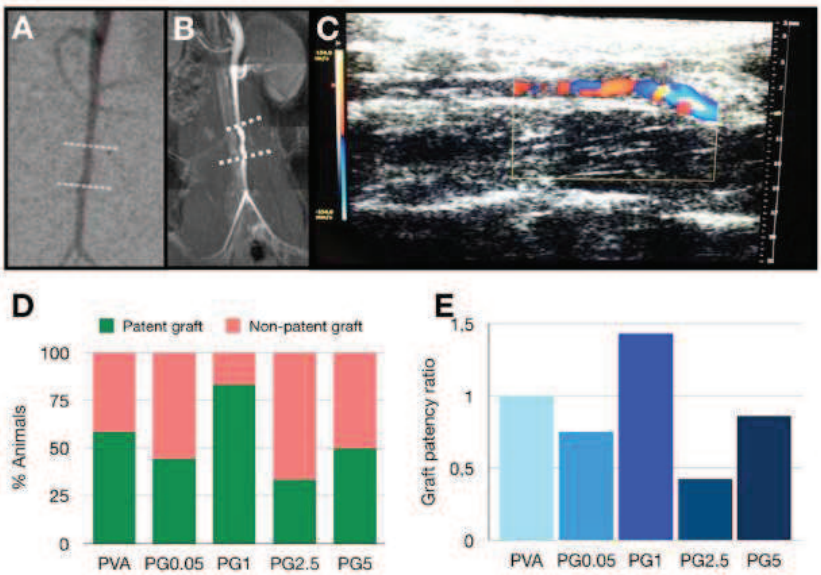


Figure 2. Graft patency evaluation. Three different techniques were used for patency evaluation: CT angiogram (A), TOF-MRA (B) and Doppler-US imaging (C). Graft patency after 7 days expressed as % of animals with patent or non-patent grafts (D) and as graft patency ratio compared to PVA control group (E). In A and B discontinuous white line indicates the presence of the graft. In C blood velocity within the implant is represented by a colour scale.

SEM images revealed that the addition of gelatin caused changes on the luminal surface of the grafts (Fig. 2C–G). PVA surface was smooth (Fig. 1C) whereas important roughness was observed for all the PVA-gelatin hybrids (Fig. 1D–G) with a different surface structuration clearly dependent on the gelatine content. Indeed, lower gelatin content was associated to small micropores with an average size of 15–30 μm, as observed for PG0.5 and PG1 (Fig. 1D,E, respectively), and samples with the highest gelatin contents presented larger and more heterogeneous microdomains, with elevated ridges of 100 μm and pores within 100 and 200 μm (see Fig. 1F for PG2.5 and Fig. 1G for PG5).

Elastic Moduli of all the materials as 2D membranes were calculated in their dried state at room temperature (Fig. 2B). Addition of gelatin was associated to a decrease of the elastic modulus that was concentration-dependent. Indeed, the slight non-significant decrease observed for PG0.5 and PG1 became much greater in the case of PG2.5 and PG5 whose elastic moduli were significantly lower compared to the PVA control group.

Suture retention, compliance and burst pressure were studied after graft preparations (Table 1). Suture retention (>50 gmf) was lower than that of human vessels but compatible for human application[23]. Burst pressure values for PVA and PG1 grafts were more than twice higher than the human healthy systolic arterial pressure. Graft compliance was very similar to those of native vessels (Table 1).

***In vivo* tests.** All animals included in the short and long-term study were sacrificed at the established time points. Until sacrifice all animals in the study remained in good health and presented no sign of local or systemic infection and no visual ischemia of legs except for one abdominal abscess and one abdominal wound dehiscence not related to the prosthesis.

Short-term study. All grafts were successfully implanted without any problems concerning artery size mismatch, burst or dilation of the implants, or suture complications.

A 7-day *in vivo* assay was performed to assess PG5, PG2.5, PG1 and PG0.5 graft patency of grafts with diameter <2 mm and without any anticoagulation treatment. It showed an improvement compared to the PVA control group only for the PG1 implant. Evaluation by Doppler-US (Supplementary Video 2), CT angiography and TOF-MRA (Supplementary Video 3) (Fig. 2A–C) showed 58% patency rate of the PVA control group (n = 12). PG0.5 (n = 9), PG2.5 (n = 9) and PG5 (n = 12) revealed lower values of graft patency, equivalent to 44%, 33% and 50%, respectively (Fig. 2D). Only the grafts prepared with 1% gelatin (n = 12) resulted in an improvement of the patency that was 83%, which corresponds to a 1.43 improvement rate compared to the PVA control group (Fig. 2E). Based on these results, PG1 was chosen for the long-term *in vivo* studies.

	Burst pressure (mm Hg)	Suture retention (gmf)	Compliance (%)	Elastic modulus (MPa)
PVA	703 ± 17 (n = 6)	93 ± 4 (n = 4)	3.0 ± 0.4 (n = 5)	1.38 ± 0.10 (n = 5)
PG1	614 ± 21 (n = 6)	83 ± 6 (n = 4)	3.9 ± 0.4 (n = 5)	0.783 ± 0.07 (n = 5)
PG1 (8 weeks PBS 37 °C)	802 ± 21 (n = 6)	104 ± 9 (n = 4)	3.3 ± 1.4 (n = 5)	1.09 ± 0.06 (n = 5)
Rat abdominal aorta	>3,000[24]	107 ± 11[24]	6.4 ± 0.4[24]	—
Human internal thoracic artery	2,031–4,225[5] (n = 13)	200 ± 119 (n = 9)[5]	4.5–6.2[5]	0.27 ± 0.05
Human saphenous vein	1,680–2,273[5]	196 ± 2 (n = 7)[5]	4.4 ± 0.8[28]	0.068 ± 0.15

Table 1. Burst pressure, suture retention and compliance of PVA and PG1 as prepared, PG1 after 2 months incubation in PBS at 37 °C. Parameter values of some rat and human arteries and veins commonly used as grafts are included as reference values (when known the number of analysed samples is indicated). Data for rat and human blood vessels were reported elsewhere[5,24,28].

Long-term study. After 4, 8 and 12 weeks, four animals in PVA and PG1 groups were randomly selected for graft evaluation by imaging. Immediately after, those animals were sacrificed to compare the results of *in vivo* imaging to histological observations.

Graft imaging revealed that after one month only 25% of animals in the PVA control group presented graft patency whereas in the PG1 group this value was 75%, (3-fold improvement compared to the PVA control group). The higher performance of PG1 grafts was confirmed after 8 and 12 weeks, when 100% of the animals in the PVA control group had occluded grafts, while in the PG1 group 50% of animals still presented graft patency (Fig. 3H).

All the patent grafts presented a good integration with the adjacent arteries. Grafts were found encapsulated in an inert 200–300 µm capsule (Supplementary Figure 1A). They did not present signs of degradation and maintained their tubular shape throughout the whole study (12 weeks). Aneurysm, dilation or any other major deformation was not observed in any of the implants (Supplementary Figure 1B). Any cell infiltration within the graft was observed, consistent with the lack of porosity of the PVA tubes (Fig. 4A).

TOF-MRA led to high definition images that allowed observing the development of collateral vascular network already after 2 months in those animals presenting thrombosis (Red arrow in Fig. 3E). Histological evaluation of the grafts always corresponded to the imaging-based diagnosis made by the 3 observers (Fig. 3A–G). Hematoxylin-eosin staining showed the development of a confluent endothelium in 70% of the PG1 patent grafts (Figs 3C and 4A). The tissues analysed by immunofluorescence demonstrated the formation of recognizable vascular tissue with a wall of smooth muscle cells and a luminal endothelial cell layer (Fig. 4B).

Further histological analysis allowed us to identify three different types of tissue evolutions after graft implantation (Fig. 5). In the case of PG1 patent grafts after three months, immunostaining confirmed the presence of a newly formed tissue with well-organized collagen fibers (Fig. 3D), slight hyperplasia, smooth muscle cells and endothelial cells. Besides, within the animals with non-patent grafts, histology revealed two different histological patterns, one characterized by the absence of smooth muscle cells and the other one presenting sparse smooth muscle cells next to the implant. In both cases, immunostaining was negative for endothelial cells. This suggests that after implantation, thrombosis occurred in some of the grafts. The other prostheses favoured the development of new tissue formation within the lumen of the graft. When this tissue was endothelialised, the graft remained patent, whereas in late thrombosed grafts endothelial cells were absent. PG1 grafts favoured the formation of SMA+ tissue in the grafts compared to PVA, as well as endothelialisation that was observed only in PG1 grafts.

Alizarin staining revealed progressive calcification after three months and some deposits of calcium phosphate could be detected. Other studies performed in the laboratory have demonstrated that calcification occurs after one year in a greater extent, even in patent grafts (results not shown), indicating that calcification is not always associated to graft failure. Finally, elastin fibers were not detected after orcein staining in all our samples.

Characterization of PVA-Gelatin 1% grafts. *In vivo* results demonstrated a clear benefit of the addition of 1% gelatin to the PVA prostheses. However, the graft patency observed after 1 week (83%) and 4 weeks (75%) was reduced after 8 and 12 weeks (50%) (Fig. 3H). There was therefore a negative tendency suggesting that the PG1 implants lose some of their properties after being implanted *in vivo*. To better understand this phenomenon, PG1 was further characterized under *in vivo* simulated conditions up to 12 weeks, to mimic the conditions of the long-term study.

Firstly, the interactions of PG1 and PVA with blood platelets were compared (Fig. 6A). In both cases, platelet adhesion was found to be greater than in the case of the BSA negative control group, but it remained significantly lower than the collagen positive control group. Nevertheless, there were no differences between the two materials, indicating that the thrombogenicity seems not responsible for the differences of *in vivo* performances between PVA and PG1.

The simple method to incorporate the gelatin to the PVA material consisted in physical addition, which means that the gelatin was not covalently linked to the PVA. Thus, gelatin release under simulated physiological conditions was studied, to confirm that the gelatin remained present in the implant for a time sufficient to promote lumen endothelialisation. Slow release of the gelatin was confirmed with only 4.6 ± 0.8% of the total gelatin content released after one week. After 12 weeks more than 50% of the gelatin still remained in the prostheses. This partial release can explain the differences on the PG1 luminal surface observed by SEM after incubation of PG1 for 12 weeks in PBS at 37 °C, characterized by slight changes of the pore size and of the roughness of the material (Fig. 6B).

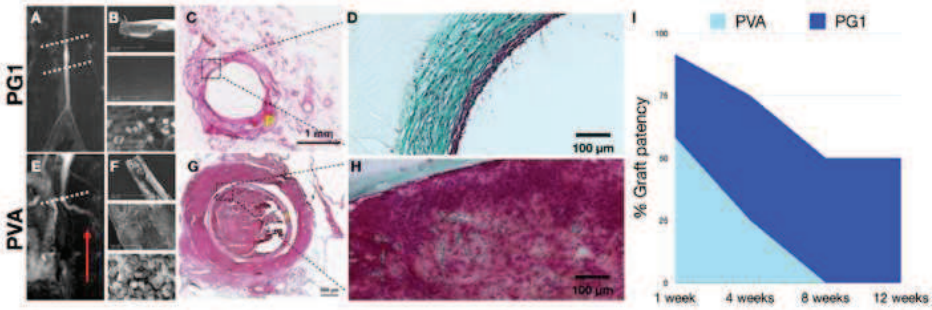


Figure 3. Long-term *in vivo* study. TOF-MRA allowed the identification of patent and thrombosed grafts (white discontinuous line in A and E respectively). TOF-MRA evidenced the development of collateral vasculature in animals with thrombosed grafts (red arrow in E) (image corresponds to 2 months time point). After graft explantation, SEM analysis of patent grafts (B) and non-patent grafts (F) confirmed the presence of thrombus in the lumen of the tubes in the case of non-patent grafts. Hematoxylin-eosin staining of the harvested implants (C and G) clearly evidenced the thrombus in the tube lumen (G), as well as new tissue formation within patent tubes (C). Masson's trichrome staining confirmed in green the presence of an organised extracellular matrix in the case of patent grafts (D) compared to the non-patent grafts (H), where collagen deposits appeared in the thrombus. Imaging and histology throughout 12 weeks showed a clear improvement of graft patency in PG1 group compared to the control PVA group (I). P in yellow stands for vascular Prosthesis.

Mechanical properties under simulated *in vivo* conditions. Suture retention, compliance and burst pressure data of PVA and PG1 as prepared and after 2 months incubation under physiological simulated conditions are compiled in Table 1. PVA and PG1 presented adequate mechanical properties to be used as vascular grafts. Suture retention remained in all cases higher than 50 gmf, value established as satisfactory for surgery[23]. PG1 as prepared showed slightly lower suture retention (83 ± 6 gmf) compared to PVA (93 ± 4 gmf), but the difference was not significant. After 2 months incubation in PBS at 37 °C, suture retention of PG1 was significantly increased up to 104 ± 9 gmf, higher than that of PVA. Graft compliance was in all cases very similar to those of ITA and SV. In the case of grafts evaluated after preparation, compliance was higher for PG1 (3.9 ± 0.4%) compared to PVA (3.0 ± 0.4%), but this difference was decreased after 2 months, with PG1 compliance of 3.3 ± 1.4%. Similarly, PG1 initial burst pressure was inferior to PVA value (614 ± 21 mm Hg and 703 ± 17 respectively), but after 2 months incubation, PG1 burst pressure significantly increased to 802 ± 21 mm Hg. In all cases, this represented more than twice the human healthy systolic arterial pressures.

Ageing of the material, *i.e.* the evolution of the implants mechanical properties under simulated physiological conditions, was assessed using uniaxial tensile testing in physiological serum at 37 °C (Supplementary Video 4). The tensile force-strain curves for the 1st and 500th cycles are shown in Fig. 7A,B, respectively, for both PVA and PG1 tubes. All grafts exhibited a non-linear elastic response and negligible permanent elongation even after 500 cycles. PVA tubes were significantly stiffer than PG1 tubes. This difference was still observed after 500 cycles even though both PVA and PG1 tubes get substantially softer.

Besides, the values of Young's modulus for tubes (3D) were compared to those for films (2D) in Fig. 7D. As previously mentioned, the elastic modulus in 2D films was similar for both PVA (1.14 ± 0.11 MPa) and PG1 (1.02 ± 0.09 MPa). On the contrary, for tubes under *in vivo*-like conditions (physiological serum at 37 °C), PVA tubes had a higher modulus than PG1 tubes and the elastic modulus was higher for PVA tubes (1.39 ± 0.10 MPa) and lower for PG1 tubes (0.73 ± 0.07 MPa) as compared to 2D values.

To perform a deeper evaluation of the effect of aging on the mechanical properties of the grafts, tubes of PVA and PG1 were kept at 37 °C in PBS and were tested mechanically with the same protocol after different storage times. The corresponding elastic moduli are shown in Fig. 7F and G for the 1st and the 500th cycles, respectively. PVA tubes kept a stable elastic modulus over time, with little differences even after 1 year storage. On the contrary, PG1 tubes were found to become significantly stiffer with time, no matter the number of cycles, with a modulus increasing from 0.73 ± 0.07 MPa to 1.09 ± 0.06 MPa after 2 months of incubation. Interestingly, the values of Young's moduli for PG1 tubes were found to have the same order of magnitude as human internal thoracic artery values.

The effect of aging on the mechanical properties was further characterized by comparing PG1 tubes after 2 month storage at 37 °C and at 4 °C, well below the melting point of gelatin. The corresponding tensile force-strain curves are shown in Fig. 7C for the 1st tensile cycle. The tensile response of the grafts after storage at 4 °C was found to be significantly softer than that of the grafts stored at 37 °C during the same time. In particular, the values of the Young's modulus for 4 °C storage remains very close to the values measured right after fabrication, as shown in Fig. 7E. The stability of the mechanical behaviour at 4 °C suggests that the graft microstructure and composition are preserved while they are progressively altered under *in vivo*-like conditions.

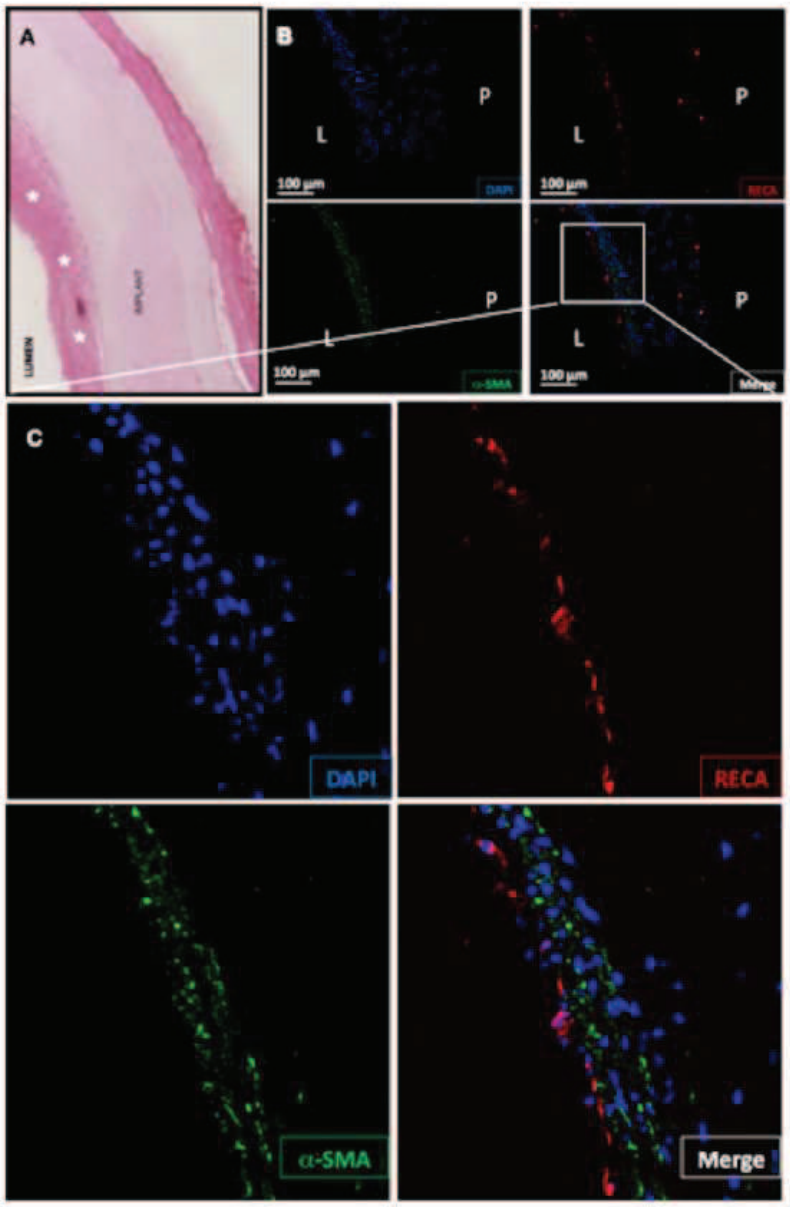


Figure 4. PG1 patent tube 12 weeks after implantation. Hematoxylin-eosin (A) demonstrated the presence of multilayered cellular organization, with a confluent newly formed tissue (white stars). Any cell infiltration was observed within the graft. Immunofluorescence images (B and C) confirmed the presence of endothelial cells in red (RECA) and smooth muscle cells in green (alpha-SMA) within the endothelium. (Nucleus stained in blue).

Discussion

In the reported study, a < 2 mm off-the-shelf prosthesis with *in situ* endothelialisation was preferred to vascular pre-seeding to alleviate the difficulties associated to *in vitro* cell culture, variability associated to autologous strategy or immunological response with allogenic cells, requirement of specialized equipment and personals[2].

The preparation method described here allowed the fabrication of 1.4 mm internal diameter tubes and 400 µm wall thickness (rat aorta thickness), in an easy, reproducible and inexpensive fashion. Combination of PVA and

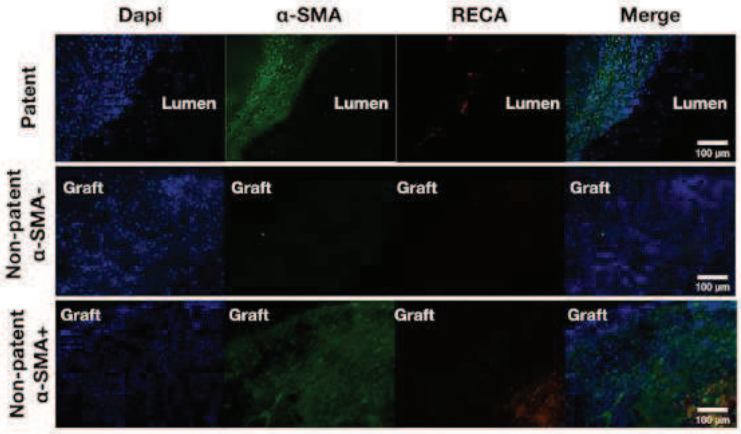


Figure 5. Representative pictures of tissues following graft implantation. Patent grafts presented new tissue formed within the lumen characterized by α-SMA+ and RECA+ cells. In the case of non-patent grafts, α-SMA+ cells were found only in some cases, and cells were always RECA− (note that the red staining in the case of Non-patent SMA+ corresponds to autofluorescence of red blood cells in the thrombus.

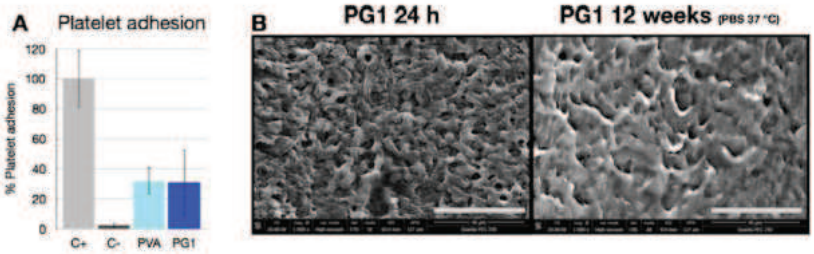


Figure 6. (**A**) Platelet adhesion on the PVA and PG1 surface. Collagen positive control group (C+) and BSA negative control group (C−) were used. Graph represents average ± s.e.m. (**B**) Luminal surface of PG1 tubes as prepared (24 h) and 2 months after incubation in PBS at 37 °C. Scale bar: 40 µm.

gelatin to form hybrid 3D prostheses aimed at taking advantage of the relevant mechanical and chemical properties of both materials. Considering that the three principal causes of graft failure, namely thrombosis, intimal hyperplasia and atherosclerosis, are intimately related to incomplete lumen endothelialisation and compliance mismatch between the prosthesis and the native vessel, gelatin was chosen to assure endothelial cell adhesion on the lumen of PVA tubes that possess appropriate mechanical properties for vessel replacement[24]. Keeping in mind that the preparation method consisted of only one freeze-thaw step, one could expect a low elastic modulus not suitable for implantation. Other authors have reported PVA cryogel preparation with three or more freeze-thaw cycles[25]. The high elastic modulus obtained here is the result of two simultaneous ways of crosslinking, physical and chemical, mediated by freeze-thaw cycles and the crosslinker STMP, respectively, previously described[14,24], together with the use of a high molecular weight PVA (84–124 kDa). Addition of gelatin, which is softer than PVA, decreased the Young's modulus of implants (Fig. 6A), but the mechanical properties appeared to be dominated by PVA, in accordance to previous observations by Liu *et al.*[26,27]. Suture retention of PVA and PG1 tubes was found to be lower than that of human vessels but compatible for human application, remaining in all cases over 50 gmf, the minimal value considered satisfactory to avoid any surgical or post-implantation anastomotic complications[23]. PG1 burst pressure was inferior to PVA value (614 ± 21 mm Hg and 703 ± 17, respectively) but both presented values more than twice the human healthy systolic arterial pressure. Graft compliance for both PG1 and PVA grafts (PG1 3.9 ± 0.4% and PVA 3.0 ± 0.4%) was very close to that of the human ITA (4.5–6.2%) and human SV (3.6–5.2%)[5,24,28] (Table 1). In particular, compliance of PG1 (3.9 ± 0.4%) was well above those of clinical synthetic grafts PTFE (1.6 ± 0.2%) and PET (1.9 ± 0.3%), as reported in the literature[28,29]. Compliance mismatch between synthetic grafts and native arteries has been demonstrated to be a determining factor for long-term graft patency. Indeed, Salacinski *et al.* performed linear regression analysis of compliance values and

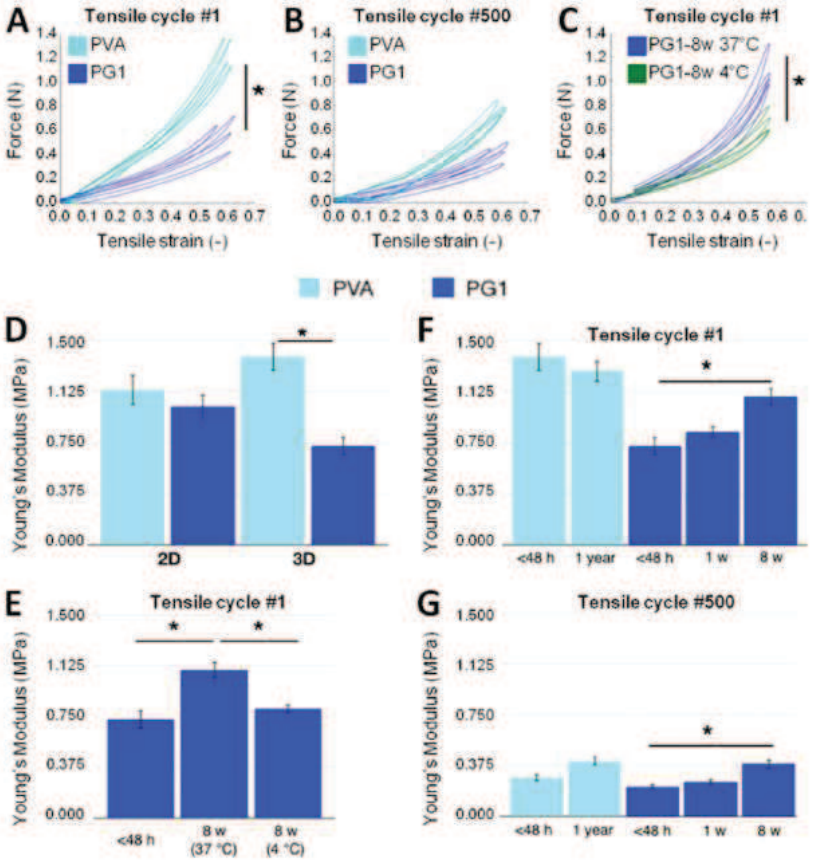


Figure 7. Evolution of the mechanical properties of PVA and PG1grafts under physiological simulated conditions. (A,B) Force-strain curves of PVA and PG1 grafts measured less than 48 hours after fabrication for the 1st tensile cycle (A) and the 500th tensile cycle (B). (C) Force-strain curves of PG1 grafts measured after 8 weeks in PBS at 37 °C or 4 °C (1st tensile cycle). (D) Comparison of the Young's elastic moduli of PVA and PG1 prepared as membranes (2D) or as tubular grafts (3D) in PBS 37 °C less than 48 hours after fabrication. (E) Elastic Modulus of PG1 3D grafts measured less than 48 hours after fabrication, and after 8 weeks in PBS at 37 °C or 4 °C. (F,G) Young's modulus of PVA and PG1 3D grafts measured less than 48 hours after fabrication and after different storage times in PBS at 37 °C for the 1st (F) and the 500th (G) tensile cycle. Graphs represent average± s.e.m.; *$p < 0.05$.

patency rates of various biological and prosthetic grafts, demonstrating a highly significant correlation between compliance mismatch and graft patency decrease[28]. Higher patency rates were associated to compliance values near to 4%, as those observed for PG1 prostheses in this study, whereas PTFE and PET compliance values near 2% were associated to the lower patency rates.

A previous study already demonstrated that PVA-gelatin films promoted *in vitro* endothelial cell adhesion compared to PVA films[14]. This phenomenon was associated to both chemical and topographic changes. Indeed, gelatin is well known to possess in its structure adhesive cell motifs such as Arg-Gly-Asp, but it also causes concentration-dependent modifications on the surface topographies (Fig. 1C–G) that are known to modulate cell adhesion[30].

Addition of 1% gelatin to PVA on model 2D surfaces increased cell adhesion, compared to 5% and 10% gelatin ratios[14]. This was attributed to heterogeneous distribution of gelatin that accumulated on the edges of the micro-domains observed with electron microscopy (Fig. 1F,G). These previous results are consistent with *in vivo* observations in the present work and could explain the better performance of PG1 vascular grafts after one week, due to faster *in situ* endothelialisation of the graft and prevention of graft failure. Moreover, presence of 1% gelatin

in the graft allowed better patency results after one week (83%) than with PVA-heparin hybrid implants (not included in this work) that caused only 62% patency rate. This suggested that accelerated *in situ* endothelialisation of PVA implants by gelatin was an efficient strategy to avoid thrombosis. Moreover, since platelet adhesion of PG1 did not differ from PVA (Fig. 5A), it is possible to conclude that platelet did not trigger the PG1 better outcomes.

Long-term *in vivo* studies confirmed the excellent capabilities of <2 mm PG1 vascular grafts without anticoagulant treatments of animals, with patency rates of 75% after 4 weeks and 50% after 8 and 12 weeks. This work demonstrates an improvement compared to a previous study by some of us[24], were PVA tubular grafts fabricated by gluing or stitching a PVA film were followed *in vivo* during 7 days. Indeed, to the best of our knowledge, this is the longest and best patency rate reported in the literature for PVA grafts.

In this work graft patency was evaluated by 3 different imaging techniques. TOF-MRA was successfully employed and provided reliable information on patency without the use of any contrast agent. TOF-MRA was a fast technique that did not present evaluation limits due to low vessel diameter and that was not operator-dependent as in the case of Doppler-US. Histology confirmed imaging-based diagnosis in 100% cases. Moreover, it demonstrated a high rate of *in situ* endothelialisation with 70% of PG1 patent grafts in the study presenting a confluent endothelium as well as the formation of recognizable vascular tissue with a wall of smooth muscle cells and a luminal endothelial cells layer (Fig. 4B).

The increase of thrombosis at late time points (50% at 2 and 3 months) suggested a decrease of PG1 performance as vascular graft over time. The phenomenon of gelatin release could not explain graft failure since it was confirmed in other studies in the laboratory (results not shown) that new tissue formation occurs during the first 7 days after implantation, and at that time less than 5% gelatin released occurred *in vitro*. After 8 weeks more than 50% of gelatin was still found within the implant. This release was accompanied with slight changes of the topography (Fig. 5B) that could not justify either graft failure.

After implantation, grafts evolve and suffer remodelling or aging that can drastically modify chemical and mechanical properties. Even if harvested implants were found intact and without any signs of degradation or morphological changes, mechanical evaluation after storage under physiological conditions (PBS, pH 7.4, 37 °C) demonstrated important changes on the mechanical properties. Results showed that PG1 after manufacturing was more flexible and compliant than PVA, but the aging process transformed it into a stiffer material after 2 months at 37 °C, becoming a graft with similar mechanical properties to original PVA. These results were confirmed at cycle 1 and cycle 500 (Fig. 6F,G). Several tensile cycles were applied to simulate mechanical fatigue and the number of cycles resulted in important changes in the elastic moduli both for PVA and PG1, whose elastic moduli were significantly reduced with the number of cycles (Fig. 6F,G). In this aging process, temperature played a central role as demonstrated by the evaluation of PG1 grafts stored for 2 months in PBS at 37 °C or 4 °C (Fig. 6E). Elastic modulus of PG1 after 2 months of storage at 4 °C was similar to the value of PG1 after preparation. Together with measurements of gelatin release, these mechanical results suggest that the changes in mechanical properties *in vivo* are related to some modifications of the gelatin phase which melts at 37 °C and leaks out of the grafts. All together, results indicate that the initial good mechanical properties of PG1 to be used as a vascular graft are lost under *in vivo* conditions. This lost of mechanical properties is consistent with the decrease of graft patency for PG1 implants over time. This is also supported by histological results that revealed that in some cases, prior to thrombosis, new tissue formation within the graft occurs. Indeed, after implantation the graft presents the appropriate mechanical properties to assure tissue formation. In a latter time, thrombosis occurs, probably due to the lost of mechanical properties.

In conclusion, tubular grafts of 1.4 mm in diameter and thickness of the rat aorta made of PVA with 1% gelatin were prepared through a double crosslinking process that gave rise to mechanical properties very close to those of human autologous gold standards. Grafts were evaluated *in vivo* and allowed *in situ* endothelialisation, as well as the formation of recognizable vascular tissue with a wall of smooth muscle cells and a luminal endothelial cells layer, confirming that gelatin at the appropriate dose is a major factor to initiate *in situ* cell adhesion. Endothelialisation was accompanied by high patency rates after 1, 4, 8 and 12 weeks, 100%, 75%, 50% and 50% respectively. After 8 and 12 weeks graft failure augmented, possibly due to changes in the mechanical properties, as suggested by the evolution of the mechanical properties under *in vivo* simulated conditions. Graft evolution is the result of multiple factors and varies from one individual to another, being not possible to identify an exclusive cause of graft failure. Results in this study highlight the importance of PVA-gelatin graft aging that must be taken into account for future works in order to reach very long-term graft patency.

Materials and Methods

PVA and PVA-gelatin hybrid graft preparation. Grafts were prepared using a chemical crosslinking process adapted from a previous study[14]. Briefly, PVA (Mw 84–124 kDa, saponification degree >99.9%) and gelatin type B from bovine skin (Sigma, G9391, 225 Bloom number) were dissolved in water under magnetic stirring at 90 °C for 3 h. Different gelatin concentrations were set at 0%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5% (w/w) and labelled PVA, PG0.5, PG1, PG2.5 and PG5 respectively. Once the solution was cooled down to room temperature, nine grams of the solution were progressively mixed with 750 μL of 15% (w/v) crosslinker STMP and 300 μL of 30% (w/v) sodium hydroxide under magnetic stirring. To avoid air bubbles, the blend was centrifuged (4,300 rpm for 10 min). The PVA and PVA-gelatin solutions were cast in a tubular mold centered by a rod and covered with a silicon cap, and stored at −80 °C for 15 min to allow gelation. Then the mold was taken out and the crosslinked material was recovered as a jelly tube ready to freeze-drying. The freeze-drying process was conducted as follows: a) freezing cycle consisted of a cooling phase to reach −20 °C in 5 h 30 min, that is −0.1 °C/min, followed by a stationary phase of 1 h 30 min at −20 °C, b) primary freeze-drying at 0.050 mbar (−18 °C were reached in 4 min, that is +0.5 °C/min and then temperature rose up to −5 °C in 2 h 10 min, corresponding to +0.1 °C/min rate), c) a steady state of 8 h at −5 °C, then 10 °C were reached in 1 h 15 min, that is +0.2 °C/min. At the end of freeze-drying cycle tubes were immerged in phosphate buffer saline (PBS) for 10 min under magnetic stirring and taken

out from the rod to be cut. Each tube was kept in PBS at 4 °C until implantation. Tube final internal and external diameters were 1.4 mm and 1.8 mm, respectively.

For some characterization tests, materials presenting the same composition were prepared as 2D films. In that case, after adding the crosslinker, the solution was poured within two glasses separated by a silicon spacer. The final thickness of the films was 0.4 mm.

For the aging studies, 2D films and tubes were kept in PBS at 37 °C or 4 °C under static conditions.

Scanning electron microscopy. The luminal surface of the tubes was assessed by scanning electron microscopy (SEM) using a Philips XL 30 ESEM-FEG at an accelerating voltage of 15 keV and pressure of 4 T. Samples were frozen at −20 °C and coated with gold/palladium. Four samples were tested for each tube composition.

Gelatin release. PVA-gelatin hybrid tubes (n = 7) were placed in a glass flask containing 5 ml PBS at 37 °C for 61 days. After 7 days supernatant was collected and replaced by the same volume of PBS that was kept unchanged until the end of the study. Supernatant was kept at −80 °C before analysis. Quantification of released gelatin was performed using Indirect Competitive Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) (IDBiotech- Immuno Diffusion Biotechnologies).

Mechanical properties. *Tensile response and elastic modulus.* Two types of measurements were done to determine the elastic modulus depending on the shaping. The tensile properties of dry 2D films were measured using a uniaxial tensile testing machine (Instron 3745) equipped with a 10 N load cell and a crosshead speed of 10 mm/min under standard room conditions. Samples of 20 mm × 4 mm (length × width) were mounted onto pneumatic grips and stretched to failure. Force versus elongation data were recorded and the stress–strain plots were generated. Values of the stress and elongation at break were calculated as the average of 5 independent measurements (n = 4).

Ageing of the material, *i.e.* the evolution of the implants mechanical properties under simulated physiological conditions, was assessed. In order to simulate the *in vivo* conditions, the tensile properties of tubular constructs were characterized using a uniaxial tensile testing machine (Electroforce apparatus, Bose) equipped with a liquid chamber (NaCl 0.9% 37 °C) and 2 N load cell. Samples of 1 cm length were tested fully immersed. The tubular samples were mounted with a 6–7 mm length between clamps and attention was paid to avoid air bubbles in the lumen. The length at rest, L_0, was defined by applying a slight preloading of 0.04 N prior to testing. For each sample, a displacement controlled sinusoidal stretching was applied for 500 cycles at 2 Hz (*in vivo* pulse rate can range from 0.7 to 3 Hz) between 0 and 60% of L_0. A number of 500 cycles was applied as it was considered to produce stabilized cycles, for which the force at maximum stretch (60% strain) did not vary by more than 1–2% within 100 cycles. Cyclic stretching was applied in displacement-controlled mode. The strain range between 0 and 50–60% was chosen to give conservative testing conditions. Four samples per composition were measured and at least four measurements per sample were performed and video recorded. In these experiments, the tensile strain was calculated as $(L - L_0)/L_0$, where L is the instantaneous length of the tube. Nominal tensile stress was calculated by dividing the force by the initial cross-sectional area of the tubes using the formula $4F/[\pi(d_o^2 - d_i^2)]$, where F is the tensile force, d_o and d_i the outer and inner diameters of the tube at rest, respectively. Due to the non-linearity of the tensile response, the Young's moduli were calculated from the slope of the stress-strain curves at a strain of 20%.

Suture retention, burst pressure and compliance. To measure the suture-retention strength, we pulled a single throw of 6/0 Prolene suture (Ethicon) through the tube samples (n = 5) at a distance of 1 to 2 mm from the free edge, and progressively increased the weight (gram force) applied to the suture until rupture. The burst pressure was evaluated by increasing the hydrostatic pressure within the tube from a carbon dioxide tank until failure, and the burst pressure was recorded from the tank gauge (n = 6). Compliance C was defined as the inverse of Peterson's elastic modulus and calculated on tubular samples by measuring the change in diameter while varying the pressure within the tube: C = (d120 − d80)/d80, where d80 and d120 are the diameters of the tube at the pressure of 80 and 120 mmHg, respectively.

Platelet adhesion. Static platelet adhesion was measured *in vitro* using washed platelet suspensions. Blood was harvested from healthy volunteers into vacuum blood-collection tubes (Vacutainer® system, Beckton Dickinson) containing trisodium citrate acid-citric-dextrose. Washed platelet suspensions were prepared by centrifugation of the blood and analysed as previously reported[16]. In brief, platelets were suspended at a final concentration of 2×10^8 platelets/mL. PVA and PVA-gelatin films were placed in contact with the platelets suspension at room temperature under rotation for 1 h. Adherent platelets were quantified by assessing the endogenous phosphatase activity using a pNPP buffer (0.1 M citrate, pH 5.4, 0.1% Triton X-100, 5 mm paranitrophenylphosphate). After addition of 25 µl of 1 N NaOH to stop the reaction, supernatants were harvested and absorbance was measured at 405 nm and data contrasted with a calibration curve. Bovine serum albumin (BSA)-coated and collagen-coated wells were used as negative and positive controls, respectively.

Surgical procedure. The procedure and the animal care complied with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research. The studies were carried out under authorization number 006235 of the *Ministere de l'Agriculture*, France. All animals were kept at 20–26 °C controlled temperature, under a regular 12 h light cycle. Food and water were provided ad libitum and environmental enrichment was assured. The studies were carried out under authorization number 006235 of the *Ministere de l'Agriculture*, France. Two senior surgeons and one junior surgeon performed the implantations. Each surgeon was trained to get minimal hematoma and complication, and to be able to perform with PVA tubes more than 50% of patent

anastomosis at one week, controlled by Doppler Ultrasound (US). In total 54 male Wistar adult rats (12–15 weeks, mean weight 618 g) were assigned to five groups (PVA, PG0.5, PG1, PG2.5 and PG5) following a blinded method for the type of implant under study. The surgeons were not aware of the type of vascular implant, which appeared macroscopically identical. The histologist and the person in charge of the imaging were also blinded for the type of implant studied.

Vascular grafts consisted in tubular grafts of 10 mm length, 1.4 mm inner diameter and 1.8 mm external diameter, and were implanted into the abdominal aorta of adult male (Supplementary Video 1). Rats were anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally administered (5 mg/100 g). In aseptic conditions, under an operating microscope and through a midline laparotomy, the infrarenal aorta was exposed and aortic branches in this segment were ligated with 9/0 monofilament Ethilon® nylon sutures. A 10 mm segment of the infrarenal aorta was transected, and replaced by the tubular grafts with end-to-end interrupted anastomosis using 10/0 Ethilon® sutures. The number of stitches used for each anastomosis ranged from 12 to 14. To avoid irreversible ischemia and paralysis, ligature of the infrarenal aorta did not exceed 70 min (the range of ischemia time was 37–67 min). The graft patency was visually confirmed after anastomosis. Neither anticoagulants nor antiplatelet were administered post-surgery. The rats were monitored daily for any signs of pain or disability until sacrifice. If irreversible damage occurred due to hypoxia this was visible within the first hours (less than 12 hours) and animals were automatically sacrificed and excluded from the study.

***In vivo* imaging.** Doppler-US non-invasive imaging were performed with a 14 MHz probe (PowerVisions 6000 with Ultrasound Image Workstation 300 A, Toshiba, Japan). Angiography was performed by injection of 1 mL of contrast agent, Hexabrix 320 (Guerbet, France), through the catheterized thoracic aorta and the blood flow was assessed using a Philips BV Endura device (Amsterdam, the Netherlands). 3D Time of Flight Magnetic Resonance Angiography (TOF-MRA) was also used to evaluate implant patency in the Radiology department of X Bichat Hospital in Paris (IRM 3 T General Electric). TOF-MRA is commonly performed in clinical practice and allows rapid and reliable small vessels patency evaluation without the use of contrast agent. Doppler-US and angiography were used in the short-term study after 1 week of implantation and TOF-MRA was used in the long-term study for imaging after 4, 8 and 12 weeks of implantation.

Graft explantation, tissue processing and histology. Under general anaesthesia, the aorta was clamped to permit the harvesting 3 mm above and under the vascular implant, immediately after rinsing the whole with saline 0.9% without any leakage of the lumen of the tube. Microvascular implants were then fixed in 4% paraformaldehyde solution, embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature compound) and frozen in isopentane cooled in a liquid nitrogen bath. A cryomicrotome was used to prepare 6 µm thick transverse sections of the grafts from the middle of the tube, as well as longitudinal sections. Samples were stained with hematoxylin eosin following a classic protocol: Mayer hematoxilin for 4 minutes, rinsing in tap water, differentiation in 1% acid acetic solution, rinsing in tap water, stain in eosin for 2 minutes, rinsing in tap water, dehydration and mounting. Masson's trichrome staining for collagen fibers was conducted as follows: Mayer hematoxilin for 10 minutes, rinsing in tap water, Fuchsin-Ponceau solution for 5 minutes followed by differentiation in phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution for 5 minutes, light green for 5 minutes, rinsing in 1% acetic acid, dehydration and mounting. Orcein to for elastic fibers observation was performed by 15 minutes in orcein solution, rinsing in tap water, rinsing in 1% lithium carbonate, dehydration and mounting. Calcium in the tissues was detected using Alizarin red staining: 2 minutes in alizarin solution, 20 seconds in acetone, dehydration and mounting. After staining, NanoZoomer digital slide scanner was used for image analysis.

Endothelial cells were visualized using RECA1 primary antibody (1:100, MCA970Serotec) and Alexa Fluor® 594 secondary antibody (1:100, A11005 Invitrogen). Smooth muscle cells were visualized using α-smooth muscle actin primary antibody (Ab5694, 2 µg/mL, AbCam) and Alexa fluor 488® secondary antibody (1:50, A11034 Molecular Probes). Nuclei were stained with DAPI (Sigma, 1:10,000). Negative control sections were incubated with the secondary or isotypes antibodies from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Representative immunofluorescence images were taken using a Leica DMRXA microscope (Leica Microsystems).

Statistical analysis. Data are presented as mean ± standard error of the mean (s.e.m.). One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test was used to examine the significance of results between groups. The Kruskall-Wallis test was used to compare nonparametric values. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

References

1. Weinberg, C. B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**, 397–400 (1986).
2. Pashneh-Tala, S., MacNeil, S. & Claeyssens, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft— Past, Present, and Future. *Tissue Engineering: Part B* **22**, 68–100 (2016).
3. Harskamp, R. E., Lopes, R. D., Baisden, C. E., de Winter, R. J. & Alexander, J. H. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Annals of surgery* **257**, 824–833 (2013).
4. Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J. & van Bockel, J. H. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *European journal of vascular and endovascular surgery* **27**, 357–362 (2004).
5. L'Heureux, N. *et al.* Human Tissue Engineered Blood Vessel For Adult Arterial. *Nature Medicine* **12**, 361–365 (2006).
6. Quint, C., Arief, M., Muto, A., Dardik, A. & Niklason, L. E. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *Journal of vascular surgery* **55**, 790–798 (2012).
7. McAllister, T. N. *et al.* Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet* **373**, 1440–1446 (2009).
8. Lawson, J. H. *et al.* Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials. *The Lancet* **387**, 2026–2034 (2016).
9. Li, W. *et al.* Long-term evaluation of vascular grafts with circumferentially aligned microfibers in a rat abdominal aorta replacement model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (2018).

10. Popryadukhin, P. V. *et al.* Tissue-Engineered Vascular Graft of Small Diameter Based on Electrospun Polylactide Microfibers. *International journal of biomaterials* **2017**, 9034186 (2017).
11. Khodadoust, M., Mohebbi-Kalhori, D. & Jirofti, N. Fabrication and Characterization of Electrospun Bi-Hybrid PU/PET Scaffolds for Small-Diameter Vascular Grafts Applications. *Cardiovascular engineering and technology* **9**, 73–83 (2018).
12. Weber, C. *et al.* Patency and *in vivo* compatibility of bacterial nanocellulose grafts as small-diameter vascular substitute. *Journal of vascular surgery* (2018).
13. Ma, X. *et al.* Development and *in vivo* validation of tissue-engineered, small-diameter vascular grafts from decellularized aortae of fetal pigs and canine vascular endothelial cells. *Journal of cardiothoracic surgery* **12**, 101 (2018).
14. Ino, J. M. *et al.* Evaluation of hemocompatibility and endothelialization of hybrid poly(vinyl alcohol) (PVA)/gelatin polymer films. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **101**, 1549–1559 (2013).
15. Alexandre, N. *et al.* Long term performance evaluation of small-diameter vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and dextran and MSCs-based therapies using the ovine pre-clinical animal model. *International Journal of Pharmaceutics* **523**, 515–530 (2017).
16. Alexandre, N. *et al.* Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting- *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102**, 4262–4275 (2014).
17. Jiang, H. *et al.* Property-based design: optimization and characterization of polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel and PVA-matrix composite for artificial cornea. *Journal of materials science. Materials in medicine* **25**, 941–952 (2014).
18. Leone, G. *et al.* PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *Journal of materials science. Materials in medicine* **21**, 2491–2500 (2010).
19. Stammen, J. A., Williams, S., Ku, D. N. & Guldberg, R. E. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials* **22**, 799–806 (2001).
20. Bach, J. S. *et al.* Hydrogel fibers for ACL prosthesis: design and mechanical evaluation of PVA and PVA/UHMWPE fiber constructs. *Journal of biomechanics* **46**, 1463–1470 (2013).
21. Bourke, S. L. *et al.* A photo-crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel growth factor release vehicle for wound healing applications. *AAPS pharm Sci* **5**, E33 (2003).
22. Wan, W. K., Campbell, G., Zhang, Z. F., Hui, A. J. & Boughner, D. R. Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *Journal of biomedical materials research* **63**, 854–861 (2002).
23. Konig, G. *et al.* Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* **30**, 1542–1550 (2009).
24. Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F. & Letourneur, D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* **27**, 5546–5553 (2006).
25. Fromageau, J. *et al.* Estimation of polyvinyl alcohol cryogel mechanical properties with four ultrasound elastography methods and comparison with gold standard testings. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* **54**, 498–509 (2007).
26. Liu, Y. *et al.* Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **3**, 203–209 (2010).
27. Liu, Y., Vrana, N. E., Cahill, P. A. & McGuinness, G. B. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **90B**, 492–502 (2009).
28. Salacinski, H. J. *et al.* The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review. *Journal of biomaterials applications* **15**, 241–278 (2001).
29. Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G. & Seifalian, A. M. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *British Journal of Surgery* **87**, 1516–1524 (2000).
30. Cutiongco, M. F., Anderson, D. E., Hinds, M. T. & Yim, E. K. *In vitro* and *ex vivo* hemocompatibility of off-the-shelf modified poly(vinyl alcohol) vascular grafts. *Acta biomaterialia* **25**, 97–108 (2015).

Acknowledgements

Inserm, Universities Paris Diderot and Paris 13, Mines-ParisTech and ESPCI Paris supported this study. The authors would like to thank F. Nadaud (UTC Compiègne, France) for SEM images, Matthieu Roche (Laboratoire de physique des solides). Funding from department of Essone is acknowledged for the dynamic tensile apparatus (ASTRE 2012).

Author Contributions

M.A. performed the animal model and contributed to data analysis. T.S.-Y. contributed to histology studies, data analysis, wrote the main manuscript text and prepared the figures. J.M.I. contributed to prosthesis fabrication. V.H. contributed to the animal model. L.C. performed the mechanical study and contributed to preparation of Figure 6. P.O. performed the TOF-MRA analysis. R.A. contributed to histology studies. M.C. contributed to study concept. D.L. conceived and coordinated the study and contributed to data analysis and manuscript writing. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-25703-2.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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

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

© The Author(s) 2018

Article de vulgarisation scientifique (Biofutur, Septembre 2012)

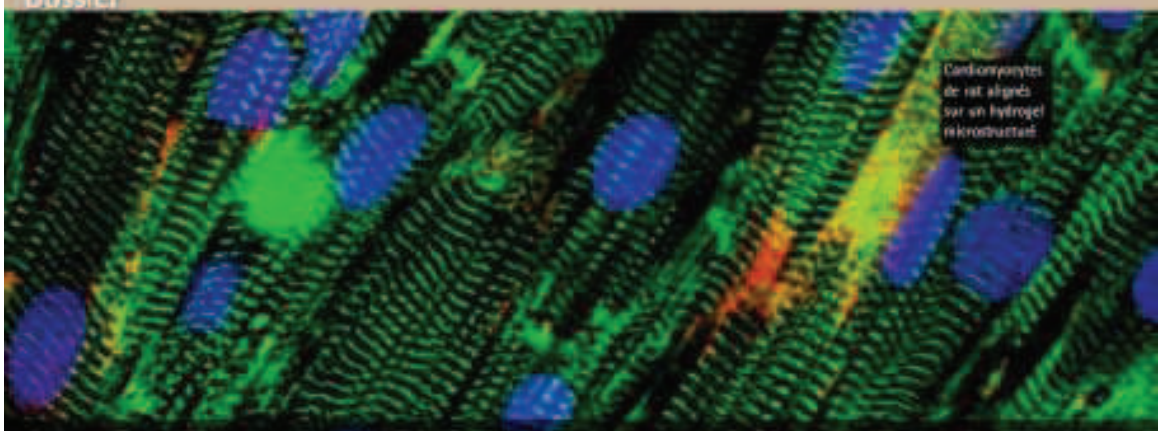
Réparer les cœurs brisés et les vaisseaux abîmés

Yohan Farouz,1,2 Yong Chen,1 Philippe Menasché,2 Julia Ino,3 Michael Atlan,3 Catherine Le Visage,3 Didier Letourneur3

(1). Laboratoire de microfluidique, organisation chimique et nanotechnologies, CNRS UMR8640, Ecole normale supérieure de Paris.

(2). Laboratoire de thérapie cellulaire en pathologie cardio-vasculaire, Inserm U633, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris.

(2). Inserm, U698, Bio-ingénierie Cardiovasculaire, Université Paris Diderot, CHU X. Bichat, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité.



Cardiomyocytes de rat alignés sur un hydrogel microstructuré

Réparer les cœurs brisés et les vaisseaux abîmés

Oserait-on imaginer qu'un pansement à base de biomatériaux et de cellules souches permette le saut technologique promis il y a quinze ans par la thérapie cellulaire cardio-vasculaire ? Les premières études précliniques offrent en tout cas de nouveaux concepts thérapeutiques en cardiologie et en médecine régénératrice des vaisseaux sanguins.

les auteurs

Yohan Forest*, Yang Chen*, Philippe Menasché**, Julia Ino***, Michael Atlan***, Catherine Le Visage*** et Didier Letourneur*****

* Laboratoire de microfluidique, organisation chimique et microtechnologies, CNRS UMR8640, École normale supérieure de Paris

** Laboratoire de thérapie cellulaire en cardiologie cardio-vasculaire, Inserm U633, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris

*** Inserm U698, Bio-ingénierie Cardiovasculaire, Université Paris Diderot, CHU A. Bichat, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité

Beaucoup d'espoirs se fondent sur la greffe de cellules souches embryonnaires dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. On a, en effet, appris à les différencier pour ne produire que des cellules d'intérêt cardiaque (1), mais l'utilisation de ces cellules est controversée et ne résout pas le problème des traitements immunosuppresseurs à vie. La reprogrammation cellulaire offrirait, à cet effet, la possibilité de construire d'importantes quantités de cellules cardiaques en différenciant des cellules pluripotentes induites obtenues à partir de fibroblastes du patient lui-même (2). Que faire en attendant le passage du laboratoire à la clinique ? Et si l'injection de cellules n'était pas suffisante ? Qu'apportent les biomatériaux dans les thérapies cardiovasculaires ?

DES CŒURS ARTIFICIELS PLUS PERFORMANTS

L'insuffisance cardiaque, incapacité du cœur à éjecter suffisamment de sang dans le corps, est la principale conséquence des maladies cardio-vasculaires comme l'infarctus du myocarde, les cardiomyopathies dilatées, les maladies valvulaires ou l'hypertension. Il en résulte fatigue, toux, rétention d'eau dans les membres inférieurs et souffle court. Une fois l'insuffisance cardiaque diagnostiquée, le taux de survie à cinq ans est de seulement 50 % dans les formes les plus sévères (3). De nombreux traitements existent, chimiques et chirurgicaux, comme l'implantation de stimulateurs et de resynchronisateurs cardiaques. Mais la meilleure solution reste la transplantation cardiaque, pour laquelle les dons sont toujours aussi rares et les listes d'attentes toujours plus longues.

Pour l'instant, le cœur artificiel permet seulement de patienter dans l'attente d'une greffe. Depuis le Jarvik-7 et ses pompes externes de 100 kg, implanté pour la première fois en 1982, le seul cœur artificiel à s'être imposé est le cœur américain Abiocor (photo p. 32, A), avec une batterie rechargeable sous-cutanée mais dont la taille n'était compatible qu'avec seulement 50 % des patients masculins. Le cœur développé par le professeur Alain Carpentier et la société française Carmat (photo p. 32, B), avec un poids réduit (900 g) et une taille proche du cœur humain, est compatible avec 65 % des patients et suscite, de fait, de vifs espoirs. Des biomatériaux à base de tissus animaux décellularisés confèrent des propriétés antithrombotiques aux parois ventriculaires de ce cœur artificiel. L'alimentation électrique reste cependant externe, avec des risques d'inconfort et d'infection. Les premiers essais cliniques sont prévus pour 2013.

LE PATCH CARDIAQUE AU SECOURS DES INJECTIONS DE CELLULES SOUCHES

Les maladies ischémiques, qui résultent de l'obstruction de l'artère coronaire, sont la principale cause d'insuffisance cardiaque. Cette obstruction empêche le sang d'irriguer la partie aval du myocarde et provoque la mort de nombreux cardiomyocytes : c'est l'infarctus du myocarde. Dans cette région dite « infarcie », les cardiomyocytes sont remplacés

par du tissu fibreux, principalement des fibroblastes et du collagène, composant majeur de la matrice extracellulaire. Le myocarde devient alors incapable de se contracter de façon synchrone, engendrant des arythmies et une altération progressive de la fonction contractile (schéma p. 33, B).

Les premiers essais cliniques de régénération d'une contraction fonctionnelle, menés par Philippe Menasché, chirurgien à l'Hôpital européen Georges Pompidou de Paris et directeur de recherche Inserm (U633), consistaient à injecter des cellules souches adultes du muscle squelettique (myoblastes) dans la zone infarcie [4]. Des essais similaires ont suivi qui utilisaient d'autres types cellulaires. Malheureusement avec toujours le même bilan : une amélioration négligeable de la fonction cardiaque. « *Procédant à la fois de l'incapacité des cellules 'adultes' à se transformer en cellules cardiaques et de leur élimination rapide du tissu greffé, les effets paracrines de ces cellules* [leur production de biomolécules potentiellement cardioprotectrices, NDR] *ne suffisaient pas à 'régénérer' des zones étendues de myocarde non fonctionnel* », explique le Professeur Menasché.

Concevoir un patch cardiaque consiste à faire de l'ingénierie inverse du tissu myocardique fonctionnel pour en comprendre les principales fonctions et les reproduire artificiellement. Le matériau support doit se dégrader au fur et à mesure que le nouveau tissu cardiaque sécrète sa propre matrice extracellulaire. Et il doit en même temps pouvoir résister à la contraction cardiaque et garder les cellules en place. Le patch le plus complet contiendra des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et de muscle lisse (pour les vaisseaux), des facteurs angiogéniques, antioxydants et anti-apoptotiques, en attendant la connexion vasculaire (schéma p. 33, C). L'élasticité du matériau doit, quant à elle, correspondre à celle du tissu environnant (environ 10 kPa) pour assurer une continuité mécanique. Des pores cellulaires pourront soit faciliter la migration des cellules vers le myocarde sain, soit favoriser les jonctions cellulaires communicantes et rétablir la continuité électro-mécanique permettant une contraction synchrone du myocarde.

L'élaboration d'un tel patch soulève évidemment de nombreuses questions. Doit-on vraiment différencier les cellules souches jusqu'au stade cardiomyocyte ? À quel niveau de maturité vaut-il mieux greffer ces cellules ? Trop immatures, elles risquent de mal se différencier et de former des tumeurs. Trop matures, elles auront du mal à s'intégrer dans le tissu hôte. Le matériau idéal doit donc présenter les signaux appropriés pour la survie et la maturation cellulaires *in vivo*. Ces signaux sont des protéines d'adhésion dont l'intégration favorise l'alignement des cardiomyocytes pour une contraction synchrone et puissante (photo p. 30), ou encore des facteurs de croissance, pour terminer la différenciation.

LES HYDROGELS EN RENFORT

La matrice extracellulaire cardiaque appartient à la famille des matériaux dits « hydrogels » car capables de maintenir une quantité importante d'eau. Les hydrogels, naturels comme synthétiques, sont donc des candidats de choix. Le plus fidèle – mais aussi le plus difficile à extraire – est actuellement celui que forme la matrice extracellulaire de myocarde porcin décellularisé [5]. Les premiers tests d'injection chez le rat ont montré que l'hydrogel permet à lui seul de diminuer la dilatation cardiaque et d'éviter l'amincissement accéléré de la zone infarcie, ce qui aboutit à une meilleure fraction d'éjection du sang et à une épaisseur de la paroi myocardique plus stable [6,7]. Chaque laboratoire teste maintenant de complexifier ses hydrogels en y intégrant des propriétés biochimiques et mécaniques, certains se contentant de promouvoir une revascularisation de la zone infarcie et une limitation de la progression de l'apoptose. L'hydrogel apporte alors un soutien mécanique et libère des facteurs de croissance (VEGF, PDGF**) qui recrutent les cellules endothéliales et de muscle lisse des vaisseaux voisins [8]. Cette bifurcation des vaisseaux hôtes pour repeupler la zone infarcie prend du temps, obstacle qui peut être contourné grâce à une autre stratégie consistant à ajouter des cellules endothéliales ou leur progéniteurs. Les néovaisseaux se forment alors directement dans la zone infarcie, accélérant le processus de reconnexion vasculaire. Certains incorporent même directement des cellules capables de sécréter elles-mêmes ces facteurs, des cellules souches de tissu adipeux par exemple. Les études sur des rats montrent des améliorations de la densité capillaire, de l'épaisseur myocardique et de la fonction cardiaque [9].

Qu'en est-il de la partie contractile ? De nombreuses études démontrent la faisabilité de matériaux avec des propriétés mécaniques et des microstructures compatibles avec la formation d'un tissu cardiomyocytaire contractile [10,11]. Même si des améliorations de la fonction cardiaque sont observées chez le rat, il est rare qu'elles puissent être attribuées directement aux cardiomyocytes, dérivés de cellules souches ou non. Une explication plausible pourrait être la maturité trop avancée des cardiomyocytes greffés, qui n'auraient pas la flexibilité suffisante pour s'insérer entre les cellules saines et former des jonctions communicantes avec celles-ci.

DES CŒURS SUR PUCE

L'utilisation de biomatériaux pour la réparation cardiaque ne s'arrête pas là, justement parce que les résultats *in vitro* sont de plus en plus solides. Grâce à ces microtissus cardiaques fonctionnels, il est possible de simuler la réponse contractile à certains médicaments ou facteurs environnementaux, telles les nanoparticules – une technologie dite du « cœur sur puce », par analogie aux puces à ADN (cf. 2.13). Utiliser un modèle *in vitro* permet à la fois d'évaluer la cardiotoxicité d'un composé et de développer rapidement de nouveaux traitements des pathologies cardiaques, les tests précliniques n'ayant lieu que sur les médicaments ayant fait leurs preuves avec la puce.

La biomédecine du tissu cardiaque n'en est encore qu'à ses balbutiements et les mécanismes d'action des cellules injectées et

** Vascular endothelial growth factor et Platelet-derived growth factor

des patches testés sont encore flous et controversés. Il reste donc beaucoup à faire avant que toutes ces innovations soient validées en préclinique chez le gros animal – les patches sont encore de taille très réduite – et approuvées par les autorités de régulation pour passer aux essais cliniques.

L'INGÉNIERIE DES PROTHÈSES VASCULAIRES DE PETIT DIAMÈTRE

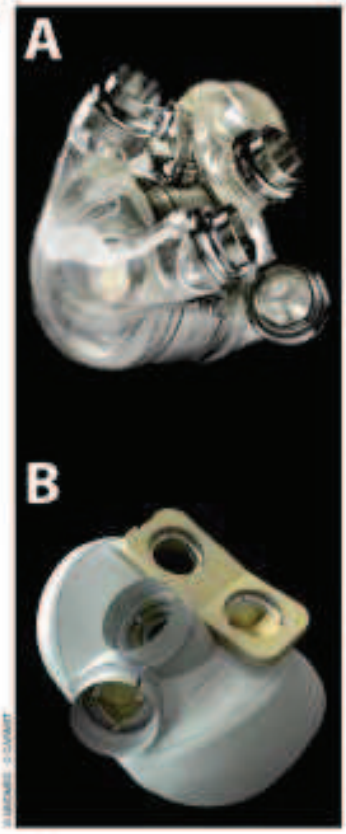
Parmi les maladies cardio-vasculaires, les pathologies d'origine athéroscléroïque sont liées à des complications résultant de l'épaississement de la paroi des vaisseaux sanguins dû au dépôt d'une plaque lipidique (athérome). Malgré le développement de techniques endovasculaires peu invasives telles que l'angioplastie[*] et la pose de stents[**], l'implantation de substituts vasculaires par chirurgie reste nécessaire chez un grand nombre de patients. Le remplacement vasculaire se fait soit de manière autologue, à l'aide d'une veine ou d'une artère prélevée chez le patient, soit grâce à une prothèse, lorsque le patient n'a pas le capital vasculaire suffisant [14].

Avec les greffons veineux autologues, on enregistre 80 à 90 % de réussite après un an grâce à la préservation de la surface luminale endothélialisée[***]. À plus long terme (10 ans), il y a cependant un développement cellulaire (sténose hyperplasique) qui réduit le diamètre au niveau des jonctions avec la prothèse. Les greffes artérielles autologues sont par exemple utilisées pour les pontages coronariens, en raison de leurs meilleures propriétés mécaniques. Le nombre réduit des sites de prélèvement, la difficulté de dissection et la fragilité de ces greffes ou une qualité insuffisante réduisent cependant leurs utilisations.

Les techniques de remplacement vasculaire par des prothèses synthétiques (polytétrafluoroéthylène expansé, polyéthylène téréphtalate) sont actuellement utilisées avec succès pour le remplacement d'artères de gros diamètre (> 6 mm). De telles prothèses ne conviennent toutefois pas pour le remplacement d'artères de moyen ou petit calibre, du fait d'une moindre souplesse par rapport aux artères natives et d'une absence d'endothélialisation de la surface luminale de la prothèse conduisant au développement de thromboses [15].

Depuis plusieurs années, des recherches en ingénierie tissulaire vasculaire ont pour objet le développement de prothèses comme matrices tridimensionnelles susceptibles d'être cellularisées[****] avant d'être implantées chez le patient. Cette approche nécessite de développer de nouveaux biomatériaux qui soient adaptés à la réalisation de substituts de vaisseaux sanguins. Dans de nombreuses études, un système de culture cellulaire sous flux pulsatile est également associé, qui permet de recréer, *in vitro*, un environnement mécanique biomimétique proche des conditions hydrodynamiques d'une artère de moyen calibre. On trouve ainsi des prothèses préexistantes cellularisées [16], des constructions basées sur des gels de constituants naturels comme le collagène, des matrices polymères biodégradables ou encore des feuillets cellulaires auto-assemblés en l'absence de support synthétique. Pour ce dernier cas, les travaux de Nicolas L'heureux, directeur scientifique de la société américaine Cytograft Tissue Engineering, ont permis de montrer la faisabilité de cette approche en allant jusqu'à sa démonstration chez l'homme [17]. Dans cette nouvelle technique de fabrication de vaisseaux biologiques, les cellules cultivées au préalable avec les cellules du patient (fibroblastes cutanés prélevés par biopsie) sont moulées pour prendre la forme d'un vaisseau, laquelle confère des propriétés d'élasticité et de résistance mécanique. Des cellules endothéliales prélevées sur une veine superficielle du patient sont ensuite introduites dans cette prothèse, dont elles constituent la paroi interne. Comme il s'agit d'un tissu autologue, tout risque de rejet est évité. Des vaisseaux sanguins humains reconstruits ont ainsi été implantés avec succès pendant plusieurs mois comme fistule artério-veineuse[*****] chez des patients en dialyse [18]. Des essais pour l'ischémie critique des membres inférieurs sont prévus, avec l'espoir de pouvoir revasculariser ces membres et éviter des amputations. Il s'agit cependant d'un processus qui comprend de nombreuses phases, sur plusieurs mois et à un coût élevé (de 4 800 à

Les cœurs artificiels Abiocor (A) et Carmat (B) >



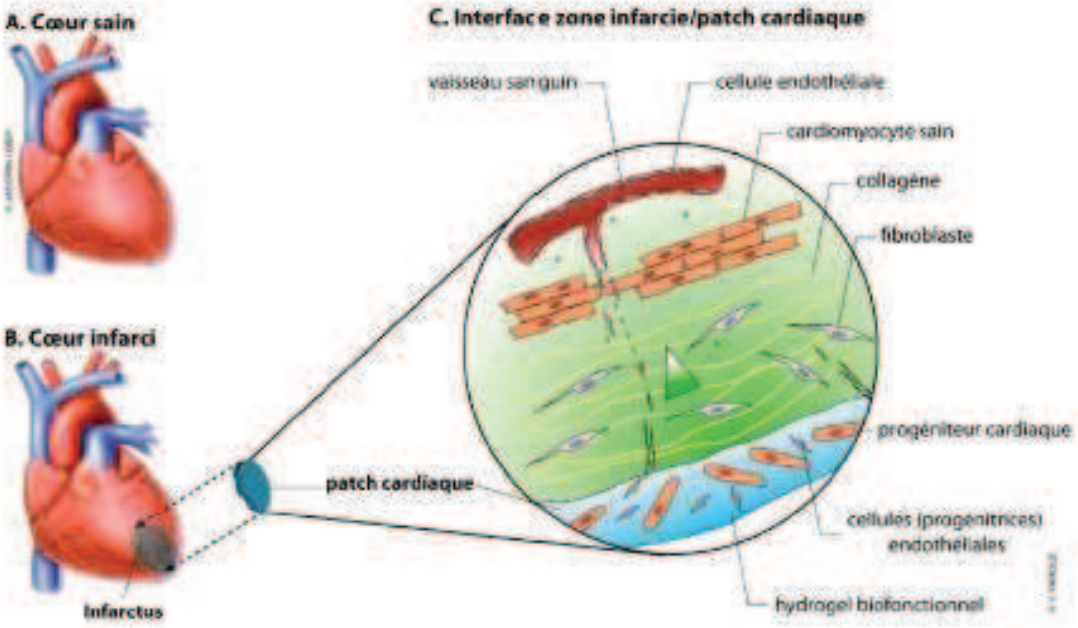
[*] Technique chirurgicale utilisant des petits ballonnets gonflables pour dilater l'artère à l'endroit du rétrécissement

[**] Prothèse métallique tubulaire introduite dans une artère pour la maintenir ouverte

[***] Colonisation de la surface du greffon par des cellules de la paroi interne de l'artère

[****] Colonisation par des cellules

[*****] Technique chirurgicale consistant à créer une communication entre une artère et une veine permettant le branchement d'un système d'épuration extracorporelle, notamment une hémodialyse.



Cœur sain (A) et cœur infarci (B). Le patch cardiaque « idéal » (C) contient des progéniteurs de cellules cardiaques et endothéliales, libère des facteurs angiogéniques et assure un soutien mécanique pour la cicatrisation, en attendant que les cellules greffées sécrètent leur propre matrice et que la couche de fibroblastes et de collagène rigide se dégrade.

Gradient de facteurs de croissance

Les cellules endothéliales « naturelles » sont attirées par les fortes concentrations de facteurs de croissance. S'ensuit une reconnexion vasculaire avec les cellules endothéliales du patch.

8 000 € environ). Des essais cliniques sont en cours en Pologne, avec des systèmes cultivés à partir de cellules provenant de banques cellulaires [18], ainsi que des évolutions du procédé initial, par exemple en « tricotant » des rubans cellularisés [20].

Une autre stratégie consiste à proposer un support temporaire permettant ensuite la régénération du vaisseau par l'organisme. On peut également y associer des tissus décellularisés et des matrices modifiées pour capter des cellules endogènes afin de permettre la recolonisation de l'échafaudage. Avec des contraintes majeures toutefois car il faut à la fois assurer la fonction de transport du sang du vaisseau et favoriser la colonisation tout en conservant les propriétés mécaniques. Idéalement, le constituant initial du support doit se dégrader, et ceci sans conséquences défavorables pour les tissus, en particulier sans inflammation excessive. L'expérience du laboratoire Inserm Bio-ingénierie Cardiovasculaire dans la maîtrise des supports pour la culture de cellules en 3D est ainsi à la base du projet biotechnologique de reconstruction de vaisseaux de petit diamètre. Ce laboratoire a développé une expertise sur les biopolymères, en particulier sur des matériaux qui constituent des supports non thrombogènes* et biocompatibles. Certains des biomatériaux vasculaires sont conçus à partir de polymères biodégradables de type polysaccharidique (dextrane, pullulane, héparine) préparés sans aucun solvant organique, et peuvent prendre la forme de tubes de petit diamètre (2 mm). Les travaux sur des prothèses vasculaires de 2 mm chez le petit animal montrent un taux élevé (75 %) de réussite après deux mois [21]. La nature des matériaux et l'absence de solvants lors de la préparation semblent garantir une bonne tolérance à ces biomatériaux 3D, qui présentent la capacité de colonisation cellulaire [22,23]. Des polymères à base d'acide polyvinylique sont également préparés sous forme tubulaire. Ils possèdent des propriétés mécaniques adaptées pour l'implantation, notamment une suturabilité facile [24]. Les recherches sont en cours pour savoir si ces petits vaisseaux de synthèse pourraient être testés chez l'homme d'ici quelques années. ■

* Qui n'entraînent pas la formation de caillots sanguins

[1] Bio-ii et al. (2010) J Clin Invest 120, 1135-36
[2] Zeh Bantley L et al. (2012) Curr Mol J, doi:10.2174/1874467211666
[3] Lino B et al. (2002) Am J Dig J Med 147, 1387-402
[4] Menasché P et al. (2001) Lancet 357, 279-80
[5] Sarig U et al. (2012) Tissue Eng Part A, doi:10.1089/ten.tea.2011.0580
[6] Christman KL et al. (2004) Tissue Eng 10, 403-9
[7] Landa N et al. (2008) Circulation 117, 1388-96
[8] Hao X et al. (2007) Cardiovasc Res 75, 178-85
[9] Hamdi H et al. (2011) Cardiovasc Res 91, 483-91
[10] Engelmayr GC et al. (2008) Nat Mater 7, 1003-10
[11] Luo B et al. (2011) Biomaterials 32, 9180-7
[12] Gaudiano A et al. (2011) Lab Chip 11, 4165-73
[13] Samuel S et al. (2011) PLoS ONE 6, e20897
[14] Bannon PF et al. (2005) J Biomed Mater Res B 74, 470-80
[15] Li S, Arora J (2011) Annu Rev Biomed Eng 13, 461-75
[16] Thebaud NB et al. (2003) J Tissue Eng Regen Med 4, 475-84
[17] L'Heureux N et al. (2007) N Engl J Med 357, 1481-3
[18] McAllister TN et al. (2009) Lancet 373, 1440-6
[19] Wystrychowski W et al. (2011) J Vasc Access 12, 67-70
[20] www.engineeringtissues.com/tissue-tree-of-life/tissue-bioreactor
[21] Chlupatý M et al. (2008) Biomaterials 27, 3546-53
[22] Lavergne M et al. (2011) Macromol Biosci 11, 903-10
[23] Le Visage C et al. (2012) Tissue Eng Part A 18, 30-44
[24] Chaouat M et al. (2008) Adv Funct Mater 18, 2955-61

RÉSUMÉ

Sur la base de précédents travaux de l'unité INSERM 1148, sur des films à base d'alcool polyvinylique, nous avons implanté et évalué des prothèses de moins de 2mm de diamètre.L'ajout de gelatine in vitro a montré des capacités d'adhérence cellulaires, compatibles avec une endothelialisation in situ, des implants garant, d'une perméabilité à long terme.

Notre modèle était le remplacement de 1cm d'aorte sous rénale de rat. Ces implants, ont été utilisées comme modèle d'entrainement basse fidélité à la microchirurgie, avec de meilleurs résultats sur l'acquisition de la technique d'anastomose microchirurgicale, que les tubes en silicone antérieurement utilisé, lors de l'enseignement chez 71 étudiants. Un nouveau moyen d'imagerie pour l'exploration vasculaire par angiographie par résonance magnétique, en temps de vol sans injection chez l'animal, et la première application chez l'homme sont rapportés. Apres avoir présenté notre methode de fabrication par reticulation physique (Lyophilisation Congelation) et chimique (STMP) du PVA, directement sous forme de tubes, nous avons confirmé l'hypothèse que les micro implants à base de PVA associé à la gélatine à hauteur de 1%, a permis d'améliorer la perméabilité par rapport au PVA seul,ou à tout autre ratio de gélatine; et ce grâce à une endothélisation in situ constatées histologiquement. Les performances biomécaniques de l'implant ont aussi étaient évaluées. Au delà de 2 mois la perméabilité chute de 75% à 50%. Le vieillissement du matériel par son enraidissement, et le relargage de la gélatine pourrait expliquer cette diminution des performances au cours du temps.