



HAL
open science

Development of a resorbable internal biliary stent to secure biliary anastomosis in liver transplantation

Edouard Girard

► **To cite this version:**

Edouard Girard. Development of a resorbable internal biliary stent to secure biliary anastomosis in liver transplantation. Human health and pathology. Université Grenoble Alpes, 2018. English. NNT : 2018GREAS026 . tel-04062792

HAL Id: tel-04062792

<https://theses.hal.science/tel-04062792>

Submitted on 7 Apr 2023

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **ISCE/BIOLOGIE, INSTRUMENTATION,
SIGNAL**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

EDOUARD GIRARD

Thèse dirigée par **Grégory CHAGNON**,
et par **Benjamin NOTTELET**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG**
dans l'**École Doctorale EDISCE**

Développement d'une prothèse biliaire résorbable pour sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation hépatique

Thèse soutenue publiquement le **19 Octobre 2018**
devant le jury composé de :

M. Jean-Robert DELPERO

Professeur, Université Aix-Marseille (Président du jury)

M. Jean-Benoît LE CAM

Professeur, Université Rennes 1 (Rapporteur)

M. Nicolas BLANCHEMAIN

Maître de conférences, Université Lille 2 (Rapporteur)

M. Christian LETOUBLON

Professeur émérite, Université Grenoble Alpes (Examineur)

M. Alexandre MOREAU-GAUDRY

Professeur, Université Grenoble Alpes (Examineur)

Mme Emilie GREGOIRE

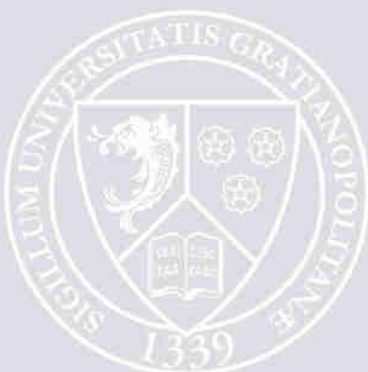
Maître de conférences, Université Aix-Marseille (Examineur)

M. Grégory CHAGNON

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes (Directeur)

M. Benjamin NOTTELET

Professeur, Université de Montpellier (Directeur)



SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	2
LEXIQUE	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE	12
CHAPITRE I : CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART	17
A- ASPECTS MEDICAUX LIES A LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE	18
1. LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE	18
1.1. Généralités	18
1.2. Les indications	19
1.3. Aspects chirurgicaux de la transplantation	20
1.3.1. Prélèvement chez le donneur	20
1.3.2. Intervention chez le receveur	20
1.3.3. Techniques de reconstruction biliaire	22
1.4. Suites postopératoires.....	24
1.4.1. Immunosuppression.....	24
1.4.2. Fonction hépatique et suivi postopératoire après TH	25
2. LE SYSTEME BILIAIRE : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE	26
2.1. Anatomie des voies biliaires	26
2.1.1. Les voies biliaires intra-hépatiques.....	27
2.1.2. Les voies biliaires extra-hépatiques	27
2.2. Vascularisation et innervation des voies biliaires.....	30
2.2.1. Vascularisation artérielle	30
2.2.2. Vascularisation veineuse.....	32
2.2.3. Drainage lymphatique	32
2.2.4. Innervation.....	32
2.3. Sécrétion et excrétion biliaires	33
2.3.1. Bases structurales de la sécrétion.....	33
2.3.2. La bile, propriétés physiques et composition chimique.....	33
2.3.3. Excrétions biliaires	35
3. LES COMPLICATIONS BILIAIRES EN TRANSPLANTATION HEPATIQUE	36
3.1. Epidémiologie	36
3.2. Classification des complications chirurgicales.....	37
3.3. La fistule biliaire anastomotique	38
3.4. La sténose biliaire	38
3.5. Facteurs de risque prédictifs de complications biliaires en TH	39
4. LES MOYENS DE PREVENTION DES COMPLICATIONS BILIAIRES	42
4.1. Le drain biliaire externe ou « drain en T ».....	42
4.2. Le Drain biliaire interne	44

4.3. Drain en T versus IBS	45
4.4. Autres moyens de prévention des complications biliaires anastomotiques	45
4.4.1. <i>Le drain transcystique</i>	45
4.4.2. <i>L'épiploplastie</i>	46
4.4.3. <i>Colle chirurgicale & procédés biliostatiques</i>	47
B- VOIES D'INNOVATIONS DE PREVENTION DES COMPLICATIONS BILIAIRES.....	48
1. CONCEPTION D'UN DISPOSITIF A PARTIR D'UNE STRUCTURE DE POLYMERE RESORBABLE.....	48
1.1. Intérêt des biomatériaux dégradables synthétiques.....	48
1.2. PLA et PCL, polyesters aliphatiques d'intérêts pour l'application	50
1.2.1. <i>Synthèse</i>	50
1.2.2. <i>Propriétés mécaniques et thermiques</i>	51
1.2.3. <i>Propriétés de dégradation</i>	53
1.3. Le PEG, polyéther d'intérêt pour l'application	55
1.3.1. <i>Synthèse du PEG</i>	55
1.3.2. <i>Propriétés du PEG</i>	55
1.4. Synthèse de copolymères triblocs de PLA-PEG-PLA	56
2. VOIES DE RECHERCHES DANS LA PREVENTION DES COMPLICATIONS BILIAIRES	57
2.1. Utilisation de prothèses biliaires biodégradables dans la littérature.....	57
2.2. Voies biliaires artificielles et ingénierie tissulaire.....	62
2.3. Les anastomoses sans sutures.....	64
C- BILAN ET CADRE DE LA THESE.....	65
CHAPITRE II : ÉVALUATION DE COPOLYMÈRES PLA/PEG POUR L'APPLICATION BILIAIRE	68
INTRODUCTION DU CHAPITRE II	68
1. INTRODUCTION	70
2. MATERIAL AND METHODS	72
2.1. Material	72
2.2. Physicochemical characterization	72
2.3. Copolymers synthesis and RIBS prototype manufacturing	73
2.4. In vitro degradation studies.....	74
2.5. Permeability test	75
2.6. Mechanical properties measurement	76
3. RESULTS AND DISCUSSION	77
3.1. Syntheses.....	77
3.2. In vitro degradation.....	78
3.2.1. <i>Morphological change</i>	78
3.2.2. <i>Mass loss, water uptake and molecular weight</i>	79
3.2.1. <i>Permeability evolution</i>	80
3.2.2. <i>Influence of pH variations</i>	81

3.3. Mechanical properties evolution.....	82
4. CONCLUSION	86
CONCLUSIONS DU CHAPITRE II	87
CHAPITRE III : ÉTUDE BIOMÉCANIQUE DE LA VOIE BILIAIRE	89
INTRODUCTION DU CHAPITRE III	89
1. INTRODUCTION	91
2. EXPERIMENTAL METHODS	92
2.1. Anatomical description of extrahepatic biliary tract	92
2.2. Sample extraction and methodology	93
2.3. Histology	94
2.4. Mechanical tests.....	95
2.5. Statistical analysis.....	96
3. RESULTS.....	97
3.1. Histological analysis.....	97
3.2. Mechanical behavior	101
3.2.1. <i>Description of the experimental curves.</i>	101
3.2.2. <i>Comparison of the three groups</i>	103
4. DISCUSSION	106
5. CONCLUSION	109
CONCLUSIONS DU CHAPITRE III	111
CHAPITRE IV : VALIDATION D’UN DRAIN BILIAIRE INTERNE RÉSORBABLE (RIBS)	113
INTRODUCTION DU CHAPITRE IV	113
1. INTRODUCTION	115
2. METHODS	118
2.1. Chemicals.....	118
2.2. Synthesis.....	118
2.3. Physico-chemical characterizations.....	120
2.4. Implant preparation	120
2.5. Experimental design: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> degradation	121
2.6. Animals and Surgical procedures	121
2.7. Mechanical tests.....	122
2.8. In vivo Computed Tomography (CT) imaging	123
2.9. Histological analyzes.....	123
2.10. Human cadaveric implantability tests	124
2.11. Statistical analysis.....	124

3. RESULTS AND DISCUSSION	125
3.1. Characteristics of PCL-TIB/PLA-PEG-PLA blends	125
3.2. Rats implantation and animal tolerance	126
3.3. In vitro vs. in vivo degradation study.....	127
3.4. Mechanical properties evolution.....	129
3.5. Computed Tomography imaging	132
3.6. Histological results.....	134
3.7. Implantability on human bile ducts	136
4. CONCLUSION	138
CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV	141
 CHAPITRE V : PRÉ-REQUIS EN VUE D'UNE VALORISATION INDUSTRIELLE	
.....	144
 INTRODUCTION DU CHAPITRE V	144
 1. DOSSIER DE CONCEPTION – REGLEMENTATION DU DISPOSITIF MEDICAL	145
1.1. Constitution du dossier de conception.....	145
1.2. Définition d'un dispositif médical.....	146
1.3. Analyse fonctionnelle du besoin.....	146
1.4. Cahier des charges fonctionnel	147
1.4.1. <i>Fonctions de service</i>	147
1.4.2. <i>Fonctions souhaitées</i>	147
1.4.3. <i>Fonctions attendues</i>	148
1.5. Gestion des risques	148
1.6. Classification	150
1.6.1. <i>Définitions (en souligné ce qui concerne notre dispositif)</i>	150
1.6.2. <i>Règles de classification, (selon le chapitre 5 - annexe VIII [300])</i>	151
1.7. Exigences essentielles/Normes applicables.....	152
1.7.1. <i>Généralités sur les directives européennes applicables</i>	152
1.7.2. <i>Exigences essentielles de sécurité et performances</i>	153
1.8. Textes et normes applicables	153
1.9. Spécification du produit & performances revendiquées.....	153
1.10. Évaluation de la conformité du DM et marquage CE	155
1.11. Essais de biocompatibilité	156
1.11.1. <i>Principes généraux</i>	156
1.11.2. <i>Essais de cytotoxicité</i>	157
1.11.3. <i>Estimation des risques et choix des essais</i>	157
1.12. Stérilisation.....	158
1.12.1. <i>Utilisation des rayonnements ionisants</i>	159
1.12.2. <i>Effets des rayonnements ionisants sur les polymères</i>	160
1.12.3. <i>Effets sur les propriétés du matériau</i>	161
1.12.4. <i>Dose stérilisante et dose maximale acceptable</i>	164
1.12.5. <i>Validation de la stérilisation</i>	165
1.13. Aptitude à l'utilisation	166
1.13.1. <i>Objectif</i>	166
1.13.2. <i>Spécification d'application : Profil des utilisateurs prévus</i>	166
1.13.3. <i>Identifications des fonctions</i>	166

1.13.4. Analyse du risque : Identification des pratiques à risque.....	167
1.13.5. Analyse du risque : cas le plus défavorable.....	167
1.13.6. Exigences d'interfaces utilisateur pour les fonctions principales de service	168
1.13.7. Validation de l'aptitude à l'utilisation.....	169
1.14. Synthèse du dossier de conception : que nous manque-t-il pour le RIBS ?	170
2. INDUSTRIALISATION	171
2.1. Réalisation du produit	171
2.2. Cahier des charges technique et dessins industriels du dispositif.....	172
2.3. Synthèse industrielle	172
2.4. Mise en forme industrielle, le moulage par injection.....	173
2.5. Conditionnement/étiquetage/emballage	173
2.5.1. Carte d'implant	173
2.5.2. Système d'emballage	173
2.5.3. Exigences sur le conditionnement et l'étiquetage	173
3. DOSSIER TECHNIQUE EN VUE DU MARQUAGE CE.....	174
3.1. Informations relatives au fabricant et déclaration d'engagement.....	174
3.2. « Check list » des exigences essentielles	175
3.3. Liste des normes applicables.....	175
3.4. Notice d'utilisation et projet d'étiquetage	175
3.5. Gestion des risques	175
3.6. Dossier de fabrication.....	176
3.7. Évaluation pré-clinique.....	176
3.8. Evaluation clinique	176
3.8.1. Description.....	176
3.8.2. Voie bibliographique	177
3.8.3. Règlementation	178
3.8.4. Démarches préalables au commencement de la recherche.....	178
3.8.5. Mise à jour des données	179
3.8.6. Documents transmis au LNE/G-MED :	179
3.9. Suivi post-commercialisation.....	180
4. APRÈS LE MARQUAGE CE.....	181
4.1. Mise en place d'un système de Matériovigilance	181
4.1.1. Signalement d'un incident	181
4.1.2. Incident à reporter	181
4.1.3. Les délais.....	182
4.1.4. Gestion du risque produit.....	182
4.2. Déclaration préalable de mise sur le marché	182
CONCLUSION DU CHAPITRE V	183
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	185
RÉFÉRENCES.....	188
ANNEXES	206

Lexique

AE	Auto-expensible
AFB	Analyse Fonctionnel du Besoin
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ASTM	Organisme de normalisation américain (<i>American society for testing material</i>)
BaSO ₄	Sulfate de baryum
CBD	Cholédoque (<i>Common bile duct</i>)
CE	Communauté européenne
CHD	Canal hépatique commun (<i>Common hepatic duct</i>)
DCM	Dichloromethane
DM	Dispositif médical
EMA	European Medicines Agency
EN	Norme Européenne (<i>European Norm</i>)
FBA	Fistule biliaire anastomotique
FDA	Food and Drug Administration
<i>FDM</i>	Impression 3D dépôt matière en fusion (<i>Fused Deposition Modeling</i>)
G1	Groupe 1 (groupe congélation)
G2	Groupe 2 (groupe formolisation)
G3	Groupe 3 (groupe tissus frais)
GPM	Certification (<i>Good Manufacturing Practices</i>)
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran (Hematoxylin Eosin Saffron)
IBODE	Infirmier de Bloc Opératoire Diplômé d'État
IBS	Internal Biliary Stent (Drain biliaire interne)
IgA	Immunoglobuline A
IRM	Imagerie par résonance magnétique

ISO	Orga. internationale de normalisation (<i>International Standards Organization</i>)
LADAF	Laboratoire d'Anatomie des Alpes Françaises
LHD	Left Hepatic Duct (Canal hépatique gauche)
LT	Liver Transplantation (transplantation hépatique)
MDR	Règlement des dispositifs médicaux (<i>Medical devices regulation</i>)
MEDDEV	(MEDical DEVice) Guide d'application des directives applicables aux DM
MELD	Score pronostique d'hépatopathie (<i>Model for end stage liver disease</i>)
MeOH	Methanol
NAS	Niveau d'assurance de stérilité
NF	Norme Française
PAL	Phosphatases alcalines
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solution saline tamponnée au phosphate)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PCL-TIB	Poly(ϵ -caprolactone- <i>co</i> - α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone)s
PDS	Polydioxanone
PEG	Poly(éthylène glycol)
PGA	Poly(glycolide)
PLA	Poly(lactide)
PLGA	Poly(lactide- <i>co</i> -glycolide)
POC	Polymérisation par ouverture de cycle
RHD	Right hepatic duct (Canal hépatique droit)
RIBS	Drain biliaire interne bioresorbable (Resorbable Internal Biliary Stent)
SBA	Sténose biliaire anastomotique
SBNA	Sténose biliaire non anastomotique
SEC	Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'Exclusion Stérique)

TH	Transplantation Hépatique
THF	Tetrahydrofuran
TIBC	Triiodobenzoyl chloride (chlorure de triiodobenzoyle)
TMS	Tétraméthylsilane
TP	Taux de Prothrombine
TP	Taux de Prothrombine
UE	Union Européenne
VBP	Voie biliaire principale
VOIs	Volume d'intérêt (<i>Volumes of interest</i>)

Notations

T _f	Température de fusion
T _g	Température de transition vitreuse
ε _r	Déformation à la rupture
ε _y	Déformation à la limite d'élasticité
σ	Contrainte
σ _r	Contrainte de rupture
σ _y	Limite d'élasticité ou seuil de plasticité (<i>yield strength</i>)
σ _m	Contrainte statique (<i>static stress reached at the end of the load</i>)
σ _{relax}	Contrainte de relaxation (<i>stress during relaxation</i>)
t	Temps (<i>time</i>)
Đ	Dispersité des masses molaires
E	Module d'Young (ou module d'élasticité)

\overline{M}_n	Masse molaire moyenne en nombre
\overline{M}_w	Masse molaire moyenne en masse
DP	Degré de polymérisation
PD	Polydispersité (<i>polydispersity</i>)
m_0	Masse initiale (<i>initial mass</i>)
m_d	Masse sèche (<i>dry mass</i>)
m_{hyd}	Masse hydratée (<i>hydrated mass</i>)
K	Raideur (<i>stiffness</i>)
$\overline{\overline{F}}$	Deformation gradient tensor
λ	Elasticité (<i>stretch</i>)
l	Longueur (ou hauteur)
L	Largeur
F	Force
A_0	Section initiale (<i>initial cross section</i>)
Π	Nominal stress

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La transplantation hépatique (TH) est actuellement le seul traitement curatif de l'insuffisance hépatique terminale [1]. Si dans les séries historiques des années 1970 - 1980 étaient rapportés des taux de morbidité jusqu'à 50% et des taux de mortalité de 25-30% [2-4], les progrès réalisés sur le plan des techniques chirurgicales, ou du traitement médical post-opératoire, ont permis de progressivement diminuer l'incidence des complications. La reconstruction biliaire, dernière étape de la TH, est souvent considérée à tort comme l'étape facile d'une intervention difficile. Les complications biliaires restent le véritable « talon d'Achille » de la TH, quelle que soit la technique de reconstruction chirurgicale utilisée, avec un taux de morbidité compris selon les séries entre 10% et 40% [5-10], ainsi qu'un taux de mortalité pouvant avoisiner les 10% [11]. Le patient est alors exposé à de potentiels traitements longs et répétés, ainsi qu'au risque de perte du greffon [9-13]. Les deux principales complications biliaires sont la Fistule Biliaire Anastomotique (FBA) et la Sténose Biliaire Anastomotique (SBA). Les séries récentes rapportent un taux de fistules biliaires dans 5 à 22 % des transplantations hépatiques et une incidence de SBA de 9 à 18 % [11,12,14-17].

La mise en place d'une prothèse lors de la réalisation de l'anastomose biliaire a été proposée pour limiter les complications anastomotiques après TH. Jusque dans les années 1990, la technique de référence pour sécuriser l'anastomose biliaire était la mise en place d'un drainage biliaire externe par un drain en T (drain de Kehr). L'avantage théorique du drain en T étaient de réduire l'incidence des complications postopératoires anastomotiques en intubant l'anastomose et en diminuant la pression intracholédocienne par fistulisation externe. Néanmoins, l'utilisation du drainage biliaire externe en TH est très débattue dans la littérature. Les dernières méta-analyses [18,19] concluent que, bien que le drain en T, soit un facteur pronostique favorable pour les sténoses biliaires, son utilisation est un facteur de risque de cholangite, de péritonite et ne garantit pas moins d'interventions itératives post-transplantation. Basé sur les effets indésirables observés du drainage biliaire externe et sur le potentiel bénéfique du drainage biliaire prolongé, certaines équipes utilisent depuis les années 2000 un Drain biliaire interne (IBS) [20,21]. Ce drain est placé en transcholédochocholédocien lors de la

réalisation de l'anastomose cholédochocholédocienne. Il est censé chemiser la paroi interne du cholédoque au niveau de l'anastomose, afin de mieux l'étanchéifier et de mieux la calibrer. L'objectif étant de diminuer l'incidence et la gravité des complications anastomotiques (FBA et SBA), en évitant les inconvénients du drain externalisé [21]. Lors de cette dernière décennie, dans notre centre de TH, conformément aux différentes données de la littérature, nous avons fait évoluer notre stratégie chirurgicale de reconstruction biliaire en transplantation hépatique, avec l'arrêt de l'utilisation systématique des drains en T et la mise en place d'un IBS. Nous avons précédemment prouvé dans une étude rétrospective que l'utilisation d'un IBS en transplantation hépatique permettait de réduire de façon significative le nombre de complications biliaires anastomotiques [22]. Il s'agissait de l'une des plus importantes séries de la littérature comparant sur une période de 5 ans l'utilisation ou non d'un IBS sur 175 transplantations hépatiques (Article en **Annexe I-1**).

L'inconvénient majeur du IBS est la nécessité d'un geste endoscopique systématique pour ablation du dispositif. Même si le taux de complications après ce geste endoscopique est faible, 3 - 4% dans la littérature [22,23], l'ablation endoscopique du IBS ajoute un risque de complications, la destruction du sphincter d'Oddi, ainsi qu'un surcoût. D'un point de vue plus général, l'utilisation de prothèses plastiques (quel que soit leur composition) entraîne d'autres problèmes, tels que l'accumulation de biofilms bactériens, des infections, ou même des obstructions [24–26]. L'implantation peropératoire d'un IBS biorésorbable (RIBS) permettrait d'éviter ces inconvénients tout en sécurisant l'anastomose biliaire au même rôle que le drain en T ou le IBS.

De plus, si en chirurgie hépatobiliaire conventionnelle le cholédoque est largement cicatrisé en 6 semaines, en TH les règles de la cicatrisation sont modifiées avec un délai de cicatrisation majoré. Car les patients sont parfois dénutris, sous traitement immunosuppresseur, avec un bouleversement de la vascularisation locale secondaire à la dissection. La bioprothèse polymère pourrait également favoriser la régénération tissulaire en servant de support et en interagissant avec l'épithélium biliaire. En effet, l'ingénierie tissulaire s'appuie sur l'association de supports de régénération, les "matrices" ou "*scaffolds*", dans le but de réparer, reconstituer ou régénérer des tissus ou organes lésés [27,28]. Contrairement aux prothèses inertes classiques utilisées actuellement, l'ingénierie tissulaire vise à développer de nouveaux types de prothèses bioactives non plus limitées à un rôle palliatif mais désormais capables de conduire à la reformation des tissus.

Pour parvenir à ce résultat, il y a toutefois de nombreux paramètres à contrôler et un cahier des charges à respecter. Synthétiser un matériau et le mettre en forme de manière à obtenir une prothèse qui sera non seulement tolérée par l'organisme mais permettra de sécuriser l'anastomose biliaire voire favorisera la réparation cellulaire appropriée et la régénération tissulaire pour ensuite être éliminée de l'organisme. Ce dispositif devra également répondre aux objectifs très strictes liés à l'implantation et au suivi en TH.

C'est avec le désir de mener un tel projet qu'est née cette thèse, fruit d'une collaboration entre deux laboratoires :

- L'équipe **BioMMat** (Biomedical and Mechanical Engineering of Materials), au laboratoire **TIMC-IMAG** (Technologies de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité –Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble), unité mixte de recherche du CNRS (UMR 5525) et de l'Université Grenoble-Alpes ; notamment spécialisée dans la caractérisation expérimentale des élastomères bio-résorbables.

- Le département des **Biopolymères Artificiels** de l'**IBMM** (Institut des Biomolécules Max Mousseron), unité mixte de recherche du CNRS (UMR 5247) et de l'Université de Montpellier ; notamment spécialisé dans la synthèse et l'étude de polymères dégradables pour des applications biomédicales.

L'objectif de ce projet pluridisciplinaire de recherche translationnelle a été de réunir les compétences en chimie des matériaux polymères et caractérisation expérimentale des élastomères bio-résorbables de ces deux laboratoires afin de développer un prototype de prothèse biliaire résorbable (RIBS) répondant au cahier des charges évoqué précédemment. Afin de rendre compte des travaux effectués dans le cadre de ce projet, ce manuscrit de thèse s'articulera en cinq parties.

Le premier chapitre est une **étude bibliographique** consacrée tout d'abord à la TH et au système biliaire, avec un accent particulier sur les complications biliaires et les moyens de prévention de ces complications. Après avoir développé l'intérêt de concevoir un dispositif médical à partir d'une structure polymère, nous ferons un état des lieux des travaux d'ores et déjà décrits dans la littérature sur les dispositifs biliaires résorbables. Cet état de l'art nous permettra de définir un **cahier des charges** pour le développement d'une prothèse biliaire résorbable pour sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation hépatique.

Le deuxième chapitre est une **étude *in vitro***, consacrée à **la conception et l'évaluation de la dégradation** dans des conditions biliaires simulées d'un RIBS. Avec évaluation des

propriétés mécaniques et physico-chimiques au cours de la dégradation par rapport aux exigences liées au cahier des charges.

Le troisième chapitre est un prérequis à une **étude in silico**, de modélisation du **comportement mécanique de la voie biliaire** et du comportement synergique lors de l'implantation de la prothèse. Nous avons décrit la microstructure de la voie biliaire humaine au moyen d'une analyse histologique. Puis nous avons caractérisé le comportement mécanique de la voie biliaire humaine et l'impact de différents processus de conservation des tissus mous humains.

Le quatrième chapitre est une **étude in vivo** chez le rat, évaluant le **comportement mécanique, radiologique et histologique du polymère PCL-TIB / PLA-PEG-PLA** au cours de la dégradation afin d'explorer son utilité pour la confection d'un RIBS. Nous avons ensuite évalué l'implantabilité du prototype de RIBS chez l'homme.

Enfin, le cinquième et dernier chapitre est un **prérequis en vue d'une valorisation industrielle**, avec une étude de la réglementation applicable au développement d'une prothèse biliaire comme dispositif médical implantable, le dossier de conception et le dossier technique nécessaire pour le marquage CE.

Les chapitres 2, 3 et 4 correspondent à des projets d'articles, et seront présentés comme tel dans le manuscrit.

CHAPITRE I

CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

CHAPITRE I : CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

INTRODUCTION DU CHAPITRE

L'objectif du projet est de développer un prototype de prothèse biliaire interne résorbable (RIBS) afin de réduire les complications biliaires en transplantation hépatique (TH). Ce premier chapitre nous permettra de situer ce projet dans le contexte médical et de réaliser un état de l'art sur le sujet, pour au final établir un cahier des charges qui servira de feuille de route tout au long du développement du RIBS. Ce chapitre s'articulera en 3 sous-chapitres :

Le premier sous-chapitre traitera des aspects purement médicaux de la TH et de ses complications biliaires. Après quelques généralités sur la TH et ses indications, nous aborderons les aspects chirurgicaux de la TH en insistant sur les aspects techniques de la reconstruction biliaire. Après une seconde partie théorique sur l'anatomie et la physiologie du système biliaire, nous étudierons les principales complications biliaires anastomotiques en TH. La dernière partie de ce sous chapitre sera consacrée à un état de l'art sur les moyens de prévention des complications.

Le deuxième sous-chapitre sera axé sur le versant matériau de ce projet, nous développerons la place et l'attrait des biomatériaux dégradables synthétiques pour la conception d'un dispositif médical, avec des rappels physico-chimiques sur les polymères d'intérêts pour notre application. Dans un second temps, nous ferons un état des lieux sur les voies d'innovations dans la prévention des complications biliaires, avec les travaux dans la littérature sur les dispositifs biliaires résorbables et le développement de l'ingénierie tissulaire pour le système biliaire.

Le dernier sous-chapitre nous permettra de conclure cet état de l'art, en établissant le cahier des charges pour le développement du RIBS pour sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation hépatique.

CHAPITRE I : CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

A- Aspects médicaux liés à la transplantation hépatique

1. LA TRANSPLANTATION HÉPATIQUE

1.1. Généralités

L'évolution de la transplantation hépatique (TH) constitue une illustration remarquable du progrès médical de ces 20 dernières années. La découverte et l'amélioration de l'immunologie de transplantation, le progrès des techniques chirurgicales, de la réanimation médicale et de la conservation des organes prélevés, sont les éléments fondamentaux qui ont permis à la transplantation de passer de la thérapeutique expérimentale à un traitement à part entière d'une d'hépatopathie irréversible.

Depuis la première TH réalisée chez l'homme en 1963 par Thomas Starzl à Denver [29], on peut distinguer 3 périodes : du stade expérimental de 1963 à 1970, la transplantation hépatique passe au stade d'investigation clinique dans les années 70 pour devenir, à partir des années 80, une véritable thérapeutique grâce, notamment, à l'introduction de la Ciclosporine [30]. Il y a eu ensuite la phase de maturation des années 80s, puis celle de perfectionnement des années 90s. L'évolution actuelle s'intéresse à l'élargissement des indications de la TH, impliquant une réflexion sur son organisation générale. En effet le contraste est fort entre la rareté persistante de l'offre d'organes et la demande croissante.

Actuellement, le taux de survie à 1 an pour toutes les indications est d'environ 80 - 90 %, le taux de survie 5 ans toutes indications confondues est de 60 à 70 % [31]. Après TH, plus de 80% des patients reprennent une vie normale. Les enfants retournent à l'école, les adultes à leurs responsabilités familiales, leurs emplois et à des activités sociales habituelles. Cependant, il persiste une importante morbidité et mortalité liée aux complications immunologiques, infectieuses, rénales, vasculaires et en particulier, aux complications biliaires.

La transplantation implique des aspects médico-légaux, qui sont encadrés en France par l'Agence de la Biomédecine. Ses missions sont de gérer la liste nationale des malades en attente de greffe, de coordonner les prélèvements d'organes, la répartition et l'attribution des organes prélevés, d'assurer l'évaluation des activités médicales des équipes de transplantation, de gérer

le registre national des refus au prélèvement, de promouvoir la recherche en transplantation et de promouvoir le don d'organes.

Le don d'organe est encadré par 4 grands principes éthiques inscrits dans la loi de bioéthique : 1- le consentement présumé (inviolabilité du corps humain) ; 2- la gratuité du don (non patrimonialité du corps humain) ; 3- l'anonymat du don ; et 4- l'interdiction de publicité. La pénurie actuelle compromet l'accessibilité à la transplantation et s'oppose au principe d'équité qui n'est pas inscrit dans la loi.

1.2. Les indications

Ce traitement s'adresse aux malades ayant une insuffisance hépatique terminale ou certains cancers du foie. Le foie n'arrive plus à assurer ses fonctions d'une façon adaptée à la demande de l'organisme qui l'abrite. Le foie est, physiologiquement, doté de multiples fonctions qui concourent au maintien d'une vie normale (synthèse des facteurs de la coagulation, synthèse des protéines sanguines, métabolisme des produits de la digestion, production de bile...). Il peut être le siège d'affections (virales, médicamenteuses, toxiques, auto-immunes) lesquelles peuvent entraîner des perturbations de la fonction hépatique selon un mode aigu (hépatite aiguë) ou selon un mode chronique (cirrhose).

Les indications principales de TH sont :

- Les maladies parenchymateuses chroniques du foie : cirrhose quelle qu'en soit la cause (infection virale B ou C, hépatite chronique auto-immune, alcoolisme). Dans le cas d'une cirrhose alcoolique, la TH ne doit être envisagée qu'après une période d'abstinence minimale de 6 mois.
- Les maladies cholestatiques chroniques du foie c'est à dire, chez l'adulte, la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante ; et chez l'enfant l'atrésie des voies biliaires.
- Les hépatites fulminantes et sub-fulminantes.
- Les cancers primitifs du foie sont une indication de transplantation hépatique dans des cas très sélectionnés.
- Certaines maladies métaboliques ou génétiques avec atteinte hépatique peuvent être des indications de transplantation hépatique, comme la maladie de Wilson, l'amylose, le déficit en α -1-antitrypsine, l'hémochromatose génétique décompensée au stade de cirrhose.

Il existe des contre-indications absolues à la TH : défaillance viscérale extra-hépatique (cœur, poumon, cerveau), processus infectieux non contrôlé, tumeur maligne extra-hépatique présumée non guérie, psychoses non traitées.

Certaines contre-indications sont relatives, comme l'âge (discussion au cas par cas au-delà de 65 ans), ou l'état psycho-social.

1.3. Aspects chirurgicaux de la transplantation

1.3.1. Prélèvement chez le donneur

Le prélèvement hépatique est réalisé de façon standardisée selon la procédure initialement décrite par Starzl [32]. La plupart du temps, le prélèvement est réalisé chez des donneurs vivants, en état de mort encéphalique. Après inspection de la cavité abdominale et palpation du foie à la recherche de contre-indications au prélèvement, les éléments vasculaires et biliaires sont soigneusement repérés et disséqués, avec une attention particulière aux variations artérielles (recherche de la présence d'une artère hépatique gauche provenant de l'artère gastrique gauche et d'une artère hépatique droite provenant de l'artère mésentérique supérieure). La circulation sanguine est ensuite interrompue, avec refroidissement rapide du foie. Le foie est perfusé avec une solution de conservation froide, et de la glace est ajoutée dans la cavité abdominale, afin de préserver au mieux le greffon. Le foie est finalement prélevé à froid, et ensuite conservé à une température de 4°C en attendant l'implantation.

1.3.2. Intervention chez le receveur

La procédure chirurgicale de la TH est désormais standardisée, elle comporte 3 étapes :

- Hépatectomie totale du foie pathologique avec préservation cave
- Implantation du foie avec réalisation de 3 anastomoses vasculaires
- Reconstruction de la voie biliaire

Lors de l'hépatectomie, la dissection initiale est entreprise dans le pédicule hépatique. La veine porte, l'artère hépatique et la voie biliaire sont isolées, puis sectionnées de façon à laisser le maximum de longueur pour l'implantation. Dans certains cas, une dérivation porto-cave transitoire peut -être réalisée afin de permettre le drainage veineux mésentérique pendant l'implantation. La veine cave est quasi-systématiquement conservée.

L'implantation consiste à réaliser 3 anastomoses vasculaires afin de revasculariser le greffon (**Figure I-1**). L'anastomose cavo-cave est réalisée avec un clampage latéral de la veine cave inférieure du receveur. Elle est généralement latéro-latérale en utilisant un patch de veine cave inférieure du donneur (**Figure I-1 B**). L'anastomose porte réalisée est termino-terminale. L'anastomose artérielle est, en générale, termino-terminale. Elle est réalisée par un surjet de fil monobrin non résorbable entre le tronc cœliaque du greffon et, selon le diamètre des vaisseaux, soit avec l'artère hépatique propre du receveur, soit au niveau de la bifurcation de l'artère gastro-duodénale et de l'artère hépatique, plus sûre car plus large [32]. L'existence d'anomalies artérielles du donneur ou du receveur, dans environ 12% des cas [33], nécessite la réalisation d'anastomoses plus complexe avec parfois interposition artérielle ou veineuse [34], ou implantation sur l'aorte du receveur. La qualité de l'anastomose artérielle est fondamentale, puisque la vascularisation biliaire étant exclusivement artérielle, une mauvaise perfusion artérielle du greffon majore le risque de complications biliaires.

La dernière étape de la transplantation est la reconstruction biliaire.

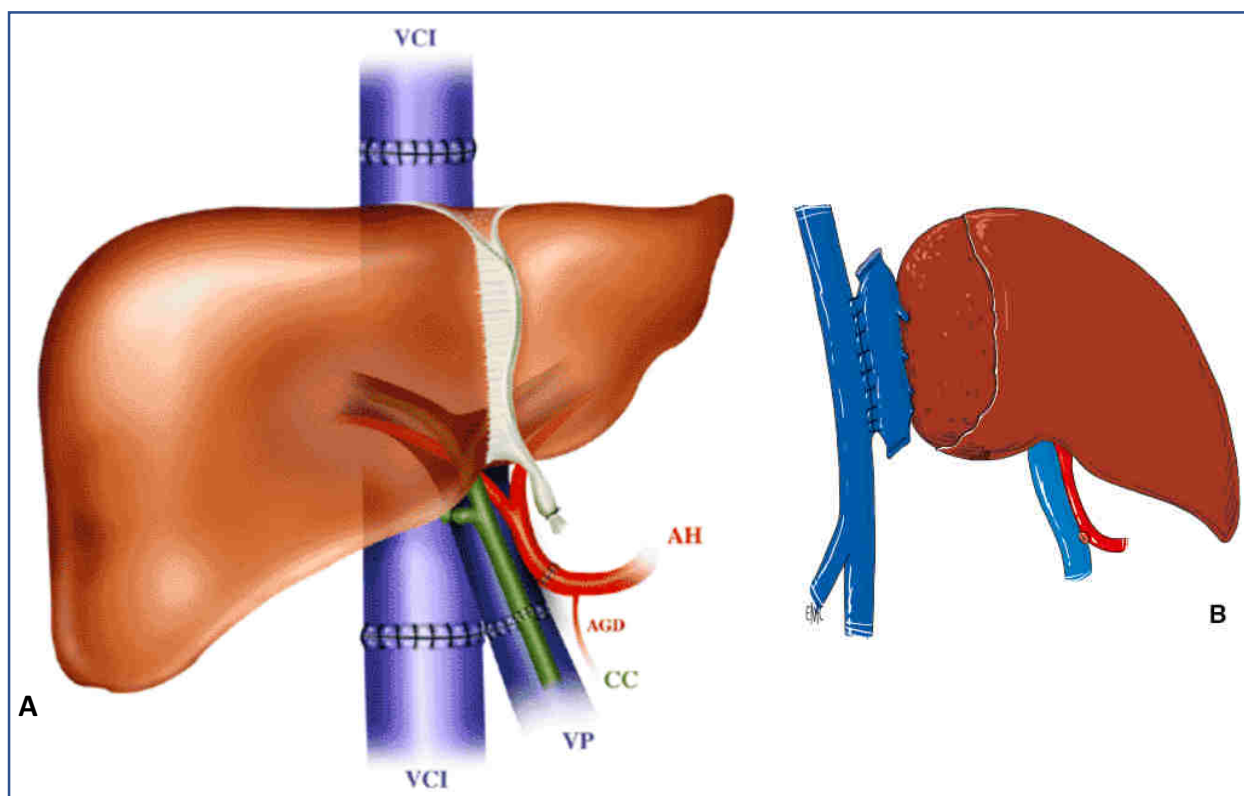


Figure I-1 : Représentation schématique d'une transplantation hépatique orthotopique. **A.** Visualisation des 4 structures anastomosées, avec remplacement cave (*selon ouest-transplant.org*). **B.** Représentation d'une anastomose cavo-cave latéro-latérale [35]. *VCI* : Veine cave inférieure ; *VP* : Veine porte ; *AH* : Artère hépatique ; *CC* : Conduit cholédoque.

1.3.3. Techniques de reconstruction biliaire

Pendant toute la durée de l'intervention, une attention toute particulière doit être portée à ne pas léser les canaux biliaires. Ils ne doivent pas être saisis avec des instruments par exemple. Le tissu conjonctif entourant les canaux biliaires doit être systématiquement conservé afin de préserver la vascularisation péri-canalalaire.

Concernant le type d'anastomose biliaire, bien que ce soit un des facteurs déterminant dans le risque de développer des complications biliaires, il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus concernant la reconstruction biliaire [36]. Plusieurs techniques de reconstruction biliaires sont encore actuellement utilisées, avec des avantages et des inconvénients (**Figure I-2**) :

1- Choledoco-choledocienne termino-terminale : technique la plus utilisée dans la littérature, car c'est l'anastomose la moins à risque de complications. C'est également l'anastomose réalisée par notre équipe en première intention. Elle a pour avantage d'être la plus physiologique en préservant la fonction barrière contre les bactéries et les sécrétions intestinales du sphincter d'Oddi. Elle facilite également les gestes endoscopiques post-transplantation lorsqu'ils sont requis.

2- Choledoco-choledocienne latéro-latérale : de moins en moins utilisée, au profit de la termino-terminale. Elle se complique de plus de sténoses, et nécessite une voie biliaire plus longue.

3- Choledoco-jéjunale : appropriée pour les voies biliaires fines car est moins à risque de sténose. Elle est utilisée en cas de retransplantation, ou de nécrose des voies biliaires, car permet une anastomose sans tension quel que soit le niveau. Elle est néanmoins moins physiologique car shunte le sphincter d'Oddi.

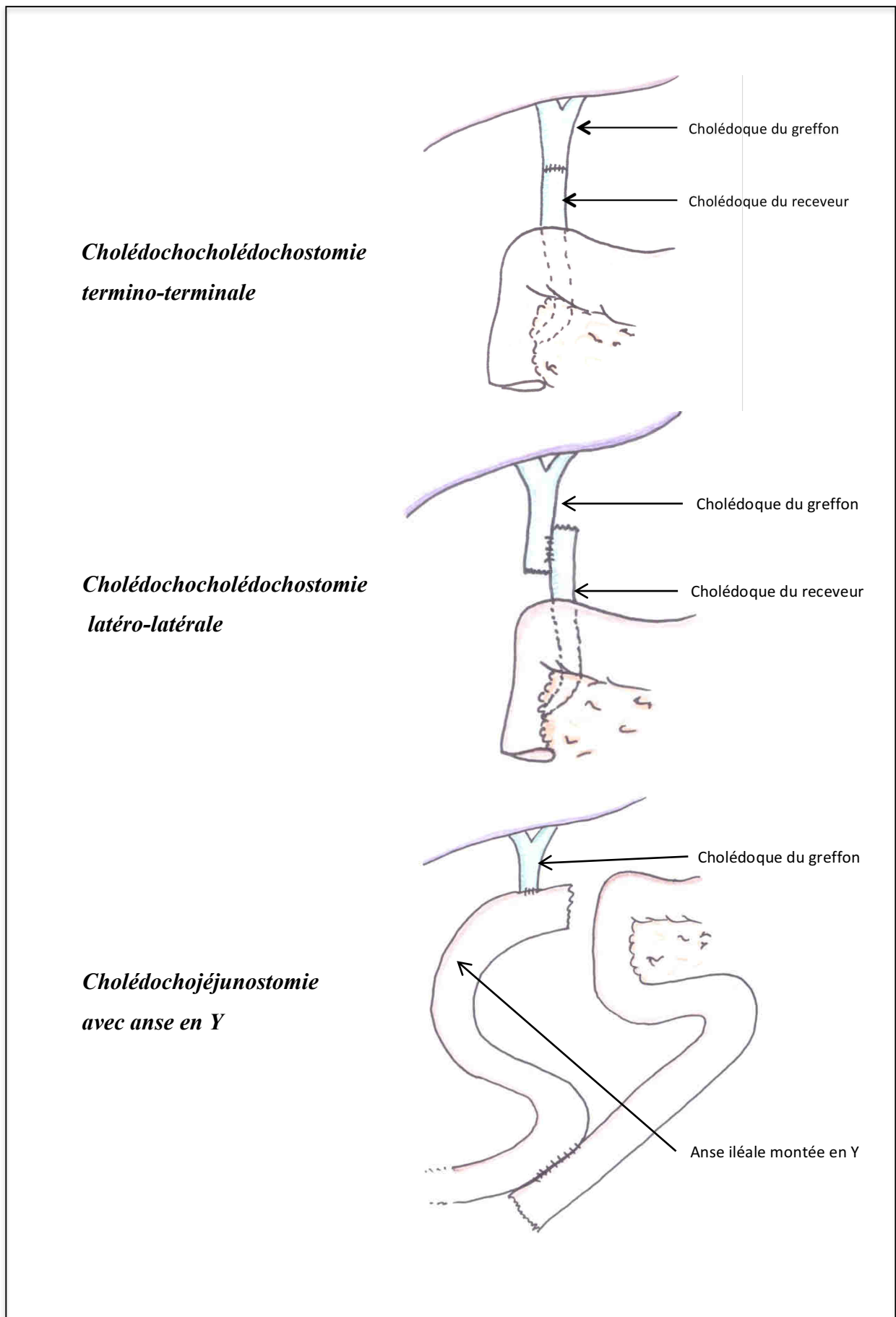


Figure I-2 : Différents types de reconstruction biliaire en Transplantation Hépatique

Plusieurs mesures préventives lors de la réalisation de l'anastomose ont été décrites par Hirano [37]. L'anastomose doit être réalisée sans tension, les points doivent être totaux sur la voie biliaire pour obtenir un alignement muco-muqueux, et le fil utilisé doit être monobrin de taille 4/0 ou 5/0. Concernant le choix entre une suture à points séparés ou en surjet (**Figure I-3**), aucune différence significative n'a jamais été mise en évidence dans la littérature [38]. Le surjet semble néanmoins moins à risque de fistule, mais plus à risque de sténose [37,39,40]. Les points séparés sont donc à privilégier pour les anastomoses sur des voies biliaires fines.

En fin d'intervention, la mise en place de drains au contact de l'anastomose et extériorisés à la peau est systématique.

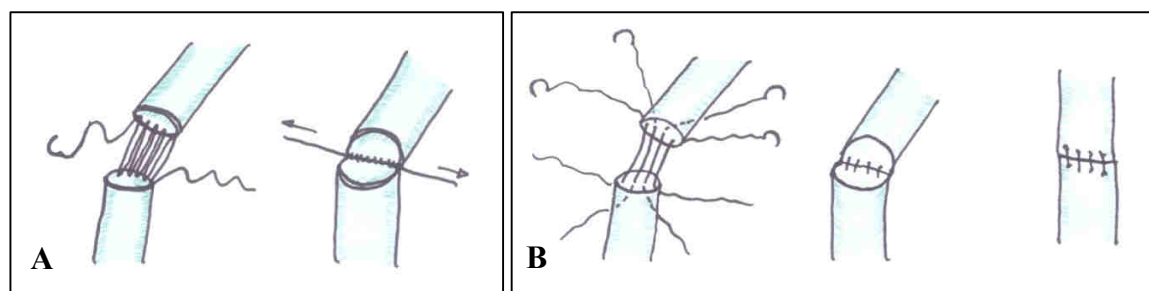


Figure I-3 : Techniques de reconstruction anastomotique. A : surjet ; B : points séparés.

1.4. Suites postopératoires

1.4.1. Immunosuppression

L'adjonction de la ciclosporine aux corticoïdes et à l'azathioprine, au début des années 1980, a permis le développement de la transplantation d'organe solide. Depuis lors, de nombreux médicaments immunosuppresseurs ont été développés et ont permis de réduire l'incidence du rejet aigu (actuellement de l'ordre de 25 % après TH), du rejet grave ou réfractaire et du rejet chronique [41]. L'objectif actuel de l'immunosuppression est de réduire les effets indésirables des médicaments, et, dans le futur, de favoriser l'instauration d'une tolérance, qui permettrait, à terme, d'interrompre complètement le traitement immunosuppresseur prophylactique. Un des effets indésirables des immunosuppresseurs, en particulier des corticoïdes est le ralentissement de la cicatrisation par une action anti-inflammatoire. En ce qui nous concerne, cela peut donc ralentir la cicatrisation biliaire et augmenter les conséquences liées à une complication biliaire anastomotique.

1.4.2. Fonction hépatique et suivi postopératoire après TH

Le suivi postopératoire des patients greffé est rigoureux, et à vie. L'objectif est double, s'assurer de l'absence de complications (postopératoires, iatrogènes ...), et s'assurer de la bonne fonction du greffon (vascularisation, rejet, récurrence de la maladie initiale...).

Dans le but d'une évaluation post-opératoire, la fonction hépatique est divisée en 3 grandes catégories : synthèse, excrétion et métabolisme.

La fonction de synthèse comprend la production des facteurs de coagulation, de l'albumine et d'autres protéines telles que la transferrine et l'haptoglobine. La synthèse immédiate des facteurs de coagulation est nécessaire à hémostasie et donc au succès de la transplantation. Dans la période post-opératoire, la numération plaquettaire, le taux de prothrombine (TP) et le temps de céphaline activée sont habituellement suffisants pour surveiller l'état de la coagulation. Le TP qui reflète la synthèse de facteurs spécifiques de la coagulation par les hépatocytes est un indicateur précoce de la fonction du greffon. En cas de dysfonction du greffon un apport supplémentaire en facteur de coagulation permet une suppléance temporaire. Si aucune amélioration du temps de prothrombine ne survient, une lésion d'ischémie/reperfusion ou une complication technique doivent être rapidement suspectées et recherchées.

Fonction d'excrétion : d'une façon générale, la quantité de bile sécrétée par le greffon est fortement diminuée durant les premiers jours suivant la TH, avec une moyenne de 4 à 8 ml par heure et ce jusqu'aux environs du dixième jour [42]. La production de bile, qui est visualisée souvent en peropératoire, est la première indication de la reprise des fonctions excrétoires. Habituellement, la bile est marronne, jaune foncé, très visqueuse. Jusqu'à 300 ml peuvent être produits par jour. Une bile légèrement colorée ou claire comme de l'eau indique une atteinte sévère du greffon. Elle est le plus fréquemment due à des lésions d'ischémie/reperfusion, à une non fonction primaire ou à un rejet.

La fonction métabolique du foie reprend immédiatement après l'implantation. Les deux paramètres qui sont la lactactémie et la température permettent un suivi de cette fonction métabolique. Le métabolisme du foie produit une quantité importante de chaleur et le réchauffement commence fréquemment peu après le déclampage. L'incapacité à se réchauffer ou un réchauffement lent après fermeture de l'abdomen doivent faire suspecter un mauvais fonctionnement du greffon. Généralement, la lactatémie se normalise en 6 à 12 heures. Une augmentation ou une élévation persistante des lactates indiquent une dysfonction du greffon.

Le métabolisme du glucose est par contre un mauvais reflet du fonctionnement du greffon, les glycémies restent généralement élevées quel que soit l'état du greffon. Une hypoglycémie ne survient que en cas de lésions sévères du greffon.

2. LE SYSTEME BILIAIRE : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE

2.1. Anatomie des voies biliaires

Le système biliaire est constitué par les voies biliaires intrahépatiques et la voie biliaire extrahépatique (**Figure I-4**).

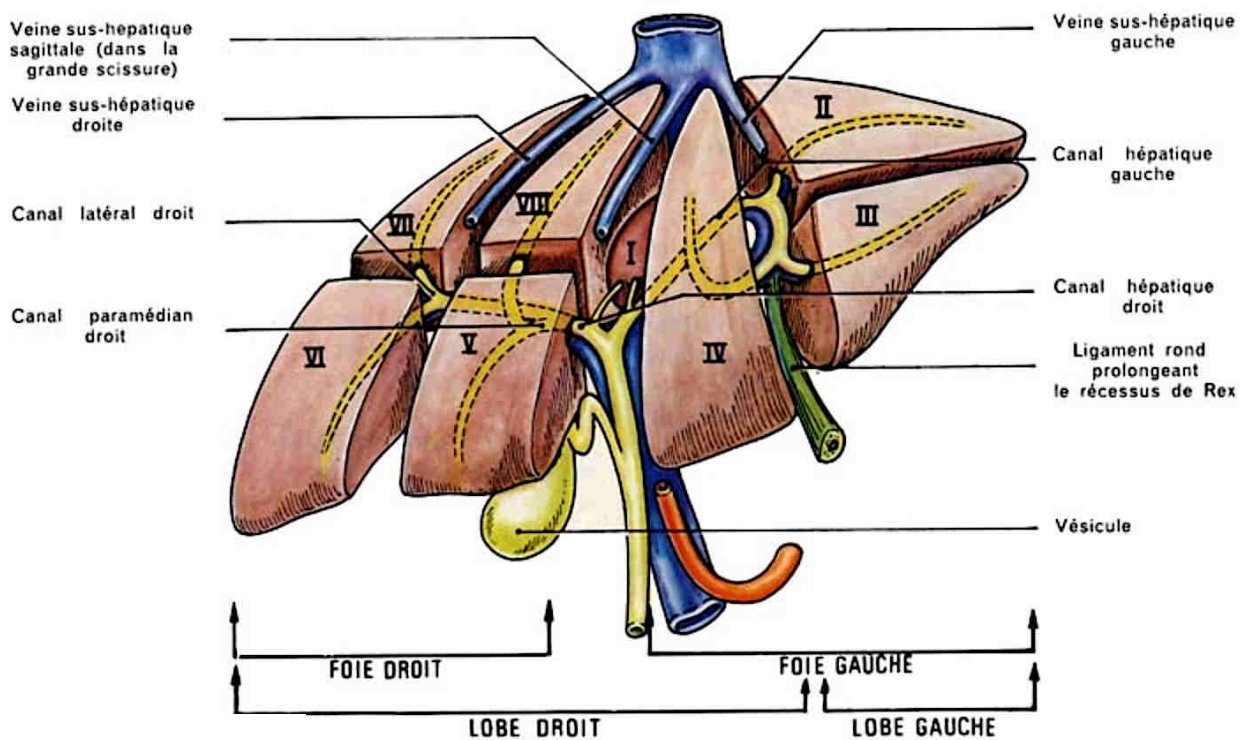


Figure I-4 : Voies biliaires et division segmentaire du foie d'après Couinaud [43]. Les segments hépatiques sont numérotés de I à VIII. Chaque segment hépatique est drainé par le conduit biliaire segmentaire correspondant (*selon hepatoweb.com*).

2.1.1. Les voies biliaires intra-hépatiques

On appelle voies biliaires intrahépatiques les conduits biliaires secondaires (segmentaires et sous-segmentaires) en amont des deux branches principales droite et gauche qui sont extra-hépatiques.

Les voies biliaires intra-hépatiques suivent, très exactement, la disposition modale de la veine porte et sont, généralement, en position épiportale par opposition aux artères qui sont, en règle générale, en position hypoportale.

Dans le foie droit (segments V-VIII), le drainage biliaire se fait par le canal postérieur pour les segments VI et VII (**Figure I-4**), et par le canal paramédian pour les segments V et VIII. Le canal du segment VII est au-dessus et en arrière de la veine porte correspondante, il est rejoint, sur la face supérieure de celle-ci, par les canaux du segment VI. Le canal paramédian, qui suit le bord gauche de la veine médiane dans 88% des cas, selon Couinaud [43], s'unit au canal postérieur dans 72% des cas pour former le canal hépatique droit, au-dessus et en avant, de la veine porte droite.

Du côté gauche, les canaux des segments II et III se réunissent pour former le canal hépatique gauche, sur la ligne scissurale porte gauche. Le segment IV est drainé par plusieurs canaux antérieurs et postérieurs qui forment un tronc unique ou double, se jetant dans la portion transversale du canal hépatique gauche.

Le drainage du secteur dorsal ou segment I, se fait par les canaux hépatiques droit et gauche.

2.1.2. Les voies biliaires extra-hépatiques

Les voies biliaires extra-hépatiques sont constituées par la voie biliaire principale (VBP) et la voie biliaire accessoire (**Figure I-5**). La voie biliaire principale s'étend de la convergence biliaire au sphincter d'Oddi. La convergence des canaux hépatiques droite et gauche se fait dans le pédicule hépatique. Dans la disposition habituelle qui ne se rencontre que dans 57% des cas, l'angle de convergence est en moyenne de 80°, le canal hépatique droit prolongeant le canal hépatique commun.

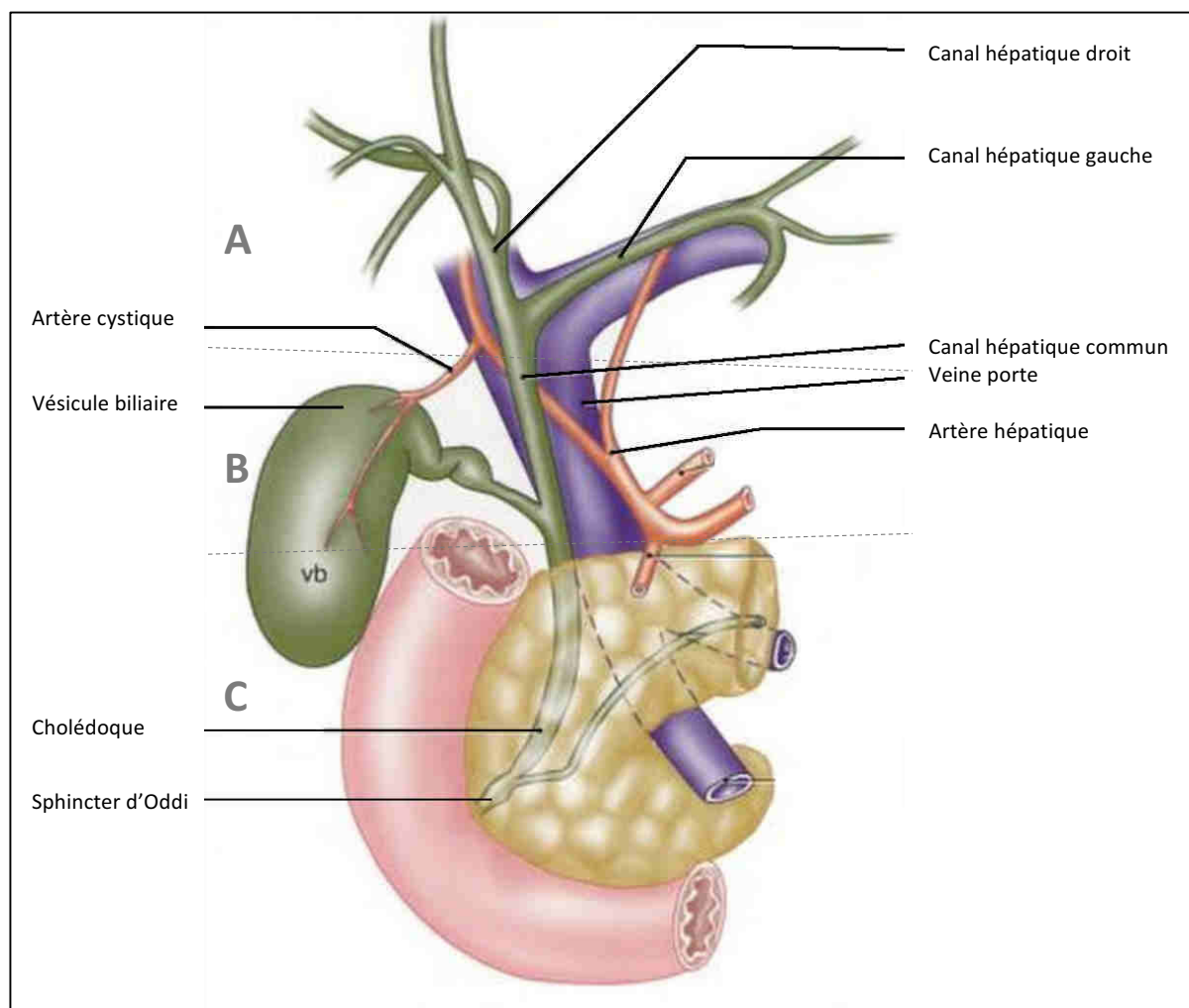


Figure I-5 : Les 3 niveaux des voies biliaires extra-hépatiques.
*A : Niveau supérieur ou segment hilair ; B. Niveau moyen ou pédiculaire ;
 C. Niveau inférieur rétro-péritonéal*

Le trajet de la VBP dans son ensemble est oblique caudalement, latéralement et en arrière, formant une courbe à concavité antérieure et latérale. La voie biliaire accessoire (vésicule biliaire et canal cystique) s'abouche dans la VBP à la jonction entre canal hépatique et cholédoque. La longueur de la VBP est de l'ordre de 80 à 100 mm, son diamètre d'environ 5mm.

La VBP comporte deux parties :

- le canal hépatique commun, né de la convergence biliaire se termine à l'abouchement du canal cystique.
- le canal cholédoque est formé de la réunion des canaux cystique et hépatique commun. Après un trajet oblique vers le bas et la droite, il se termine dans le deuxième duodénum au niveau du sphincter d'Oddi.

La VBP est répartie sur 3 niveaux (**Figure I-5**) :

Un niveau supérieur ou segment hilare : est représenté par la convergence biliaire ou confluent biliaire supérieur. Il est situé dans le hile. La convergence biliaire est entourée d'une gaine (de Glisson) dont l'épaississement au niveau du hile hépatique forme la plaque hilare. Généralement, les branches d'origine du canal hépatique sont entremêlées avec les branches terminales de l'artère et occupent avec elles le plan antérieur du hile du foie. Le plan postérieur est formé par les branches terminales de la veine porte.

Un niveau moyen ou pédiculaire : correspond au segment de la VBP qui chemine dans le pédicule hépatique sur le bord externe du petit épiploon et à la voie biliaire accessoire.

- *Le segment pédiculaire de la VBP*, est formé du canal hépatique commun et de la partie initiale du cholédoque. Il descend dans le pédicule hépatique sur la face antérieure et haute de la veine porte.
- *La voie biliaire accessoire* comprend la vésicule biliaire et le canal cystique : la vésicule biliaire est un réservoir musculo-membraneux appliqué à la face inférieure du foie. Le canal cystique prolonge la vésicule biliaire, de longueur variable entre 20 et 50 mm, il se dirige caudalement et médialement pour rejoindre le canal hépatique commun à un niveau variable situé entre le hile et la région intrapancréatique. Il chemine en général parallèlement au conduit hépatique commun puis il se joint à lui pour former le canal cholédoque. De nombreuses variations de ces conduits sont possibles. Il arrive que le conduit cystique longe le conduit hépatique commun et lui adhère intimement. Le conduit cystique peut aussi être court ou même absent. Dans certains cas, la réunion des conduits cystique et hépatique commun est bas située, les deux peuvent être unis par du tissu fibreux. Dans d'autres cas le conduit cystique décrit un trajet en spirale en avant du conduit hépatique commun avant de s'unir à lui du côté gauche.

Un niveau inférieur rétropéritonéal : correspond à la partie de la VBP située dans la loge duodéno pancréatique. On lui décrit 3 parties :

- *Le segment rétroduodénal*, (10 à 30 mm) chemine en arrière du premier duodénum.
- *Le segment pancréatique*, (20 à 25 mm) est au contact de la face postérieure de la tête du pancréas.
- *Le segment intra-duodénal*, (10 à 20 mm) est dans l'épaisseur de la paroi du duodénum, le cholédoque, dont le trajet est oblique, va s'unir avec le canal de Wirsung pour former un canal commun (85% des cas). Cet ensemble appelé sphincter d'Oddi comprend un sphincter propre du cholédoque et du Wirsung et un sphincter commun plus distal. Cet appareil sphinctérien est constitué de fibres musculaires lisses circulaires ou spiralées. Au niveau du sphincter d'Oddi, le cholédoque voit réduire son calibre à environ 2mm. Le sphincter du canal commun par sa saillie inconstante dans la lumière intestinale constitue la papille duodénale majeure. La distance séparant le point où le cholédoque aborde la tunique du duodénum jusqu'au sommet de la papille est en moyenne de 15 mm.

2.2. Vascularisation et innervation des voies biliaires

2.2.1. Vascularisation artérielle

Les complications biliaires après transplantation hépatique dépendent de la vascularisation artérielle, puisque la vascularisation biliaire est artérielle exclusive.

La **Figure I-6** représente la vascularisation artérielle de la VBP supra-duodénale. Au niveau des voies biliaires hilaires la vascularisation est assurée par de fins rameaux artériels issus des branches droite et gauche de l'artère hépatique. Il existe une artère hilaire marginale créant un pont entre la gauche et la droite au niveau du hile. Concernant la vascularisation de la VBP, elle se fait par l'intermédiaire d'artères axiales le long des bords droit et gauche de la voie biliaire. Ces artères axiales assurent pour 1/3 un apport descendant provenant de l'artère hépatique droite et pour 2/3 par un apport ascendant provenant des artères pancréatico-duodénales, constituant un réseau anastomotique entre l'apport descendant et ascendant. Les branches ascendantes forment les artères, latérale et médiale, dénommées respectivement artère à 9 heures et à 3 heures, qui donnent 7 à 8 branches artérielles terminales, chacune d'un diamètre de 0.3 mm [44]. Ces deux branches axiales ascendantes sont issues d'une branche

retroduodénale issue de l'artère gastroduodénale : l'artère retroduodénale de Wilkie [45,46]. Toutes ces artères terminales forment un plexus épicholédocien.

L'apport ascendant est supprimé par le prélèvement, et la vascularisation de la VBP du greffon dépend uniquement de l'apport descendant. Pour bien rester vascularisé, la VBP du greffon doit être sectionné haut, et être disséqué le moins possible dans le pédicule hépatique.

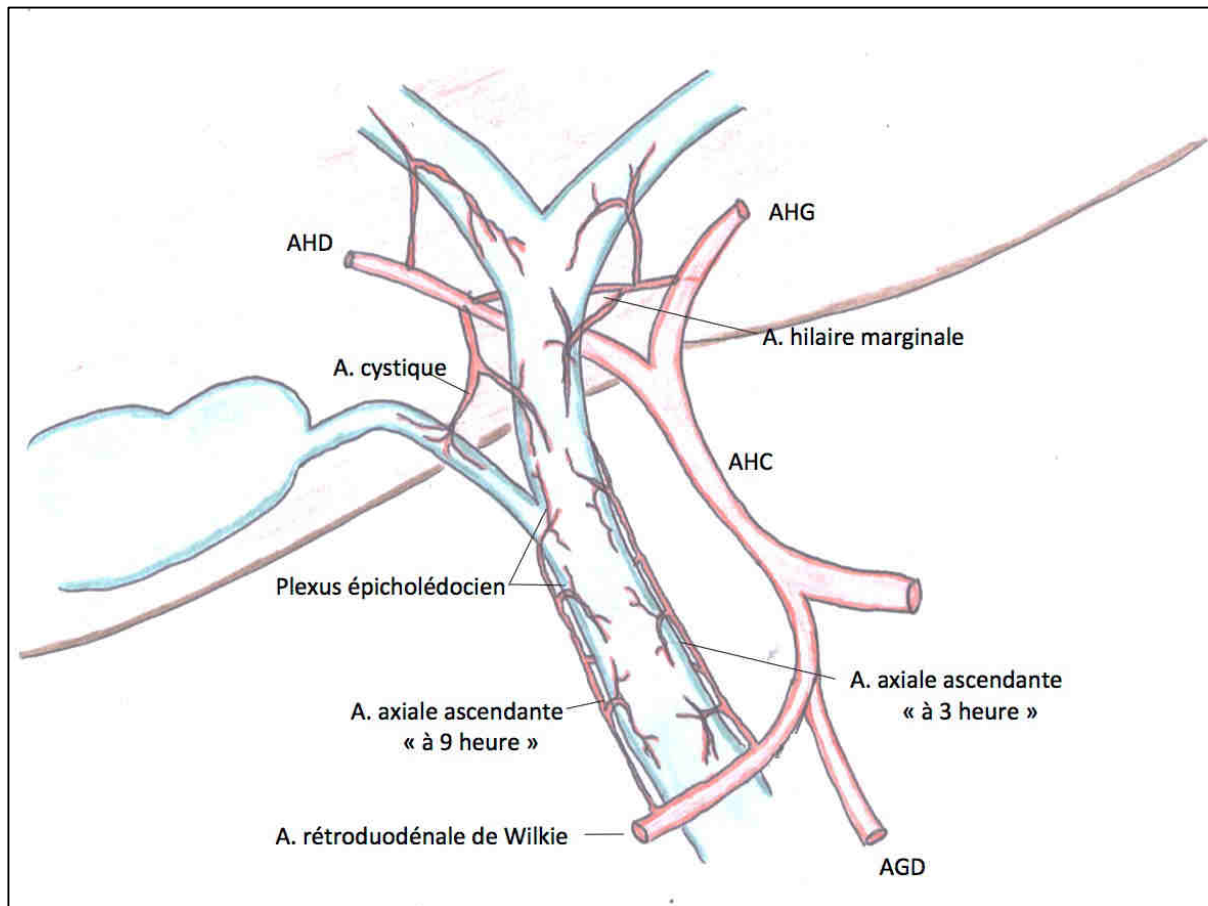


Figure I-6 : Vascularisation artérielle de la VBP supra-duodénale.
AHD : Artère hépatique droite, AHG : Artère hépatique G, AHC : Artère hépatique commune, AGD : Artère gastro-duodénale.

L'alimentation de la VBP est assurée par un réseau artériel épicholédocien [47]. La vascularisation se fait sur trois niveaux : plexus épicholédocien ; premier plexus intramural et deuxième plexus intramural. Ils s'anastomosent et forment des collatérales (**Figure I-7**).

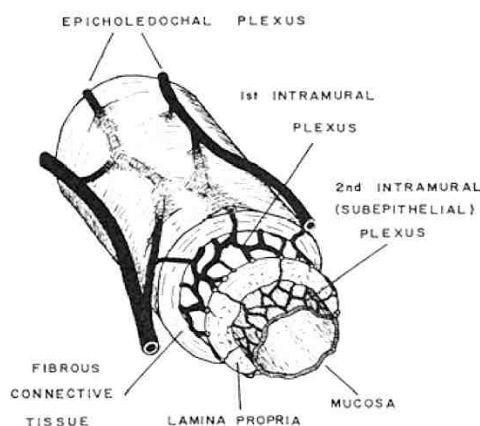


Figure I-7 : Les trois niveaux de la vascularisation artérielle de la VBP

2.2.2. *Vascularisation veineuse*

Les veines de la VBP se drainent dans la veine porte par l'intermédiaire de l'arcade para-biliaire, réseau veineux anastomotique en situation antérieure et médiale par rapport au canal hépato-cholédoque. Cette arcade constitue des anastomoses avec les veines pancréatico-duodénales et la veine coronaire stomacique et forment ainsi une voie de dérivation possible en cas de thrombose portale.

2.2.3. *Drainage lymphatique*

Les lymphatiques de la VBP se répartissent le long du pédicule hépatique depuis les ganglions intra et sus-pancréatiques jusqu'aux ganglions du hile. Ils font ensuite relais au niveau des ganglions cœliaques pour rejoindre le canal thoracique.

2.2.4. *Innervation*

Le plexus hépatique est formé par le plexus cœliaque pour la plus grande part mais aussi les ganglions semi-lunaires et le tronc pneumogastrique. Il peut être divisé en deux parties distinctes :

Le plexus antérieur ou péri-artériel, issu de la partie gauche du plexus cœliaque, il constitue un réseau à larges mailles autour de l'artère hépatique et de ses branches. Il émet également des filets pour le cholédoque et le cystique et fournit les nerfs latéraux de la vésicule biliaire. Le plexus antérieur semble se distribuer au foie gauche.

Le plexus postérieur, n'en a que le nom car il est en fait formé de 3 ou 4 troncs nerveux bien individualisables, issus de la partie droite du plexus cœliaque : le nerf rétro-cholédocien qui donne un filet au canal cystique et à la vésicule biliaire ; un groupe rétro-porte formé de 2 ou 3 nerfs et un nerf rétro-artériel. Le plexus hépatique postérieur qui pénètre la partie droite du hile semble se distribuer au foie droit.

2.3. Sécrétion et excrétion biliaires

La sécrétion et l'excrétion biliaire sont des fonctions dévolues au foie : carrefour des voies métabolique, elles représentent sa fonction exocrine.

2.3.1. Bases structurales de la sécrétion

La sécrétion biliaire repose sur les hépatocytes représentant 60 % de la population cellulaire hépatique. Ils ont un caractère bipolaire. Le pôle supérieur est en rapport avec les capillaires fenêtrés du foie, des pores laissent passer les substrats. Au pôle basal, la bile est libérée au niveau des canalicules (encoches membranaires n'ayant pas de parois propres). Ils confluent pour former des systèmes canaux à parois propres appelés ductules, puis canal biliaire. Une partie de la sécrétion est ductulaire, l'autre partie est canalaire.

2.3.2. La bile, propriétés physiques et composition chimique

Elaborée par le foie, elle est sécrétée en permanence. Elle s'accumule dans la vésicule biliaire où elle subit des modifications : la bile vésiculaire est différente de la bile hépatique. C'est une sécrétion permanente mais qui est tout de même rythmée par les repas et par les variations nyctémérales (minimum la nuit, maximum le jour). La quantité secrétée varie de 0,8 à 1L par 24h.

La bile primaire élaborée par les hépatocytes est une solution aqueuse iso-osmotique composée d'environ 84 % d'eau, 11,5 % d'acides biliaires, 3 % de phospholipides, 0,5 % de cholestérol et de seulement 1 % d'autres composés [48,49].

Composition ionique : La bile contient des électrolytes à des concentrations équivalentes à celles du plasma (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'autres à des concentrations variables (chlore, bicarbonates). La composition ionique de la bile fluctue en fonction de différents stimuli, notamment en fonction de la concentration d'une hormone : la sécrétine. Dans les conditions basales, il est fréquent d'observer un trou anion-cation qui a été attribué à l'existence de composés anioniques cholérétiques dans la bile [50]. Sous l'influence de la sécrétine, la concentration de bicarbonates augmente, aux dépens du chlore et des acides biliaires. Le pH biliaire peut donc varier de 7 à 8,4.

Sels biliaires : Association d'un acide biliaire conjugué avec un acide aminé. L'acide biliaire est souvent sous forme ionisée, on parle donc de sel. Ils représentent 70 à 75 % des lipides biliaires. Les acides biliaires dérivent du cholestérol. Ils sont classés par leur nombre de radicaux hydroxyles. Les proportions les plus élevées sont celles des acides di et tri hydroxyles (80 %). Les radicaux hydroxyles favorisent l'hydrophilie donc le pouvoir tensioactif des sels biliaires. Les sels subissent un cycle entéro-hépatique. Ils sont déversés au niveau intestinal où ils jouent leur rôle tensioactif. Ils sont réabsorbés ensuite au niveau de l'intestin. Seulement 5 % sont éliminés dans les selles, le foie récupère 95 % des sels biliaires par la veine porte.

Les sels biliaires sont des agents tensioactifs, émulsifiants, ils favorisent la formation de micelles permettant ainsi l'action de la lipase. Ils agissent sur la motricité, favorisant le transit. Ils agissent également sur leur propre sécrétion.

Cholestérol : Il représente 6 à 10% des lipides biliaires. Il est déversé dans le duodénum où il se mélange avec le cholestérol alimentaire. 70% va être réabsorbé puis ramené au foie par le cycle entéro-hépatique, 30% est éliminé dans les matières fécales sous forme de coprostanol après dégradation par les bactéries intestinales saprophytes.

Phospholipides : Ils représentent 20% des lipides biliaires. Ce sont les lécithines toujours synthétisées de novo (ils ne participent pas au cycle entéro-hépatique).

Pigments biliaires : Ce sont des protéines biliaires, substances de déchet. Ils proviennent de la dégradation de l'hémoglobine. On obtient la bilirubine non conjuguée ou indirecte. La majorité passe dans le sang où elle est fixée et transportée par l'albumine. Une petite fraction est libre dans le sang, cette fraction doit être faible car la bilirubine est soluble dans les lipides. Si cette fraction augmente elle peut être toxique en particulier pour les neurones. Au niveau du foie la bilirubine subit la glucurono-conjugaison, elle est conjuguée avec l'acide glucuronique par la

glucuronyl-transférase. On obtient la bilirubine conjuguée ou directe retrouvée dans la bile. La bile est déversée dans le tube digestif où la bilirubine est déconjuguée et transformée en urobilinogène par les bactéries. L'urobilinogène a deux devenir possibles : 80% est transformé par les bactéries intestinales en stercobilinogène puis en stercobiline responsable de la couleur marronne des selles, 20% subit le cycle entéro-hépatique dont 1/4 repasse dans le foie et 3/4 repasse dans le sang et est éliminée en urobiline donnant une coloration jaune ambrée aux urines.

Protéines & peptides (glutathion) : comprend des protéines plasmatiques qui traversent les hépatocytes (albumine, IgA), et des protéines hépatiques (5'-nucléotidase, PAL, enzymes lysosomales, etc..).

La bile a un rôle digestif par les sels biliaires et les ions HCO_3^- pour neutraliser l'acidité du chyle. Elle permet d'éliminer les pigments biliaires, certains médicaments et certaines substances iodées, utilisées longtemps en radiographie pour former un produit de contraste.

2.3.3. Excrétions biliaires

Les excrétions biliaires reposent sur les canaux hépatique, cystique, cholédoque. La muqueuse de l'ensemble des canaux, et la très riche vascularisation font que ces structures sont adaptées à la réabsorption de l'eau.

La sécrétion biliaire est continue et le remplissage des voies biliaires est purement passif, il se fait par la résistance du sphincter d'Oddi. Le sphincter présente une contraction tonique. La bile est libérée sous une pression qui est inférieure au sphincter d'Oddi, donc elle va refluer et venir remplir la vésicule. En cas d'absence de vésicule, les voies biliaires prennent le relai. Le sphincter s'ouvre selon une séquence motrice qui ressemble au complexe migrant moteur de l'intestin. La plasticité des fibres musculaires lisses des parois biliaires n'oppose pas ou peu de résistance au remplissage. La vidange se fait par un continuum moteur qui naît au niveau de la vésicule créant une onde péristaltique qui va parcourir les voies excrétrices et amener la bile à la partie interne du sphincter d'Oddi. Celui s'ouvre puis se contracte sur la bile qu'il reçoit : il va éjaculer la bile dans le duodénum par jets successifs au moment des repas.

La commande de la motricité est surtout due à des facteurs hormonaux : La cholécystokinine va être responsable de la contraction vésiculaire et du continuum moteur. D'ailleurs la sécrétion est activée par les acides gras et les sels biliaires sont là pour digérer les lipides. La gastrine agit de la même façon en renforçant l'action de la cholécystokinine. Les facteurs nerveux participent aussi à la vidange. Le système nerveux parasympathique favorise l'excrétion. Il prépare la contraction en augmentant le tonus des fibres. Il intervient dès la phase céphalique de la sécrétion gastrique. Le système nerveux sympathique en dehors de l'excrétion biliaire est responsable du tonus du sphincter d'Oddi.

3. LES COMPLICATIONS BILIAIRES EN TRANSPLANTATION HEPATIQUE

3.1. Epidémiologie

Les complications biliaires sont une cause importante de morbi-mortalité en transplantation hépatique. Leur incidence est élevée avec nécessité de traitements longs et répétés, et du risque de perte de greffon [9–13]. La majorité des complications biliaires surviennent au niveau de l'anastomose biliaire, quelle que soit la technique utilisée pour la reconstruction chirurgicale. Le taux de complications biliaires rapporté dans les études est très variable. L'université de Pittsburgh par exemple rapporte une évolution du taux de complications biliaires de 19% en 1983 à 11,5 % en 1994. À la fin des années 2000, la prévalence des complications directement dues au système biliaire est de 5 à 25% [10–13] avec une tendance à la baisse ces toutes dernières années [9]. Les deux principales complications sont la fistule biliaire anastomotique (FBA) et la sténose biliaire anastomotique (SBA). Les autres complications biliaires moins fréquentes sont les fistules biliaires non anastomotiques, les sténoses biliaires non anastomotiques, les cholangites, ainsi que les lithiases cholédociennes. Les séries relativement récentes rapportent un taux de fistule biliaire dans 5 à 10 % des transplantations hépatiques et une incidence de sténose anastomotique de 9 à 12 % [12,14–16]. Le risque cumulé de sténose anastomotique augmente avec le temps, comme montré par Verdonk et al. [14] : de 6,6% à 1 an à 10,6% et 12,3% à respectivement 5 et 10 ans. Dans notre propre expérience à propos de 294 transplantés, le taux de complications biliaires était plus élevé, avec 20% de fistules biliaires anastomotiques et 29% de sténoses biliaires anastomotiques [51]. Ce taux élevé de complications biliaires peut sembler disproportionné aux vues des différentes données de la littérature. Néanmoins, dans la pratique courante, il semble

que le taux de complications biliaires est plutôt proche de 30%, ce qui est confirmé par une étude récente de benchmarking en transplantation hépatique. Cette série multicentrique sur 7492 transplantations hépatiques décrit un seuil référence pour les complications biliaires à un an (*benchmark cutoff*) de 28% [52]. Ces complications sont associées à une augmentation de la durée d'hospitalisation, du nombre traitements complémentaires et du coût, ainsi qu'une baisse de la qualité de vie.

3.2. Classification des complications chirurgicales

La gravité des complications postopératoires est hiérarchisée selon la classification Clavien-Dindo [53] (**Tableau I-1**), avec pour les grades I et II une morbidité mineure, pour les grades III et IV une morbidité sévère et la mortalité pour le grade V. Pour chaque patient, uniquement la complication la plus grave est prise en compte.

Grade	Définition
Grade I	Tout évènement post-opératoire indésirable ne nécessitant pas de traitement médical, chirurgical, endoscopique ou radiologique. Les seuls traitements autorisés sont les antiémétiques, antipyrétiques, antalgiques, diurétiques, électrolytes et la physiothérapie. Ce grade inclut également les infections mises à plat au lit du malade.
Grade II	Complication nécessitant un traitement médical n'étant pas autorisé dans le grade I. Les transfusions sanguines et la nutrition parentérale sont incluses.
Grade III	Complication nécessitant un traitement chirurgical, endoscopique ou radiologique.
IIIa	Intervention sans anesthésie générale
IIIb	Intervention sous anesthésie générale
Grade IV	Complication engageant le pronostic vital (incluant complications du SNC)* et nécessitant des soins intensifs
IVa	Défaillance d'un organe (dialyse incluse)
IVb	Défaillance multi-viscérale
Grade V	Décès du patient

*SNC : Système nerveux central, * Hormis les accidents ischémiques transitoires*

Tableau I-1 : Classification des complications chirurgicales selon Clavien-Dindo [53].

3.3. La fistule biliaire anastomotique

La prévalence de fistule biliaire après cholédococholédocostomie en transplantation hépatique dans la littérature varie de 5 à 10%, en sachant que la définition de la fistule biliaire n'était pas uniforme dans ces études [12,14–16]. Depuis 2010, une définition consensuelle a été développée par un groupe international d'experts (*international study group of liver surgery*) [54]. La fistule biliaire, en analogie à la fistule pancréatique est définie par une concentration de bilirubine dans le drain chirurgical supérieure à trois fois la concentration sérique après le troisième jour postopératoire ; ou, par la nécessité d'un geste radiologique ou d'une reprise chirurgicale pour un bilome ou une péritonite biliaire [54]. Le volume drainé n'est pas pris en compte dans la définition, puisque de l'ascite, une fistule pancréatique ou lymphatique peut créer un biais de confusion.

Le degré de sévérité de la fistule biliaire peut-être classé en 3 grades, de gravité clinique croissante :

- Grade A : La fistule ne nécessite pas de traitement particulier, elle est contrôlée par le drainage, n'entraînant pas ou peu de changements dans la prise en charge des patients.
- Grade B : La fistule biliaire entraîne une modification de la prise en charge standard, soit parce qu'elle persiste au-delà d'une semaine, soit parce qu'un geste interventionnel autre que chirurgical est nécessaire.
- Grade C : La fistule ne peut être contrôlée que par une réintervention chirurgicale.

Il y a trois modes de présentation d'une fistule biliaire : la présence de bile dans les lames de drainage, le bilome, ou la péritonite biliaire. Le traitement de première intention de la fistule biliaire anastomotique est la mise en place d'une prothèse biliaire couverte par voie endoscopique, percutanée ou en téléphérique [55]. La prothèse est laissée en place 6 à 12 mois. En cas de péritonite, ou de retentissement septique grave, une prise en charge chirurgicale en urgence est réalisée.

3.4. La sténose biliaire

La sténose biliaire est définie par un rétrécissement symptomatique de la voie biliaire. Une sténose est considérée comme précoce si elle survient dans les 6 premiers mois qui suivent la transplantation. Le diagnostic de sténose est suspecté devant toute augmentation du taux d'enzymes cholestatiques ou de bilirubine dans le sang et confirmé par cholangiographie ou

bili-IRM. La sténose biliaire peut être anastomotique (SBA) ou non anastomotique (SBNA). Les SBA sont courtes en longueur, isolées et localisées au niveau de l'anastomose. Les SBNA sont longues, intrahépatiques et généralement multiples. La vascularisation biliaire étant artérielle, les sténoses peuvent être secondaires à des complications artérielles hépatiques. En cas de sténose, un écho-doppler hépatique et/ou un angioscanner doivent être réalisés afin d'éliminer une complication sur l'artère hépatique à type de thrombose ou de sténose. En cas de suspicion de sténose biliaire sur perturbation du bilan hépatique, les autres causes de cholestase doivent être systématiquement exclues : l'infection virale ou le rejet par exemple.

3.5. Facteurs de risque prédictifs de complications biliaires en TH

De par leur fréquence et leur gravité, la FBA et la SBA sont les deux principales complications biliaires associées à la TH. Dans la littérature, plusieurs facteurs de risque de ces complications biliaires ont été identifiés. Les facteurs de risques sont résumés en **Annexe I-2**.

L'obésité avec une indice de masse corporelle supérieur à 30 kg/m² est un facteur de risque de fistule biliaire [56], les patients obèses étant en général plus difficiles à opérer, avec des durées opératoires allongées [57], et une morbidité postopératoire plus élevée [57–59].

La dénutrition préopératoire est également un facteur de risque clairement établi de morbidité postopératoire, entraînant notamment un retard de cicatrisation [60].

Un score de MELD >35 représente un facteur de risque significatif de complications biliaires [13,61]. Le score de MELD (*Model for End stage Liver Disease*) est un score pronostique d'hépatopathie. Cette relation pourrait se rapporter aux différences hémodynamiques dans le greffon. Les patients avec un score de MELD élevé présentent en général une hypertension portale élevée associée. Certains auteurs ont constaté, dans des cas où le débit portal était significativement augmenté, une réduction de la vascularisation artérielle hépatique [62,63]. Avec une vitesse d'écoulement du sang artériel inversement liée au débit sanguin portal. Il pourrait donc y avoir une ischémie relative des canaux biliaires responsable de complications. Une évaluation plus approfondie serait nécessaire pour documenter l'association possible entre la gravité de l'hypertension portale, et l'incidence des complications biliaires.

Un "sex mismatch", avec la combinaison donneur femme/receveur homme est un facteur de risque de sténose [14]. Ce facteur avait déjà été rapporté dans certaines études comme augmentant le risque de dysfonction primaire du greffon et de rejet chronique [64,65].

Un taux sérique de bilirubine élevé en préopératoire (<19,3 mg/dL) est un facteur de risque indépendant de complications biliaires post-transplantation [66]. Des études ont montré qu'une bilirubinémie préopératoire élevée était un facteur de risque de mortalité du patient et du greffon [67], ainsi qu'un facteur de risque de thrombose artérielle [68]. Cependant la corrélation entre le taux élevé de bilirubine et les complications post-opératoire n'est pas bien connue. Une bilirubinémie élevée est en rapport avec une mauvaise fonction hépatique, Qian fait l'hypothèse que l'hémostase après implantation est plus difficile à obtenir, avec des mobilisations plus importantes de greffon tirant sur le pédicule hépatique [66]. Néanmoins l'explication pourrait être différente, en effet une étude expérimentale a montré qu'un taux élevé de bilirubine non conjuguée pouvait diminuer la prolifération fibroblastique [69].

Une stéatose macrovacuolaire du greffon >25 % est associée à un risque plus élevé de complications biliaires [70]. La stéatose macrovacuolaire du greffon > 15-20% avait également été associée dans plusieurs études à la non-fonction primaire du greffon, à augmentation de la durée d'hospitalisation, ou à une augmentation des récurrences virales du VHC. L'accumulation de lipides dans le cytoplasme hépatocytaire est responsable d'une réduction de taille des espaces sinusoides de 50% par rapport à un foie normal, pouvant entraîner jusqu'à leur obstruction complète [71,72]. La stéatose diminue donc la microcirculation hépatique ce qui est responsable d'une moins bonne tolérance des lésions d'ischémie-reperfusion [73]. L'altération de la microcirculation au niveau sinusoidale pourrait également être responsable de lésions ischémiques de l'arbre biliaire permettant d'expliquer l'augmentation complications biliaires en cas de greffon stéatosique [70].

L'hospitalisation en réanimation en pré-transplantation est directement liée au risque de FBA par rapport aux patients à domicile [51]. En effet, la plupart du temps les patients hospitalisés en réanimation cumulent les facteurs de gravité, avec notamment une dénutrition importante et une dysfonction hépatique majorée. En cas d'hypertension portale, dans des cas où le débit portal est significativement augmenté, certains auteurs ont constaté une réduction de la vascularisation artérielle hépatique [41, 42]. Avec une vitesse d'écoulement du sang artériel inversement liée au débit sanguin portal, il pourrait donc y avoir une ischémie relative des canaux biliaires responsable de complications.

Le rejet chronique est fortement associé à un risque élevé de complications biliaires [74]. L'association entre le rejet chronique et les sténoses biliaires avait déjà été documentée chez les enfants [75] et chez les adultes [76]. Devant la normalisation des tests hépatiques après un traitement efficace de la sténose biliaire chez certains de ses patients, Verran évoque un

possible biais : la sténose biliaire pourrait entraîner une malabsorption de la cyclosporine, qui serait responsable ensuite du rejet chronique [74]. Néanmoins cette hypothèse ne se confirme pas systématiquement, et il n'existe aucune documentation dans la littérature sur cette causalité.

Les complications artérielles hépatiques (sténose/thrombose) sont un facteur de risque indépendant de complications biliaires [22,40,77]. Dans l'étude de Seo et al. [77], les sténoses biliaires associées aux complications artérielles hépatiques sont des sténoses anastomotiques dans 75% des cas et des sténoses non-anastomotiques pour le reste des cas. Ce résultat est différent d'autres études plus anciennes dans lesquelles les complications de l'artère hépatique entraînent plutôt le développement de sténoses non anastomotiques [78,79].

La fistule biliaire anastomotique est un facteur de risque indépendant de sténose anastomotique post-transplantation hépatique [13,14]. Outre le fait que les fistules biliaires, tout comme les sténoses anastomotiques sont souvent secondaires à une ischémie de la voie biliaire extra-hépatique, les fuites de bile provoquent une inflammation locale, augmentant le risque de fibrose et donc de sténoses biliaires [80,81,14].

L'âge du greffon > 50 ans représente un facteur de risque de sténose biliaire en analyse multivariée dans une seule étude [82]. Olthoff et al. du consortium A2ALL (*"The Adult-to-adult Living Donor Liver Transplantation Cohort Study"* représentant la première étude multicentrique Nord-Américaine) ont signalé un risque accru de perte du greffon pour un donneur âgé, mais sans résultats statistiquement significatifs [83]. La raison de l'incidence élevée des sténoses sur des greffons plus âgés n'est pas claire. Il est probable que la qualité tissulaire hilaire ou que la microcirculation sinusoidale soit en jeu.

Le diamètre de la voie biliaire < 5 mm est un facteur de risque de complications biliaires [84]. Certains auteurs, constatant que le risque de sténose est significativement moindre en cas d'hépatico-jéjunostomie (HJ) par rapport à une choledochochotomie, suggèrent la réalisation d'une HJ de façon systématique lorsque le diamètre du cholédoque est inférieur à 5 mm [39].

Une durée d'ischémie froide élevée est également un facteur de risque indépendant de sténose [84]. Cette affirmation reste à nuancer, puisque prouvée dans une étude sur transplantation hépatique donneur vivant. Plusieurs raisons à cela : les structures anastomosées en donneur vivant sont plus petites, et donc plus sensibles à la durée d'ischémie froide que les TH sur donneur décédé. De plus, les durées d'ischémie froide en donneur vivant approximent 500 à 600 min, allant jusqu'à plus de 900 min dans certains cas. L'influence de la durée

d'ischémie froide en tant que facteur de risque de sténoses biliaires est néanmoins bien connue en TH sur donneur décédé [76,85], et c'est pour cette raison que de nombreux centres essaient de garder une durée d'ischémie froide à moins de 600 minutes.

L'infection CMV serait pour certains un facteur de risque de sténose anastomotique tardive [40,51,86]. Ceci pourrait être lié à plusieurs facteurs. D'une part l'infection CMV prédispose aux thromboses artérielles du greffon et donc à l'ischémie biliaire [87]. D'autre part lors de toute infection CMV, des antigènes seraient présents dans les voies biliaires, et donc responsables d'une inflammation locale [88]. Une prophylaxie anti-CMV semble donc indispensable dans les premiers mois suivant la transplantation pour les patients à risque modéré ou élevé, c'est à dire les receveurs séropositifs ou les receveurs séronégatifs avec donneurs séropositifs.

4. LES MOYENS DE PREVENTION DES COMPLICATIONS BILIAIRES

4.1. Le drain biliaire externe ou « drain en T »

Historiquement, l'utilisation d'un drain biliaire externe (drain de Kehr ou « T-tube ») présentait plusieurs avantages théoriques : de pouvoir suivre qualitativement et quantitativement la production de bile, d'avoir un accès facile pour la cholangiographie, de réduire l'incidence des complications postopératoires anastomotiques en calibrant l'anastomose et de décompresser le cholédoque, dans lequel la pression est augmentée après transplantation [9]. Dans notre centre, nous utilisons un drain caoutchoutique, drain silicone en T avec la branche principale doublée d'un manchon de latex (Kehr Vankemmel - *Coloplast*) [89]. Techniquement, le drain était inséré après la réalisation de l'hémi suture postérieure, à travers le cholédoque du receveur avec la branche horizontale placée en transanastomotique (**Figure I-8 A**). Certaines équipes utilisent un trajet rétropéritonéal pour limiter le risque de fistule à l'ablation [90]. Le drain est extériorisé à travers la paroi abdominale au niveau de l'hypochondre droit, fixé à la peau et connecté à une poche de recueil. Dans la littérature, des résultats contradictoires concernant l'utilisation du drain en T sont apparus à partir des années 1990, rendant son utilisation est aujourd'hui controversée. (Comparaison des différentes études résumé en **Annexe I-3**). Un bon nombre de séries rétrospectives ne rapportent soit aucun avantage [74,91], soit une diminution du risque de sténose biliaire [17,92], soit une augmentation d'environ 15% du nombre de complications avec l'utilisation d'un drain en T, notamment une majoration des infections et des fuites biliaires après ablation du drain [11,93–

98]. Plusieurs essais contrôlés prospectifs randomisés ont été réalisés, ne permettant pas plus de trancher avec certitude. Certains confirment respectivement l'absence de bénéfices [67], ou l'augmentation du taux de complications avec l'utilisation du drain en T [99–101]. D'autres objectivent un taux de sténose biliaire significativement inférieur avec le drain en T [101–103]. Afin d'augmenter la puissance des études prospectives, deux méta-analyses ont récemment été réalisées. Sotiropoulos et al. [18], puis Rieddiger et al. [19] concluent que bien que le drain en T soit un facteur pronostique favorable pour les sténoses biliaires, son utilisation ne garantit pas moins d'interventions. De plus le drain en T est un facteur de risque de cholangite et de péritonite. Il n'y a donc pas de preuve claire en faveur de son utilisation routinière.

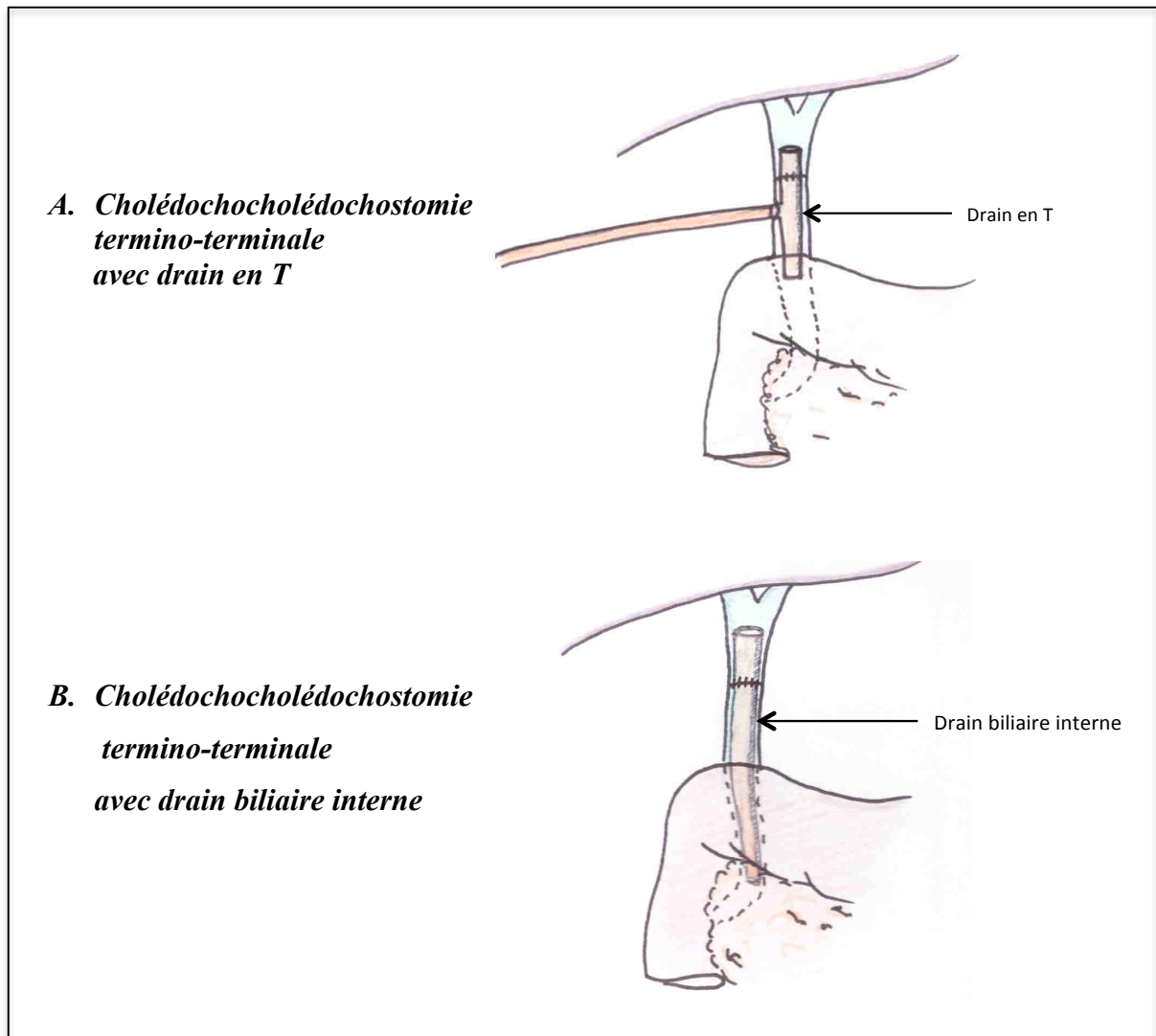


Figure I-8 : Différents types de reconstruction biliaire en TH avec drainage.

4.2. Le Drain biliaire interne

C'était donc pour pallier les faiblesses de la fistulisation biliaire externe du drain en T, que certaines équipes ont utilisé un drain biliaire interne - *Internal Biliary Stent (IBS)* (**Figure I-8 B**) pour la première fois un peu avant les années 2000 [104,105]. Il était initialement placé en transanastomotique pour faciliter la réalisation de la face antérieure de l'anastomose et en transpapillaire afin de décompresser la voie biliaire, sans velléité de calibrer l'anastomose en la chemisant [104]. S'il ne s'était pas évacué spontanément, le drain était ensuite retiré facilement par cathétérisme rétrograde endoscopique sans sphinctérotomie. Ce n'est que quelques années plus tard que l'équipe canadienne de Barkun [20] rapporte l'intérêt du IBS pour la prévention des complications biliaires. Avec un intérêt en particulier lorsque le diamètre des voies biliaires était de petite taille, ou lorsque l'anastomose était particulièrement à risque de complication [21]. Le IBS était alors implanté de façon à véritablement chemiser la paroi interne du cholédoque au niveau de l'anastomose, afin de servir de tuteur. C'est la technique que nous utilisons, et qui a deux avantages potentiels : assurer la perméabilité de l'anastomose biliaire pendant la cicatrisation et prévenir l'apparition de SBA à long terme [21]. Ces hypothèses sont étayées par le fait que l'implantation endoscopique de prothèses couvertes a fait ses preuves dans le traitement des complications biliaires et que leur utilisation pour la prévention est communément acceptée dans la communauté de la transplantation [81,106].

Dans la littérature, il n'y a encore que très peu de recul sur cette technique, avec seulement quelques séries comparatives de petits effectifs, qui évaluent ce dispositif (comparaison des différentes études **en Annexe I-4**). Les résultats sont discordants, parfois non significatifs, avec selon les études une augmentation ou une diminution des complications biliaires liées au IBS [23, 86–88]. Le manque d'uniformité concernant la méthodologie entre ces études comparatives explique probablement les résultats discordants. Les éléments principaux qui diffèrent sont : l'adaptation ou non du diamètre du drain à celui des voies biliaires, le shunt ou non de la papille et la date de l'ablation du drain. Dans notre série, l'utilisation du IBS permet de réduire significativement le taux de complications principales par rapport au groupe sans drain, avec 6% versus 18% de FBA ($p=0,036$) et 12% versus 33% de SBA ($p=0,02$) [22]. Un essai contrôlé randomisé multicentrique français est en cours afin de déterminer avec un fort niveau de preuve l'utilité de ce type de drainage.

L'objectif de l'implantation du IBS étant de prévenir les principales complications biliaires, nous pensons important d'adapter la taille du drain au diamètre des voies biliaires, de

façon à réellement chemiser l'anastomose pour limiter les FBA et calibrer l'anastomose pour prévenir les SBA. Il s'agit du même principe que pour le traitement endoscopique des complications biliaires, les prothèses mises en place pour être efficaces doivent mouler la paroi biliaire [77,108]. Concernant la mise en place du IBS, l'idéal est de le laisser au-dessus de la papille. Si le passage transpapillaire permet de décompresser la voie biliaire principale [109], la décompression des voies biliaires n'a jamais fait la preuve d'un intérêt dans la prévention des complications biliaires [110,111]. En revanche, le passage transpapillaire peut modifier la microflore endobiliaire ce qui pourrait prédisposer aux complications septiques à type de cholangite [112,113]. Lors de son implantation, le drain doit être multiperforé, puisqu'il a été décrit des cas d'obstacle biliaire secondaire à l'impaction de l'extrémité distale du IBS dans un diverticule cholédocien [51].

4.3. Drain en T versus IBS

Qu'en est-il de la comparaison entre le IBS et le drain en T ? Dans la littérature, à notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude comparative rétrospective publiée par Johnson en 2000 qui compare l'utilisation d'un IBS (n=66) avec un drain en T (n=18) [105] (**Annexe I-4**). Il y avait dans cette étude significativement moins de complications biliaires dans le groupe IBS par rapport au drain en T (18% versus 50%, $p=0.005$).

4.4. Autres moyens de prévention des complications biliaires anastomotiques

4.4.1. Le drain transcystique

À partir du moment où l'utilisation du drain en T a été remis en question à cause d'un plus grand nombre de complications biliaires, en particulier un taux de fistule biliaire à l'ablation élevé, certaines équipes ont opté pour la mise en place d'un drain transcystique [13,114,115]. Ce type de drainage décrit initialement par Escat en 1978 pour les calculs de la voie biliaire [116], est dans ce contexte de transplantation, placé en transanastomotique lors de la réalisation de la cholédococholédocostomie, extériorisé à la peau via le canal cystique du greffon (**Figure I-9**). À l'instar du drain en T, le drain transcystique permet de monitorer l'excrétion biliaire, d'avoir un accès facile à une cholangiographie, et de réduire les complications anastomotiques en réduisant la pression dans la voie biliaire principale. Dans les 2 seules études comparatives réalisées avec le drain en T, il n'y avait pas de différence significative en termes de taux de complications anastomotiques entre les 2 groupes [114,115]. En revanche il y avait moins de

complications biliaires globales, avec notamment moins de complications liées à l'ablation du dispositif. Ces études sont très limitées, puisque rétrospectives réalisées sur des très petits effectifs. De plus les techniques et les indications d'implantation sont variables ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Aucun essai comparatif contrôlé randomisé n'a été réalisé sur le sujet. L'utilisation du drain transcystique semble plutôt anecdotique en transplantation hépatique.

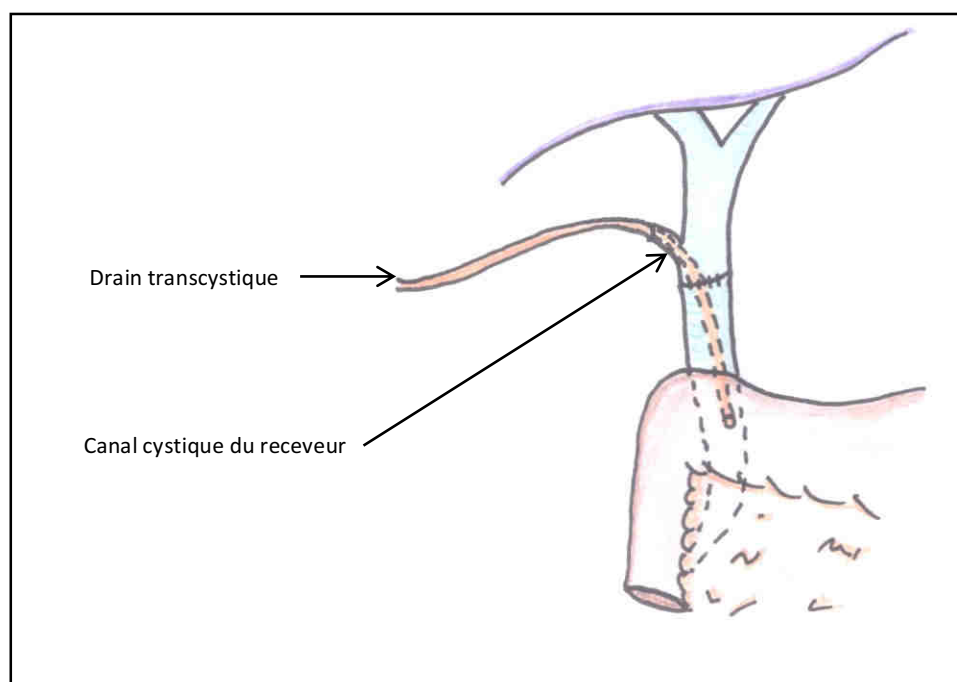


Figure I-9 : Anastomose cholédococholédocienne termino-terminale avec drain transcystique transanastomotique.

4.4.2. L'épiploplastie

L'épiploplastie ou patch omental consiste à réaliser une écharpe d'épiploon pédiculisé autour de l'anastomose biliaire. L'épiploon est un repli péritonéal qui relie la grande courbure gastrique au côlon transverse. On lui décrit ainsi deux parties, l'une supérieure, le ligament gastro-colique, l'autre inférieure, communément appelée tablier omental. C'est ce tablier graisseux qui recouvre normalement les intestins qui est utilisé pour l'épiploplastie, après section longitudinale, une partie d'épiploon peut être enroulée autour de l'anastomose biliaire. L'épiploon est une structure richement vascularisée, qui permet de cloisonner certaines infections intraabdominales. Son utilisation comme « patch » pour traiter certaines fistules digestives est largement utilisée, en premier lieu pour les fistules sur ulcère gastroduodéal perforé [117,118] ou les fistules après chirurgie bariatrique [119]. Pour la chirurgie

hépatobiliaire, cette technique a été initialement décrite après hépatectomie, en recouvrant la tranche de résection par de l'épiploon [120–122]. Si cette technique permet de réduire la gastroparésie pour les hépatectomies gauches [122] elle ne permet pas de réduire de façon significative le taux de fistules biliaires sur la tranche [120]. L'épiploplastie utilisée comme substitut tissulaire à une perte de substance de la voie biliaire semble être efficace, mais seulement décrit dans un *case report* ou chez l'animal [123,124]. En transplantation, son utilisation est très restreinte mais potentiellement prometteuse. L'équipe chinoise de Ye décrit une réduction du taux de fistule biliaire après épiploplastie sur 14 cas [125]. L'équipe de Montpellier en France l'utilise d'une façon un peu détournée cette technique, en effet ils réalisent une épiploplastie en interposition autour de l'artère pour réduire les complications artérielles secondaires aux complications biliaires [126].

4.4.3. Colle chirurgicale & procédés biliostatiques

Tous les produits d'étanchéités sont initialement des procédés hémostatiques, qui ensuite ont été transposés pour la biliostase. Ce sont des produits (colles liquides, éponges, compresses...) fabriqués soit à partir de dérivés plasmatiques humains ou animaliers (fibrinogène, thrombine), à partir de composés synthétiques (aldéhydes, cyanoacrylates ou PEG), ou d'origine végétale (alginate, cellulose, polysaccharides). La transposition de l'hémostase à la biliostase n'est pas forcément évidente, puisque ses produits interagissent avec les éléments sanguins pour former une étanchéité, alors que cette interaction n'est pas présente avec la bile. Néanmoins plusieurs auteurs semblent décrire une efficacité de ces produits d'étanchéité sur la biliostase [127–131]. Le premier essai prospectif randomisé sur le sujet à propos de 300 patients réalisé par Figueras et al., publié dans *Annals of Surgery* en 2007 conclut à l'absence d'utilité des produits d'étanchéité après hépatectomie [132]. Il y a aucune différence significative en termes de morbidité post opératoire par rapport au groupe contrôle. De Boer en 2012 dans une revue de la littérature ne recommande pas l'utilisation des colles en chirurgie hépatobiliaire, puisque même si leur efficacité d'hémostase peropératoire est prouvée, leur utilisation ne permet pas de réduire les complications biliaires ou même la morbidité postopératoire globale [133]. Dans un essai prospectif randomisé, Martin & Au confirment que l'application de colle ne permet pas de réduire l'incidence des complications anastomotiques biliaires après duodéno pancréatectomie [134]. Même si aucun essai de grande ampleur n'a été réalisé spécifiquement pour les complications biliaires après transplantation hépatique, l'utilisation de produits d'étanchéités ne semble pas justifiée.

CHAPITRE I : CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

B- Voies d'innovations de prévention des complications biliaires

1. CONCEPTION D'UN DISPOSITIF A PARTIR D'UNE STRUCTURE DE POLYMERE RESORBABLE

Afin de sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation, nous avons fait le choix de développer un IBS résorbable (RIBS). Pour être utilisable et efficace, ce RIBS doit être conçu à partir d'un matériau qui respecte une liste importante d'exigences, qui formeront un cahier des charges. Nous avons donc pris le parti de travailler avec des copolymères pour synthétiser le RIBS, ce qui permet de faire correspondre la structure du matériau aux différentes exigences. Nous avons travaillé sur des copolymères PLA-PEG (poly(lactide)-poly(éthylène glycol)). Les critères de choix de ces copolymères seront évoqués dans chapitre 2. Dans une moindre mesure, nous avons également travaillé sur des additifs radio-opaques à base de poly(caprolactone) (PCL). Dans cette section, après nous être intéressés aux notions de biomatériaux, nous décrirons les différents copolymères d'intérêts pour l'application.

1.1. Intérêt des biomatériaux dégradables synthétiques

La Société Européenne des Biomateriaux a défini en 1986 puis 1991, lors des conférences de Chester, un biomatériau comme « *un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle* ». De par sa définition, un biomatériau interagit avec les systèmes biologiques. Par contre, il ne doit pas induire d'effet adverse sur l'environnement biologique, on parle alors de matériau biocompatible. En revanche, un biomatériau ne doit pas être essentiellement inerte, l'enjeu est d'obtenir une bonne tolérance et une réponse adaptée de l'organisme vis à vis du dispositif médical, voire une réponse adaptée du biomatériau vis-à-vis de l'organisme. Dans ce dernier cas, on parle alors de bioactivité du biomatériau. Un dispositif médical constitué d'un

biomatériau ne doit donc pas être cytotoxique, immunogène, tératogène, mutagène, proinflammatoire, etc., tout en supportant les contraintes mécaniques, chimiques et biochimiques imposées par l'organisme. En effet, la réponse induite de l'organisme lors de l'implantation du biomatériau ne doit pas altérer les propriétés du biomatériau, et ce tout au long de sa présence dans l'organisme. Dans le cas d'un biomatériau dégradé, les produits de dégradation doivent également être biocompatibles. On désigne également la biofonctionnalité comme l'aptitude du biomatériau à remplir la fonction recherchée pour l'application.

Tout d'abord, il est nécessaire de faire un choix sur le type de biomatériau à utiliser selon l'application. On distingue différents biomatériaux selon leur nature : les céramiques, les métaux et alliages métalliques, les polymères d'origine naturelle et les polymères synthétiques dégradables ou biostables (permanents). Dans le cas du développement d'une prothèse biliaire pour prévenir les complications anastomotiques, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de polymères synthétiques dégradables. En effet, depuis les années 1960, leur utilisation dans le domaine de la santé s'est largement popularisée puisqu'ils permettent la conception de prothèses à usage temporaire et notamment de supports de régénération pour l'ingénierie tissulaire [135].

Les polymères synthétiques dégradables se dégradent par voie hydrolytique, enzymatique, ou mécanique (érosion). Parmi les polymères synthétiques dégradables, on trouve les polymères synthétiques biorésorbables dont les produits de dégradation sont connus pour être éliminés par métabolisation ou par filtration rénale. Parmi eux, la classe la plus notable est celle des polyesters aliphatiques (composés organiques non-cycliques), tels que les poly(glycolides) (PGA), PLA, et dans une moindre mesure la PCL. Leur intérêt majeur réside dans la variété de propriétés que l'on peut obtenir en modulant la structure, la masse molaire et la cristallinité du polymère. De plus, ils possèdent une bonne biocompatibilité. Ils sont approuvés par les agences de santé telle la FDA (Food and Drug Administration) ou l'EMA (European Medicines Agency).

Il existe de très nombreux polymères biodégradables polyesters ou non-polyesters. Dans le cadre de notre étude, nous ne présenterons que les principaux polyesters aliphatiques présentant un intérêt pour l'application. Pour une revue plus exhaustive des différents polymères dégradables utilisés en tant que biomatériaux, le lecteur peut consulter les références suivantes : Nair et Laurencin 2007 [136], Chen et al. 2013 [137].

1.2. PLA et PCL, polyesters aliphatiques d'intérêts pour l'application

Le PLA et la PCL sont des polyesters aliphatiques linéaires de la famille des thermoplastiques, considérés comme biodégradables et compostables. Ce sont des polymères hydrophobes dont les propriétés varient en fonction de leur structure et de leur masse molaire. Autorisé par la FDA et l'Union Européenne pour les emballages alimentaires et pour leur utilisation comme implant ou comme système de libération contrôlée de principes actifs, le PLA et la PCL figurent parmi les polyesters aliphatiques les plus utilisés dans le domaine biomédical.

1.2.1. Synthèse

Ces polymères peuvent être obtenus par polycondensation ou par polymérisation par ouverture de cycle (POC) [138]. La polycondensation ne permet cependant d'obtenir que des masses molaires relativement faibles. On préfèrera donc la POC puisque cette méthode permet l'obtention de chaînes de PLA ou de PCL de masses molaires élevées et de dispersité faible.

Dans le cas du PLA, il est intéressant de noter la possibilité de faire varier la stéréochimie du polymère grâce à la stéréochimie des monomères utilisés. On distingue trois stéréoisomères du lactide (**Figure I-10**) de par la présence de deux atomes de carbone asymétriques : le L-lactide, le D-lactide et le méso-lactide qui correspondent respectivement aux conformations (S,S), (R,R) et (R,S). Il existe également le D,L-lactide qui correspond à un mélange racémique de L-lactide et de D-lactide. En fonction des stéréoisomères de lactide utilisés lors de la POC, la structure des chaînes de PLA varie. La nomenclature veut que l'on note PLA_x un PLA contenant x pourcent de motif L-lactide [135]. Par exemple, un PLA₅₀ est composé de 50% de motifs L-lactide et 50% de motifs D-lactide. Les motifs D- et L-lactide sont répartis de manière aléatoire au sein des chaînes de PLA₅₀, il s'agit d'un polymère atactique et amorphe. En revanche, le PLA₁₀₀ est composé de 100% de motif L-lactide. Les motifs sont répartis de manière ordonnée ce qui rend le polymère essentiellement isotactique et semi-cristallin. La composition en stéréoisomères au sein des chaînes de PLA entraîne donc des variations des propriétés du polymère. En fonction des masses molaires des chaînes de PLA et de leur cristallinité, donc de leur composition en motifs D et L-lactide, il est possible de moduler les propriétés mécaniques, thermiques et le temps de dégradation du polymère.

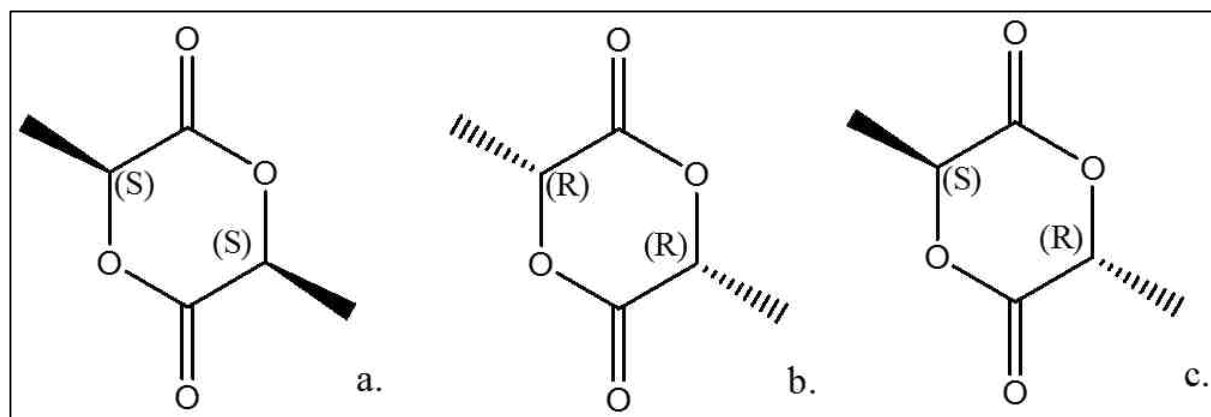


Figure I-10 : Stéréoisomères du lactide. a. L-lactide b. D-lactide c. méso-lactide.

Cette possibilité de varier la stéréochimie des unités constitutives de la chaîne n'est pas possible dans le cas de la PCL, mais des approches simples de modifications chimiques post-polymérisation permettent de facilement moduler ses propriétés. En particulier, dans le cadre de ce mémoire on s'intéressera à la modification chimique de la PCL par une méthode combinant activation anionique et substitution nucléophile développée au sein du Département des Biopolymères Artificiels de l'IBMM pour générer des familles de PCL fonctionnelles [139].

1.2.2. Propriétés mécaniques et thermiques

Les propriétés mécaniques et thermiques du PLA et de la PCL (**Tableau I-2**), sont fortement liées aux différents paramètres macromoléculaires.

Dans le cas du PLA, ces propriétés sont essentiellement dépendantes de la crystallinité du polymère et par conséquent de sa masse molaire et de sa stéréochimie. Le PLA est en effet un polymère dont la cristallinité varie très fortement en fonction de sa teneur en motifs stéréoisomères : le PLA₁₀₀ est par exemple semi-cristallin tandis qu'à partir d'environ 12 % de motifs D-LA, on estime que le PLA est totalement amorphe. L'augmentation de la cristallinité du PLA va se traduire mécaniquement par une augmentation du module d'Young, de la limite d'élasticité et de la contrainte de rupture (E , σ_y et σ_r), mais aussi par une diminution des déformations élastique et de rupture (ϵ_y et ϵ_r) [140]. Les propriétés thermiques varient avec l'introduction de motif D-lactique au sein de la composition. Par exemple, la température de transition vitreuse (T_g) est comprise entre 54°C et 65°C pour un PLA₁₀₀. La T_g tend à diminuer avec la baisse de cristallinité. La température de fusion (T_f) du PLA₁₀₀ est aux alentours de 159-

181°C. Cette dernière diminue avec l'introduction de motif D-lactique dans la structure jusqu'à devenir absente lorsque le polymère devient amorphe [141,142]. Pour rappel T_g et T_f sont des températures frontières existant pour la plupart des polymères, marquant une frontière entre deux états caractéristiques. La T_g est la température au-delà de laquelle la mobilité des chaînes au sein des zones amorphes est accrue. Lorsque les polymères sont semi-cristallins, il existe également une T_f correspondant à la disparition des structures cristallines.

Le deuxième facteur influant les propriétés de ces polymères est la masse molaire, elle aura sur les propriétés mécaniques des conséquences similaires à celles d'une cristallisation importante, c'est-à-dire une augmentation de E , σ_y et σ_r et une diminution de ε_y et ε_r [140–142].

Dans le cas de la PCL (**Tableau I-2**), l'absence de carbone asymétrique ne permet pas de jouer sur la stéréorégularité de la chaîne macromoléculaire, mais sa forte cristallinité est un paramètre clé, avec la masse molaire, pour expliquer les propriétés du polymère. La PCL est un polymère semi-cristallin dont la cristallinité diminue avec l'augmentation de masse molaire (taux de cristallinité de 80 % avec une masse molaire 5 000 g/mol et de 45 % pour 60 000 g/mol) [142]. La PCL est globalement plus souple que le PLA et peut donc s'avérer plus intéressante pour des applications nécessitant une certaine élasticité. La PCL est par ailleurs plus hydrophobe et plus cristalline que le PLA, ce qui lui confère une dégradation plus lente.

Polymères		Propriétés mécaniques			Propriétés thermiques		Temps de dégradation total
		E (MPa)	σ_r (MPa)	ε_r (%)	T_g (°C)	T_f (°C)	
PLA	PLA ₁₀₀	3 600	58	2,1	54 à 65	159 à 181	1,5 à 5 ans (PLA ₁₀₀)
	PLA ₇₅	3 300	46	3,2		x	
	PLA _{62,5}	2 800	41	2,9	50 à 60	x	1 à 2 ans (D,L-PLA)
	PLA ₅₀	3 200	48	8,7		x	
PCL	PCL (44 000 g/mol)	400	16	80	-62 à -60	57 à 64	2 à 4 ans
	PCL (200 000 g/mol)	549	20	576			

Tableau I-2 : Propriétés thermiques et mécaniques du PLA et de la PCL [138,141–144].

1.2.3. Propriétés de dégradation

Les termes dégradation et résorption sont, la plupart du temps, utilisés sans distinction dans la littérature. Nous définirons plus précisément la dégradation comme le processus de scission des chaînes polymériques, se décomposant ainsi en oligomères et monomères, conduisant au final à une diminution de la masse molaire du matériau. La dégradation entraîne l'érosion qui est la perte de matière par le matériau.

Pour le PLA, la dégradation est essentiellement hydrolytique mais aussi, dans une bien moindre mesure, enzymatique [145]. Pour la PCL, la dégradation *in vivo* est uniquement hydrolytique. La dégradation hydrolytique s'effectue par hydrolyse des liaisons esters. Pour le PLA et la PCL, elle conduit à la formation respective d'acide lactique et d'acide 6-hydroxyhexanoïque qui ont l'avantage d'être des métabolites, c'est-à-dire des produits naturellement présents dans l'organisme, ce qui assure leur excellente biocompatibilité. L'hydrolyse du PLA peut conduire à la libération d'acide L-lactique, constituant du cycle de l'acide citrique, et d'acide D-lactique éliminable par filtration rénale.

Lorsqu'un polymère est immergé en milieu aqueux, ou implanté *in vivo*, l'eau pénètre dans le réseau des chaînes de polymère, entraînant une absorption d'eau du matériau puis une hydrolyse des liaisons esters. Pour le PLA, l'hydrolyse des liaisons esters entraîne une augmentation du nombre de fonctions acide carboxylique en bout de chaînes. Ces fonctions acides peuvent catalyser l'activité hydrolytique lorsqu'elles sont retenues au sein du matériau, et on peut observer un phénomène d'autocatalyse interne en fonction de l'épaisseur de l'objet [146]. Plus le matériau contient des oligomères, plus le phénomène d'autocatalyse sera accentué et la cinétique de dégradation sera accélérée [147]. Au cours du processus de dégradation du PLA, la coupure des chaînes se traduit par la libération et la diffusion d'oligomères d'acide lactique à travers la surface de l'objet. Les oligomères sont solubles dans le milieu physiologique entraînant une diminution du pH de la solution d'immersion et une diminution des masses molaires moyennes des chaînes de PLA.

La dégradation altère les propriétés mécaniques du matériau et l'on observe également une perte de masse [148]. Cependant, la dégradation d'un matériau est dépendante de sa mise en forme. La cinétique de dégradation d'un matériau de PLA est hétérogène avec une dégradation plus rapide en son centre qu'à la surface du matériau lorsqu'un phénomène d'autocatalyse se produit. La dégradation est donc plus rapide pour un objet massif que pour

des objets plus petits. En effet, un objet massif va retenir les produits d'hydrolyse en son centre, avec le phénomène d'autocatalyse au cœur du matériau [146,149,150].

La cinétique de dégradation est également dépendante de la structure des chaînes. Un matériau amorphe se dégrade plus rapidement qu'un matériau cristallin [149]. En effet, le volume libre disponible pour accueillir des molécules d'eau au sein des zones amorphes est plus important que dans les zones cristallines. Plus la température de transition vitreuse est basse, plus la mobilité des chaînes est importante. Ainsi l'eau y pénètre plus facilement et l'hydrolyse est donc facilitée. Par ailleurs, l'augmentation de la cristallinité s'accompagne d'une augmentation de l'hydrophobie [151].

La dégradation d'un polymère est également dépendante de la masse moléculaire des macromolécules, et du traitement qu'il subit, qu'il soit traité par rayonnement pour être stérilisé (*cf. chapitre 5 §1.11.3.*), ou bien thermique pour permettre sa mise en forme.

Plusieurs techniques de mise en forme des polymères (procédé d'injection/extrusion) incluent une étape de fusion/écoulement du matériau. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la dégradation thermique du PLA pendant cette étape. Les chaînes peuvent se dégrader par des réactions de transestérifications intramoléculaires entraînant la formation d'oligomères cycliques d'acide lactique et de lactide, suivie d'une recombinaison des oligomères cycliques avec les chaînes linéaires à travers une réaction d'insertion [152]. Des réactions de transestérifications intermoléculaires peuvent également avoir lieu entre deux fonctions esters pendant le processus de fusion, mais l'hypothèse de transestérifications intermoléculaires est moins évidente. On distingue également la dégradation des chaînes par scission aléatoire des chaînes. En fonction de la teneur en eau du matériau, il peut également se produire une hydrolyse des chaînes par clivage des liaisons esters. Enfin, la décomposition pyrolytique peut intervenir ainsi qu'une dégradation radicalaire à température élevée [152]. L'ensemble de ces mécanismes de coupures de chaînes peut être à l'origine d'une diminution des masses molaires du matériau. En fonction de la température de mise en forme et de la vitesse de refroidissement, le taux de cristallinité d'un polymère semi-cristallin peut également varier. Une modification de la cristallinité entraîne inévitablement des modifications dans les propriétés mécaniques du matériau. L'**Annexe I-5** présente toutes les techniques de mise en forme que nous avons testé au cours de la thèse.

Concernant la dégradation enzymatique, la protéinase K (*Tritirachium album*) fut l'une des premières enzymes permettant une dégradation enzymatique des chaînes de PLA, notamment dans les zones amorphes riches en unités L-lactique. Depuis, de nombreux groupes

utilisent la protéinase K pour comprendre les mécanismes de dégradation du PLA *in vitro* [153]. Les protéases alcalines s'avèrent également avoir une activité enzymatique envers les chaînes de PLA [154]. En ce qui concerne notre application, il n'y a pas de protéases dans la bile, capables de dégrader les polyesters aliphatiques (*cf. composition de la bile §2.4.2*).

1.3. Le PEG, polyéther d'intérêt pour l'application

1.3.1. Synthèse du PEG

Le poly(éthylène glycol) (PEG) appartient à la famille des polyéthers, largement utilisés en santé, du fait de leur biocompatibilité et de leurs propriétés hydrophiles. Le PEG est un polyéther linéaire non dégradabile de masse molaire variable. Le PEG n'est pas dégradabile mais bioéliminable par filtration rénale lorsque sa masse molaire n'excède pas 20 000 g/mol. On distingue le poly(éthylène glycol) (PEG) de masse molaire inférieur à 20 000 g/mol obtenu par polycondensation de l'éthylène glycol, et le poly (oxide d'éthylène) (PEO) de masse molaire supérieure à 20 000 g/mol, obtenu par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène.

1.3.2. Propriétés du PEG

Le PEG est biocompatible avec une faible toxicité. Autorisé par la FDA, le PEG est utilisé dans de nombreuses applications comme système de délivrance de principes actifs [155], en ingénierie tissulaire [156], pour la cicatrisation tissulaire [157] et comme barrière anti-adhérentielle [158]. Il est également omniprésent en formulation pharmaceutique et cosmétologique comme viscosifiant ou cosolvant [159,160]. La capacité d'absorption d'eau du PEG est remarquable, et celle-ci varie en fonction de la masse molaire. Cependant, les hydrogels de PEG purs sont peu utilisés puisqu'ils n'ont que peu de propriétés mécaniques, ils se solubilisent rapidement en milieu aqueux et sont éliminés rapidement par l'organisme.

Pour moduler les propriétés mécaniques et augmenter son temps de résidence dans l'organisme, le PEG est souvent utilisé dans des réactions de polymérisation avec différents polyesters hydrophobes afin de former des copolymères amphiphiles, par exemple des triblocs de poly(lactide)-*b*-poly(éthylène glycol)-*b*-poly(lactide) (PLA-*b*-PEG-*b*-PLA) [161].

La présence de PEG apporte également des propriétés anti-adhérentielles au matériau avec une réduction de l'adhésion cellulaire de par son caractère hydrophile et la grande mobilité des chaînes de PEG hydratées exposées en surface [162].

1.4. Synthèse de copolymères triblocs de PLA-PEG-PLA

La synthèse d'une famille de copolymères triblocs de PLA-*b*-PEG-*b*-PLA par polymérisation par ouverture de cycle (POC) (**Figure I-11**) permet de combiner les propriétés du PLA (dégradabilité, propriétés mécaniques, hydrophobie) et du PEG (résorbabilité, souplesse, hydrophilie). La POC permet d'obtenir un copolymère amphiphile. La variation en composition en unités EG (hydrophiles) et unités LA (hydrophobes) au sein du copolymère permet de contrôler les propriétés de mécaniques du copolymère ainsi que son temps de résorption. La forte hydrophilie du polyéthylène glycol permet de favoriser la diffusion de l'eau au sein du polymère et donc permet d'accélérer la dégradation.

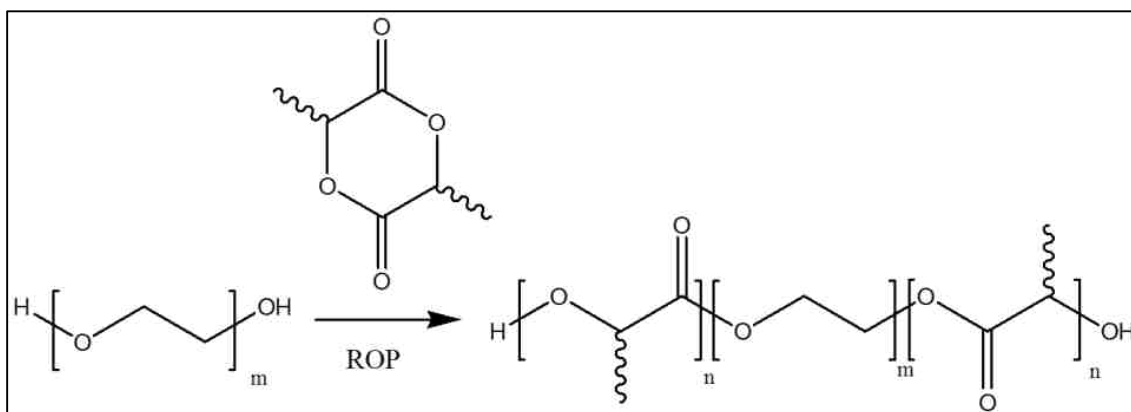


Figure I-11 : Schéma réactionnel de la synthèse de copolymères triblocs PLA-*b*-PEG-*b*-PLA

Ce type de copolymère a été très largement étudié dans le cadre d'applications biomédicales dans des domaines aussi divers que la délivrance de principes actifs ou l'ingénierie tissulaire. Au sein du Département des Biopolymères Artificiels de l'IBMM, ces structures polyester-polyether ont en particulier été utilisées pour la conception d'hydrogels pour libération d'actifs (faibles masses molaires, balance fortement hydrophile, technologie Bepot® de MedinCell), la conception de patches ligamentaires (fortes masses molaires, balance fortement hydrophobe [163–165]) ou encore la conception de barrière antiadhérentielles (fortes masses molaires, balance fortement hydrophile, technologie développée par la start-up Womed). Les lecteurs peuvent également se référer à des articles de revues récents concernant les copolymères PLA-PEG pour applications en libération d'actifs [166–168], ou les applications en ingénierie tissulaire [169,170]

2. VOIES DE RECHERCHES DANS LA PREVENTION DES COMPLICATIONS BILIAIRES

2.1. Utilisation de prothèses biliaires biodégradables dans la littérature

L'utilisation de prothèses ou de stents est devenue incontournable en pratique clinique. L'ablation des prothèses posant parfois des difficultés, des prothèses biodégradables ont été développées depuis quelques années pour de nombreuses spécialités [171], avec pour certaines applications (vasculaires) des implantations chez l'homme [172], traduisant l'innocuité de ces dispositifs.

Pour le système biliaire, plusieurs études ont été menées ces dernières décennies, le **Tableau I-3** présente les principaux résultats comparatifs. Deux types de recherches sont à différencier, soit le développement d'un stent auto-expansible (AE), placé par voie percutanée ou endoscopique, dont l'objectif est de traiter une fistule ou une sténose biliaire bénigne, soit le développement d'un stent tubulaire, inséré chirurgicalement lors de la réalisation d'une anastomose, dont le but est de prévenir les complications anastomotiques. Les recherches concernant les stents auto-expansibles sont un peu plus avancées que le tube chirurgical « préventif », avec notamment des premiers essais chez l'homme. Le stent est obligatoirement mis en œuvre sous forme de mailles, qui peuvent être couvertes par un second revêtement imperméable.

Dès 2003, Ginsberg a testé *in vivo* chez le porc la mise en place par voie endoscopique d'un stent auto-expansible en PLA₉₆, avec une bonne faisabilité et une bonne tolérance de la prothèse [173]. Plusieurs auteurs ont testé la dégradation *in vivo* chez l'animal de dispositifs en PLA. Laukkarinen décrit en 2007 l'utilisation d'un stent biliaire biodégradable auto-expansible radio-opaque en PLA₉₆-Sulfate de baryum (BaSO₄), dans un modèle de fuite biliaire chez le cochon [174]. Sur le même principe Yamamoto en 2011 test des stents en PLA₁₀₀ chez le chien [175]. Le PLA sous cette forme est très cristallin, avec comme inconvénient une durée de dégradation plutôt longue (>10 mois), avec difficulté pour les cellules de coloniser le matériau. En effet sur les études histologiques, il n'y avait pas à 10 mois d'endothélialisation ni intégration du stent [173,176]. L'autre inconvénient du PLA, en particulier les PLA semi-cristallins, est que les propriétés mécaniques sont inadaptées, avec une raideur trop importante. Dans ces cas-là, on peut incorporer dans le polymère d'autres composants (Ploxamer, PEG) afin d'améliorer les propriétés visco-élastiques du stent [148,177], avec également un impact sur la durée de dégradation. D'autres équipes ont préféré l'utilisation de la polydioxanone (PDS) pour l'implantation des stents dans les voies biliaires [178–182]. C'est d'ailleurs avec ce

polymère que les premiers essais dans les voies biliaires chez l'homme ont été réalisés pour traiter des sténoses bénignes, en sachant que ce type de stent avait déjà été utilisé chez l'homme dans le colon, l'œsophage ou la trachée [183–185]. Petrtyl en 2010, Mauri en 2013 puis Jones en 2014 décrivent leur expérience de mise en place par voie percutanée d'une prothèse auto-expansible en PDS à propos de quelques cas [179,180,182]. L'équipe de Siiki publie ensuite en 2015 la première implantation endoscopique du même type de stent [181]. Toutes ces études chez l'homme ont permis de confirmer la faisabilité avec une implantation optimale, sans complications au décours, et sans besoin de nouveaux traitements invasifs dans les mois suivants l'implantation. La durée de dégradation du PDS est très rapide, comme constaté dans l'étude de Grolich, qui a implanté des stent auto-expansibles en PDS chez le porc, avec une dégradation complète en moins de 13 semaines [178]. De plus la PDS perd rapidement ses propriétés mécaniques au cours de la dégradation [186,187]. Le monofilament perd 50% de la force rupture à 4 semaines [143]. L'équipe de Zheng en 2013 développe un stent métallique résorbable, un alliage Magnésium-Zinc (Mg-6Zn). La dégradation a été testée *in vivo* chez le lapin après implantation par voie transpapillaire après laparotomie et duodénotomie [188]. Il n'y avait pas de complications liées à l'implantation lors des 3 semaines de suivi. À trois semaines, une partie des dispositifs n'était plus visualisée traduisant la résorption ou la migration des stents. L'avantage de ces dispositifs métalliques est la visualisation radiologique spontanée. La visualisation des dispositifs par les moyens d'imagerie conventionnels, en particulier par les rayons X, est essentielle pour le suivi après implantation. Les polymères synthétiques sont radio-transparents, plusieurs solutions sont proposées. Première possibilité, l'ajout d'un marqueur biocompatible radio-opaque sur le stent [175,180,181]. Ces marqueurs généralement métalliques, en or ou en platine, permettent uniquement de visualiser la position du stent et non le stent lui-même, sans information sur la dégradation en cours. Le risque est que les marqueurs se détachent du dispositif au cours de la dégradation. La deuxième possibilité est d'ajouter des composés radio-opaques lors de la synthèse des polymères, tels que des poudres de sels métalliques, comme rapporté par Ginsberg, Xu et Laukkarinen dans leurs études avec le mélange respectif de PLA₉₆-BaSO₄ (20 wt%), PLGA-BaSO₄ (20 wt%) et PLA₉₆-BaSO₄ (25 wt%) [173,177,189]. Là encore, l'addition de ces sels peut entraîner des modifications des propriétés de dégradation et mécaniques des polymères, avec également des risques de migration des additifs pouvant conduire à une perte de fonctionnalité (visibilité dans ce cas). Afin de contourner le problème de la toxicité liée aux additifs métalliques [190], des radio-opacifiants organiques de faible masse molaire contenant des atomes de brome ou d'iode ont été développés. On peut à ce titre citer le dérivé d'acide S-2-hydroxy-3-(4-

iodobenzoyloxy)propanoïque développé par Wang et al. pour jouer le rôle de plastifiant radiopaque de matrices PLA [191]. Dans le même esprit, mais pour en plus éliminer tout risque de migration nous avons décrit et évalué en 2015 la synthèse de poly(ϵ -caprolactone-co- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone)s (PCL-TIB) comme agent de contraste additif à un polymère [192] (**Annexe I-6**).

Plusieurs équipes ont également développé des prothèses biliaires résorbables, implantées lors de la réalisation de l'anastomose, afin de prévenir les complications anastomotiques. Meng en 2006 évalue *in vivo* chez le chien la dégradation d'un stent hélicoïdal en PLA₁₀₀ après anastomose cholédoco-cholédocienne termino-terminale [176]. De la même manière Montalvo-Javé en 2015, évalue chez le cochon un tube de collagène recouvert d'une couche de PCL afin d'assurer l'étanchéité et prévenir également le risque de fistule anastomotique [193]. Laukkarinen en 2010 ou Fan en 2011 étudient la dégradation *in vivo* chez le chien de stents en PLA₉₆-BaSO₄ ou PLA₁₀₀-PLGA respectivement après la réalisation d'une anastomose hépaticojéjunale.

Toutes les études permettant de tester *in vivo* la dégradation d'une prothèse dans les voies biliaires ont été réalisées sur le gros animal (lapin, chien ou cochon). Toutes ont démontré une bonne biocompatibilité et l'absence d'obstruction du stent par de la boue biliaire [174,175,178,188,193–197], il n'y avait pas sur les analyses biologiques régulières d'ictère ou de cholestase. Dans la plupart des études, aucune fistule anastomotique n'est décrite [193,198–200]. Aucune sténose anastomotique n'est décrite non plus, en sachant que les durées de suivis sont souvent trop courtes pour révéler des sténoses. Le principal biais est le petit effectif de cas dans chaque étude. Quelques équipes ont réalisé des études comparatives, en réalisant une anastomose avec ou sans stent, dont l'équipe de Xu dans une étude en 2008 portant sur 160 voies biliaires de rat [199,201]. Dans ces études comparatives, il n'y avait pas de différence significative quant au nombre de complications anastomotiques. Xu décrit dans son étude la séquence de dégradation du tube PLGA (*LA/GA 71/29*) dans la voie biliaire [201]. Les prothèses étaient correctement déployées dans les voies biliaires les 2 premières semaines postopératoires. Elles commencent à se déformer à partir de la 3^e semaine, mais permettent un drainage optimal de la bile. Au début de la 4^e semaine, la prothèse commence à se fragmenter. Les fragments s'étant progressivement évacués, la prothèse a complètement disparue après la 5^e semaine. Cette évolution par fragmentation survient alors que l'épithélialisation de la prothèse n'a pu se faire, soit en raison d'une résorption trop rapide du polymère, soit en raison d'un matériau trop cristallin ne favorisant pas la colonisation tissulaire.

Etude	Polymère	Type de stent	Sujet	N	Histo	Radio	Dégrad. (mois)	Suivi (mois)	Voie d'abord Type d'insertion
Ginsberg 2003 [173]	PLA ₉₆ -BaSO ₄	AE	Chien	8	-	0	10-12	12	Endoscopie <i>Cathétérisme rétrograde</i>
Meng 2006 [176]	PLA ₁₀₀	Hélicoïdal	Chien <i>+in vitro</i>	3	O	-	> 3	3	Laparotomie <i>Anast. Cholédocochocholédocienne</i>
Laukkarinen 2007 [174]	PLA ₉₆ -BaSO ₄	AE	Chien	50*	O	O	1,5	18	Laparotomie <i>Anast. Hépaticojejunale</i>
Laukkarinen 2007 [189]	PLA ₉₆ -BaSO ₄	AE	Cochon	12*	O	O	3-6	6	Endoscopie <i>Cathétérisme rétrograde</i>
Xu 2008 [177]	PLGA	Tube	Rat <i>+in vitro</i>	160*	-	-	1	2	Laparotomie <i>Anast. Cholédocochocholédocienne</i>
Tashiro 2009 [198]	PLA ₁₀₀ -PCL	Tube	Cochon	3	O	-	3-6	6	Laparotomie <i>Anast. Cholédocochocholédocienne</i>
Xu 2009 [201]	PLGA-BaSO ₄	Tube	Chien <i>+in vitro</i>	6	O	O	1	2	Laparotomie <i>Insertion longitudinale</i>
Xu 2010 [202]	PLA	Tube	Chien	9	-	-	> 3	3	Laparotomie <i>Insertion longitudinale</i>
Laukkarinen 2010 [203]	PLA ₉₆ -BaSO ₄	AE	Cochon	9	O	O	1,5-3	6	Laparotomie <i>Anast. Hépaticojejunale</i>
Fan 2011 [204]	PLA ₁₀₀ -PLGA	Tube	Chien	?	O		> 3	3	Laparotomie <i>Anast. Hépaticojejunale</i>
Yamamoto 2011 [175]	PLA ₁₀₀ <i>+platine**</i>	AE	Chien	12	-	0	>9	9	Laparotomie/duodénotomie <i>Cathétérisme rétrograde</i>
Mauri 2013 [180]	PDS <i>+platine**</i>	AE	Humain	10	-	O	3-6	16	Percutané <i>Sténose postchirurgicale</i>
Chen 2013 [137]	Mg-6Zn	Tube	Lapin	12	-	O	> 1	1	Laparotomie/duodénotomie <i>Cathétérisme rétrograde</i>
Siiki 2015 [181]	PDS <i>+or**</i>	AE	Humain	1	-	O	3-6	6	Endoscopie <i>Cathétérisme rétrograde</i>
Montalvo-Javé 2015 [193]	Collagène+PCL	Tube	Cochon	15	O	-	> 6	6	Laparotomie <i>Anast. Cholédocochocholédocienne</i>
Grolich 2015 [198]	PDS	SE	Cochon	23	O	-	2-3	5	Endoscopie <i>Cathétérisme rétrograde</i>

*AE : Auto-expensible, * étude comparative versus témoin, **radio marqueur.*

Tableau I-3 : Comparatif des études évaluant la dégradation de prothèses biliaires résorbables

L'équipe de Tashiro et al. [195] en 2009, a été la première à s'intéresser à l'utilisation de ces dispositifs biodégradables pour la transplantation hépatique. Ils ont évalué la résorption et la biocompatibilité avec succès d'une prothèse biliaire en copolymère PGA-PCL sur un modèle de transplantation chez le porc : pas de fistule biliaire sur les 7 expériences, ni de cholestase obstructive. La prothèse était absorbée totalement en six mois. L'analyse histologique de la voie biliaire à l'endroit de l'absorption de la prothèse retrouve une fibrose minimale, avec une réponse inflammatoire négligeable.

Xu et al. ont étudié la dégradation d'un stent biodégradable PLGA-BaSO₄ en comparaison *in vitro* dans de la bile et *in vivo* dans 2 études successives, chez le rat en 2008 et chez le chien en 2009 [194,201]. Selon les auteurs, la période de fonctionnement et la durée de dégradation du stent répondaient aux exigences concernant la durée de réparation et de reconstruction de la voie biliaire. La durée de dégradation complète du PLGA était de l'ordre de 4-5 semaines. Cette durée de dégradation nous paraît trop faible pour sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation hépatique, puisque les fistules peuvent apparaître dans les 4 premières semaines, et les sténoses à partir des premiers mois suivant la transplantation. Lorsque l'on compare la dégradation *in vitro* à la dégradation *in vivo*, on constate que la durée de dégradation est jusqu'à 1/3 plus rapide *in vivo* que *in vitro*. En effet, même si les modèles *in vitro* reproduisent au maximum les conditions du vivant, ils ne prennent pas en compte certains phénomènes qui influent sur la dégradation, en particulier les phénomènes d'oxydation des radicaux libres produits par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, ainsi que la dégradation par effet mécanique (boulottement, grattage...).

Sur toutes les études répertoriées (**Tableau I-3**), celle de Xu et al. de 2008 est la seule à étudier le comportement mécanique du stent PLGA au cours de la dégradation [201]. Le PLGA se dégradant rapidement, les tests de traction et de flexion ont été réalisés quotidiennement. Il existe une phase de maintien des propriétés mécaniques pendant les 4 premiers jours (contrainte et module de tension, contrainte et module de flexion), puis une décroissance linéaire rapide jusqu'au 12^e jour. Les propriétés mécaniques disparaissent à partir d'une certaine période de dégradation (12 jours pour le PLGA), date qui est importante pour le rôle de prévention des complications.

La dernière étude de Xu et al. publiée sur le sujet en 2010 à propos de l'étude de la dégradation *in vivo* chez le chien d'un stent en PLA étudiait la pression de rupture dans la voie biliaire [202]. Le niveau de pression était augmenté significativement de 30 KPa à 140 KPa de

la première à la 12^e semaine de dégradation. Ces résultats prouvent que la force des voies biliaires s'améliore, avec la VBP qui est donc cicatrisée et fonctionnelle.

2.2. Voies biliaires artificielles et ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est en plein essor avec la création de tissus artificiels humains fonctionnels. Pour les voies biliaires, plusieurs équipes travaillent sur le sujet. La synthèse d'un néo-tissu biliaire par ingénierie tissulaire ne permettrait pas forcément de prévenir les complications biliaires, mais plutôt de réparer les voies biliaires dans certaines indications, les nécroses de la voie biliaire, les sténoses ischémiques, ou même les atrésies des voies biliaires chez les enfants. Cet outil thérapeutique pourrait éviter des transplantations ou des re-transplantations.

Heistermann et al. [203] décrivent en 2006 une nouvelle technique de reconstruction de la voie biliaire sur un modèle porcin, à l'aide d'un greffon veineux autologue protégé par une prothèse biodégradable endoluminale en PLA₁₀₀. Au bout de 4 mois, la prothèse est complètement dégradée, avec l'apparition d'un néo épithélium biliaire au niveau du greffon veineux. La propriété de néo-épithélialisation biliaire par colonisation cellulaire du polymère a été mise en évidence. L'équipe japonnaise de Aikawa [204] confirme ce résultat en 2007 en testant une prothèse polymérique biorésorbable en copolymère PLA-PCL pour traiter des plaies des voies biliaires chez le porc. L'implantation de cette prothèse permettait une cicatrisation de la voie biliaire sans fistule ni sténose, avec colonisation du biomatériau par les cellules épithéliales biliaires. Miyazawa avait déjà publié une étude en 2005 sur la possibilité de fabrication d'un substitut de voie biliaire, avec le remplacement d'une perte de substance de la voie biliaire par une prothèse tubulaire PLA-PCL renforcée par des fibres PGA réalisée par électrospinning [205]. Sur le plan histologique, cette néo voie biliaire avait toutes les caractéristiques de la voie biliaire native. Palmes en 2009 réalise une étude comparative chez le porc [206], en réalisant la même technique de reconstruction avec un greffon veineux jugulaire autologue, avec ou sans prothèse PLA (**Figure I-12**). Dans le groupe avec stent PLA, le développement d'une néo voie biliaire était systématiquement observé, sans aucune morbi-mortalité. Par contre, dans le groupe sans prothèse PLA, 70% des cochons étaient décédés d'une péritonite biliaire et/ou cholangite. Liang en 2012, décrit avec succès la réalisation du même type de reconstruction sur cochon à l'aide d'un stent en poly[acide sébacique-co-(1,3-propanediol)-co-(1,2-propanediol)] entouré d'un patch épiploïque vascularisé [124]. Aucune complication n'est observée lors du suivi. L'étude histologique à 3 mois postopératoire ne

révèle pas d'obstruction de la voie biliaire, ni de fragmentation du stent. Une néo voie biliaire est observée avec une néo structure collagénique semblable à la voie biliaire native.

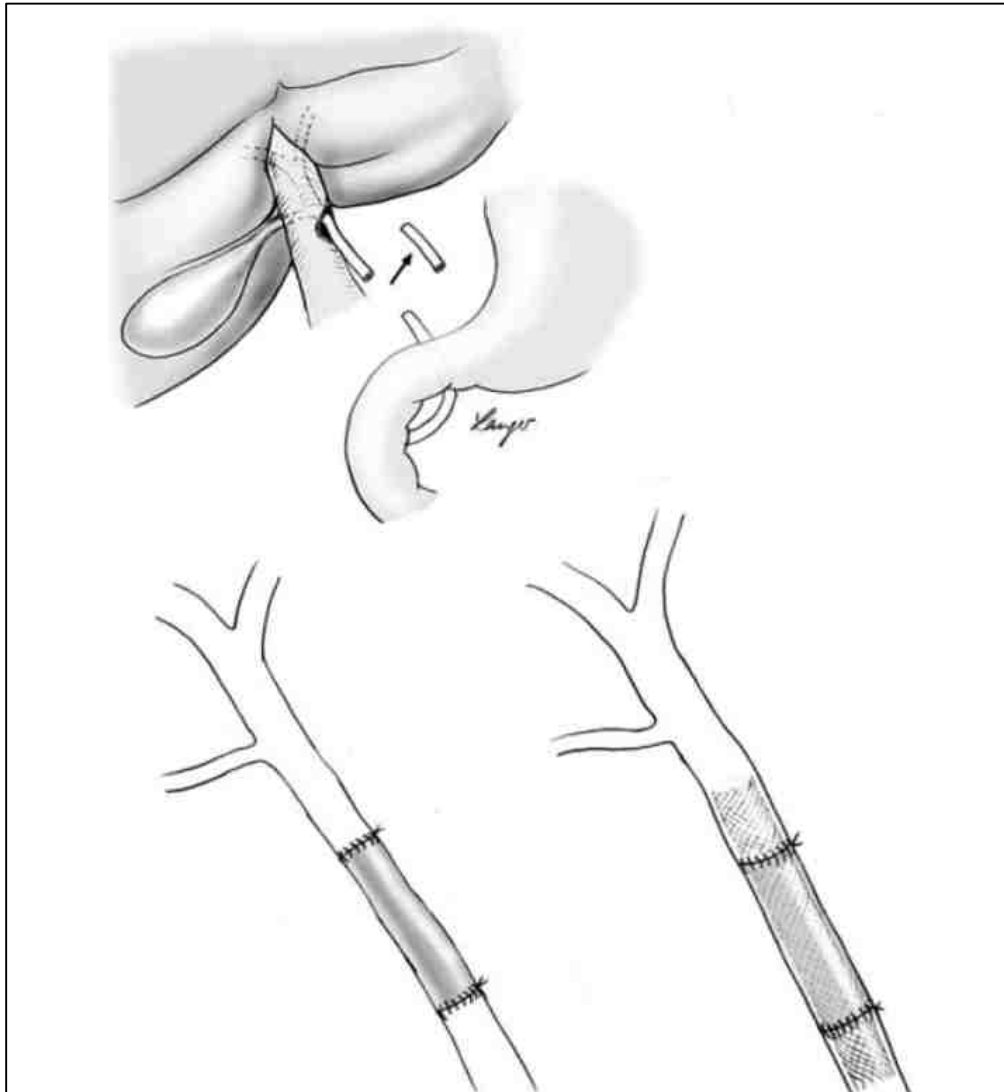


Figure I-12 : Technique de reconstruction de la voie biliaire, à l'aide d'un greffon veineux autologue protégé par une prothèse biodégradable endoluminale, selon Palmes [206].

Très récemment, grâce à la combinaison d'ingénierie tissulaire et de transplantation cellulaire, les scientifiques de l'équipe du Pr L. Vallier à Cambridge ont généré et transplanté des voies biliaires humaines artificielles à partir de cholangiocytes primaires humains, en associant une matrice en polymère dégradable et culture de cellules souches [207]. À partir de prélèvements de voies biliaires extra hépatiques humaines, ils ont réussi à isoler des

cholangiocytes et à les cultiver. Les cellules épithéliales de l'arbre biliaire ont pu se développer *in vitro* tout en conservant leur signature transcriptionnelle et leurs caractéristiques fonctionnelles. Lors des cultures *in vitro*, le nombre de cholangiocytes primaires a augmenté, traduisant la possibilité de régénération tissulaire. *In vitro*, les cellules se sont développées sous forme de structures 3D, sortes d'*organoïdes biliaires* appelés *ECOs* (*extrahepatic cholangiocyte organoids*). Une fois transplantés chez la souris, les *ECOs* se sont assemblés en structures tubulaires complexes ressemblant à des voies biliaires. Une foisensemencés sur des *scaffolds* de PGA ou de collagène, les *ECOs* forment une structure tubulaire tout en gardant les caractéristiques de l'épithélium biliaire. Ces voies biliaires artificielles pourraient être une solution thérapeutique pour traiter les complications biliaires après TH, en particulier les sténoses ischémiques.

2.3. Les anastomoses sans sutures

Des techniques d'anastomoses sans suture tendent à se développer en particulier pour les anastomoses vasculaires [208,209]. Le concept est de manchonner les structures à anastomoser de chaque côté des extrémités d'un tube, et de resserrer les vaisseaux sur le tube à l'aide d'un fil circulaire ou d'un anneau extraluminal. Des techniques plus poussées ont ensuite été développées avec des anneaux magnétiques par exemple. Les avantages rapportés sont une diminution de la durée opératoire, une augmentation de la résistance à la pression et une diminution de la morbidité postopératoire [209]. Quelques auteurs ont testé la réalisation de ce type d'anastomoses sur les voies biliaires [210–212]. Aucune étude ne permet actuellement de prouver que ces anastomoses seraient moins à risque de complications, mais cette technique présente un biais majeur pour la voie biliaire. La paroi artérielle n'a pas de vascularisation propre, elle est nourrie par imbibition à partir de la lumière artérielle. À l'inverse, la paroi de la voie biliaire est richement vascularisée avec des plexus épicholedociens et intramuraux (*cf. figure I-9, chapitre I §2.3.1*), tout système d'anneau ou de bague comprimant la voie biliaire circulairement au niveau d'une anastomose va entraîner une nécrose de celle-ci, et donc engendrer des complications.

CHAPITRE I : CONTEXTE ET ÉTAT DE L'ART

C- Bilan et cadre de la thèse

Les complications biliaires anastomotiques sont les principales causes de morbi-mortalité après transplantation hépatique. La mise en place d'un drain biliaire interne lors de la réalisation de l'anastomose biliaire semble être la meilleure solution pour réduire le taux de complications biliaires anastomotiques.

La mise en place d'un drain biliaire interne résorbable (RIBS) permettrait en plus des avantages d'un IBS « classique » d'éviter un geste d'ablation du dispositif avec les conséquences qui en découlent et de favoriser la cicatrisation anastomotique grâce aux propriétés du polymère utilisé.

L'objectif de ce travail était la conception et le développement de cette prothèse biliaire résorbable (RIBS) de A à Z, en partant de la réalisation du cahier des charges jusqu'à envisager le marquage CE et la mise sur le marché.

En concertation avec tous les protagonistes travaillant sur le projet, chirurgiens, chimistes des matériaux et biomécaniciens, et à partir des données de la littérature, nous avons défini un cahier des charges au RIBS (**Tableau I-4**).

Après avoir sélectionné le matériau et le procédé de mise en forme, nous avons utilisé la méthodologie suivante en trois étapes pour caractériser et tester le RIBS : étude *in vitro* dans des conditions biliaires simulées, étude *in silico* avec modélisation de la voie biliaire puis étude *in vivo* chez l'animal pour évaluer la cinétique de dégradation et la visualisation radiologique.

L'objectif étant la conception et le développement du RIBS pour sécuriser l'anastomose biliaire en TH vers une phase d'industrialisation, les études étant réalisées en tenant compte des aspects réglementaires imposés par le développement d'un dispositif médical classe III.

Sécuriser l'anastomose biliaire	Éviter l'apparition de complications telles que fistule ou sténose
Être stérilisable	Avoir des propriétés matériau qui ne sont pas altérées par l'irradiation
Être biorésorbable	Se dégrader en 6 mois, en métabolites biocompatibles
Être biocompatible	N'induire aucun effet délétère sur l'organisme Ne pas induire de réaction immunitaire ou tumorale, ni de réaction inflammatoire démesurée
Conserver ses propriétés mécaniques au cours du temps	Calibrer de l'anastomose Conserver ses propriétés mécaniques pendant au moins 8 semaines pour éviter les sténoses
Avoir une élasticité compatible avec l'implantation	Être suffisamment souple pour être implanté Se rouvrir en cas de fermeture temporaire de la lumière
Être imperméabilité	Maintenir ses propriétés imperméables au moins 4 semaines pour éviter les fistules
Maintenir le fonctionnement normal du système biliaire	Ne pas être pro-lithiasique, ne pas obstruer les voies biliaires en se dégradant
Être visible radiologiquement	Être visible par imagerie médicale conventionnelle (Rayons X) pendant toute la durée de la dégradation

Tableau I-4 : Cahier des charges du drain biliaire interne résorbable

CHAPITRE II

ÉVALUATION DE COPOLYMÈRES PLA/PEG POUR L'APPLICATION BILIAIRE

CHAPITRE II : ÉVALUATION DE COPOLYMÈRES PLA/PEG POUR L'APPLICATION BILIAIRE

INTRODUCTION DU CHAPITRE II

Dans la perspective d'utilisation du RIBS chez l'homme, il est nécessaire en premier lieu de pouvoir déterminer ses propriétés physico-chimiques et de caractériser son comportement mécanique au cours de la dégradation *in vitro*.

Le matériau constituant le RIBS doit répondre à une liste importante d'exigences listées dans le cahier des charges. Nous avons pris le parti de travailler avec des copolymères pour pouvoir faire correspondre la structure du matériau aux différentes exigences. Le polymère finalement sélectionné est un copolymère tribloc PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀. Les critères de choix de copolymère ont fait l'objet d'études préliminaires, ces critères seront évoqués dans ce chapitre.

Concernant la mise en forme du RIBS, plusieurs techniques ont été réalisées en étude préliminaire (**Annexe I-5**). Pour cette étude, la technique de film par évaporation de solvant puis collage a été retenue. Le milieu biliaire dans lequel le RIBS doit être implanté possède des spécificités qui doivent être prises en compte dans une étude de dégradation *in vitro*, en particulier le pH qui peut avoir un rôle de catalyseur de la dégradation. Pour différentes raisons, l'étude de la dégradation *in vitro* dans de la bile humaine ou animale n'était pas envisageable (sécurité biologique, laboratoire inadapté, difficultés de recueil, coût). Nous devons donc reproduire une solution de dégradation simulant le milieu biliaire.

Pour confirmer l'intérêt et la faisabilité de l'implantation du RIBS, l'étude de la dégradation *in vitro* devait valider les éléments suivants du cahier des charges : une dégradation complète en 6 mois sans macro-particules, une imperméabilité pendant minimum 4 semaines, une conservation des caractéristiques mécaniques pendant 8 semaines. Deux groupes expérimentaux ont été réalisés. Un groupe « témoin » avec une solution à pH 7,2, et un groupe

« biliaire » avec une solution reproduisant la composition hydro-électrolytique de la bile avec un pH de 8,4.

Ce deuxième chapitre est donc une étude *in vitro*, consacrée à la conception et l'évaluation de la dégradation dans des conditions biliaires simulées d'un RIBS. Avec évaluation des propriétés mécaniques et physico-chimiques au cours de la dégradation par rapport aux exigences liées au cahier des charges.

Ce chapitre est un projet d'article :

E. Girard, G. Chagnon, A. Moreau-Gaudry, C. Letoublon, D. Favier, S. Dejean, B. Trilling, B. Nottelet. *Evaluation of a biodegradable PLA-PEG-PLA internal biliary stent for liver transplantation: in vitro degradation and mechanical properties.*

1. INTRODUCTION

Biliary complications in Liver Transplantation (LT) are a significant source of postoperative morbidity and mortality, induce a severe financial burden and may eventually compromise outcomes [12,13,213]. Complications arising from the biliary anastomosis (leakage, stricture) are usually considered as the technical Achilles heel of LT. In the literature, incidence of anastomotic biliary complications remains high, ranging from 10% to 50% [214]. Duct-to-duct reconstruction with an external stent implantation (T-tube) has been used to lower pressure in the biliary system, provide easy postoperative radiological access to the biliary tree, and decrease anastomotic complications [103,213,215,216]. Although the debate is still open, a growing number of centers have abandoned T-tube placement along with accumulating evidence pointing out at specific T-tube induced morbidity and showing safe, efficient and cost-effective outcomes without T-tube placement [18,19,36,96,99,100]. The use of internal biliary stenting (IBS) has been reported as a safe alternative to T-tube placement in LT, allowing to decrease anastomotic biliary complications [20–22,105]. The main advantage of IBS is the absence of choledochotomy which is a major source of biliary leakage after T-tube placement [215,217]. Although IBS is an interesting option, several technical issues such as the nature of the material (silastic, rubber) require further refinement. In particular, the main disadvantage of the materials currently used is their non-degradability, which leads to an additional surgical procedure for ablation, involving potential complications and an additional cost.

The ideal technique might be to perform a duct-to-duct with intraoperative insertion of a Resorbable Internal Biliary Stent (RIBS). This, unlike the silastic stent, avoids a gesture of device ablation. To be usable and useful, RIBS must comply with following specifications. RIBS or its degradation metabolites must be biocompatible without inducing immune or tumor reaction, or an excessive inflammatory response. Based on incidence of anastomotic biliary leakage and anastomotic biliary stricture in literature [218–220], to prevent bile leak, RIBS must be impermeable for a minimum of 4 weeks. To avoid bile duct strictures, it must keep its mechanical properties to calibrate the anastomosis for 8 weeks. Finally, it must be completely degraded in 6 months, without macro-particles. Last, on a practical aspect, RIBS must be flexible enough to be implanted. Many biodegradable polymers such as polyglycolide, polylactide, and their copolymers are used for the manufacture of implantable medical devices such as surgical suture, bone fixation, drug delivery, stents, and tissue scaffolds [143,221–224]. The use of biodegradable stent is developing in clinical practice for many applications, particularly vascular, reflecting safety of these devices [223,225]. For the biliary system,

several studies have been conducted since 2006. Xu et al in 2009 investigated degradation of a biodegradable poly-L-Lactide-*co*-Glycolide (PLGA) stent *in vitro* in bile [177]. Physicochemical and mechanical characteristics were compatible with bile duct implantation, but material complete degradation duration was about 4 or 5 weeks, which is not long enough for a LT application. Several studies experimented stent degradation in large animals' bile ducts (dog or pig). All demonstrated good biocompatibility and no bile sludge stent obstruction [174,194–196]. Tashiro was the first in 2009 to focus on the use of these biodegradable devices for LT [195]. They evaluated the successful resorption and biocompatibility of a PGA-PCL copolymer biliary stent on a porcine transplant model, without biliary leak or obstructive cholestasis. Device was totally absorbed in six months. Histologic analysis of the bile duct at the site of prosthesis absorption revealed minimal fibrosis, with negligible inflammatory response. The main disadvantage was a too rigid stent, technically difficult to implant in liver transplantation.

Kinetics of degradation and mechanical properties are crucial data for material selection. Due to their large range of mechanical properties and degradation times, and their approval by the regulatory agencies, biodegradable and biocompatible copolymers of aliphatic polyesters and polyethers, such as poly(lactide)/poly(ethylene glycol) copolymers (PLA/PEG) are excellent candidates for tissue engineering [226]. In this frame, the polymer was used as a “scaffold”, that is a physical temporary support for the tissular reconstruction. Tremendous amounts of recent research have therefore focused on the use of PLA/PEG copolymers in tissue engineering applications ranging from vascular grafts, to nerve guides or bone scaffolds [227–231]. In particular, some of us demonstrated that PLA-Poloxamer and PLA-Poloxamine triblock copolymers can be good candidates for ligament tissue engineering as, besides ease of processability, their mechanical and degradation properties can be easily tuned to meet the application requirements [163,164,232,233]. In an effort to produce degradable copolymers matching the mechanical properties of softer tissues, we also investigated another family of poly(lactide)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(lactide) (PLA-*b*-PEG-*b*-PLA) by focusing on the modelling of their mechanical behavior over degradation that was fitted with a non-linear viscoelastic model [148,234]. Hydrolysis is the main degradation mechanism of aliphatics polyesters. There are no bile enzymes that can degrade it. However, pH variations can be a catalyst for degradation. Bile pH can vary from 7 to 8.4, because under the influence of secretin hormone, bicarbonates concentration increases, at the expense of chlorine and bile acids [235].

The aim of the present work, is to design a RIBS based on a selected PLA-*b*-PEG-*b*-PLA to secure biliary anastomose during healing and avoid complications such as bile leak and stricture. In more details, the objectives are to evaluate the mechanical properties of a RIBS prototype with respect to the common bile duct stenting requirements in liver transplantation. For this purpose, the mechanical properties and the permeability are evaluated under simulated biliary conditions to explore the usefulness of a PLA-*b*-PEG-*b*-PLA RIBS to secure biliary anastomosis. This article unfolds as follows: after discussing the selection criteria of polymer, we will study physico-chemical properties with permeability test and pH influence, and finally mechanical properties.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France) with exception of phosphate-buffered saline (PBS) that was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), and D,L-lactide (D,L-LA) that was purchased from Purac (Lyon, France). All chemicals and solvents were used without purification.

2.2. Physicochemical characterization

¹H NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform was used as solvent, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane.

Number average molecular weight (M_n) and polydispersity (PD) of the polymers were determined by exclusion chromatography (SEC) using a Viscotek GPCMax auto sampler system fitted two Viscotek LT5000L Mixed Medium columns (300 mm x 7.8 mm), a Viscotek VE 3580 RI detector. The mobile phase was tetrahydrofuran (THF) at 1 mL/min flow and 30°C. Typically, the polymer (20 mg) was dissolved in THF (2 mL) and the resulting solution was filtered through a 0.45 μ m Millipore filter before injection of 20 μ L of filtered solution. M_n was expressed according to calibration using polystyrene standards.

2.3. Copolymers synthesis and RIBS prototype manufacturing

PLA-*b*-PEG-*b*-PLA triblock copolymer was synthesized following a procedure previously described by Leroy et al [232]. Typically, predetermined amounts of D,L-LA and PEG were introduced in a flask. Sn(Oct)₂ (0.1molar % with respect to LA units) was then added. After degassing, the flask was sealed under vacuum and polymerization was allowed to proceed at 110°C. After 5 days, the copolymer was recovered by dissolution in dichloromethane (DCM) and precipitation in cold diethyl ether. Finally, the product was dried under reduced pressure to constant mass. The copolymer was obtained with a yield of 90%. DP of each PLA block is defined as:

$$(1) DP_{PLA}(\%) = \frac{1}{2} \times \frac{DP_{PEG}}{\frac{EG}{LA}}$$

with EG/LA being the ratio of ethylene oxide and lactyl units calculated from ¹H NMR spectra, ¹H NMR: (300MHz; CDCl₃): δ (ppm)=5.1 (q, 1H, CO-CH(CH₃)-O), 3.6 (s, 4H, CH₂-CH₂-O), 1.5 (m, 3H, CO-CH(CH₃)-O). $M_{ntribloc}=345\ 000$ g/mol, LA/EG=10/1.

The molecular weight of the synthesized triblock copolymers is defined as:

$$(2) M_{ntribloc}(\%) = 2 \times (DP_{PLA} \times 72) + M_{nPEG}$$

With $M_{nPEG} = 20\ 000$ g/mol.

Polymer films with a targeted thickness of 0,6 mm (based on commercially available stents) were manufactured by solvent evaporation. A predefined quantity of polymer was solubilized in acetone, the solution was poured in a small dish and placed for 36h under an extractor hood for evaporation. Final solvent removal was obtained by further drying in vacuum under 1.10^{-3} mbar for 3 days. A 0.5 mm thick film was obtained.

RIBS was then fabricated by film-rolling and gluing by means of a partial dissolution of the polymer film surface. A 45 mm x 1.5 mm rectangular plate was cut from the film and then wound around a metallic tube with 4.6 mm external diameter. The gluing was achieved using acetone. RIBS dimensions were: external diameter 5.6 mm, internal diameter 4.6 mm, length 45 mm, an illustration is presented in **Figure II-1**.

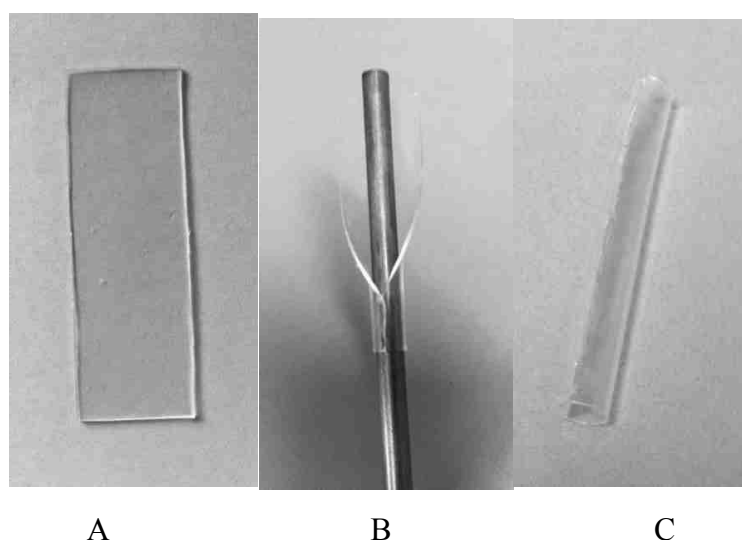


Figure II-1: RIBS manufacturing. A- Films made by solvent evaporation. B- Film-rolling and gluing thanks to a partial dissolution of the polymer film edges. C- Finalized RIBS.

2.4. In vitro degradation studies

PLA-*b*-PEG-*b*-PLA hydrolytic degradation was investigated under physiological conditions at 37 °C, under stirring 100 rpm, and protected from light.

In more details, a “control group” was degraded under classical conditions, *i.e.* in PBS (pH 7.2) while a “biliary group” was degraded in a simulated bile fluid reproducing bile composition and pH (pH 8.4). Biliary pH physiologically being oscillatable between 7 and 8.4. To increase probability of finding difference, if any, the most basic pH was chosen, which corresponds to the worst case scenario in terms of degradation kinetics.

This simulated bile fluid was made according to a Sørensen model by mixing 96.5 mL of Na₂HPO₄ 133 mM (23.67 g Na₂HPO₄ per liter of water) with 3.5 mL of KH₂PO₄ 133 mM (18.10 g of KH₂PO₄ per liter of water) to 100 mL of solution. The pH of solutions was tested weekly, and solutions were replaced when it fell below a threshold value (pH <7 for the control group and pH <8 for biliary group).

Measurements at predefined degradation time points were performed in triplicate and expressed as mean values ± SD.

For mass loss measurement, RIBS of 20 mm long, 10 mm perimeter and 0.5 mm thick were prepared. They were then placed in 20 mL test tubes and submitted to 12 weeks of degradation the selected fluid (PBS or ‘biliary’ fluid according to the group) at 37°C within an

agitator/incubator. The initial mass (m_0) was measured in the initial state. At given time-points, films were taken out of the solution, weighted, dried and weighted again to obtain the hydrated mass (m_{hyd}) and the dry mass (m_d). Mass loss and water uptake were then calculated according to:

$$(3) \quad \text{Mass loss (\%)} = \frac{m_0 - m_d}{m_0} \times 100$$

$$(4) \quad \text{Water uptake (\%)} = \frac{m_{hyd} - m_0}{m_0} \times 100$$

Finally, in addition to molecular weight and mass loss measurements, macroscopic RIBS observation were made at each degradation time, and degradation solutions were filtered with a 0.45 μm pore size and 47 mm diameter cellulose acetate membrane filter. The membrane filter was then analyzed by microscopy imaging (x40 magnification) to measure the size of particles that may were retained.

2.5. Permeability test

Samples used were 0.5 mm thick and 25 mm diameter circular polymer films. Permeability of samples was tested using a horizontal diffusion chamber as presented in **Figure II-2**. Two 5 mL glass compartments were separated by the film to be tested. Seal was made by apposition of a cellulose joint on either side of the polymer film. First chamber was filled with degradation solution, which was maintained at 37 °C. A water column of 20.3 cm was disposed on the first chamber in order to exert on the plate a 15 mmHg pressure (simulating internal pressure of bile duct). Pressure of 15 mmHg was maintained 24 hours on the plate. To assess porosity, amount of liquid in the second chamber was measured.

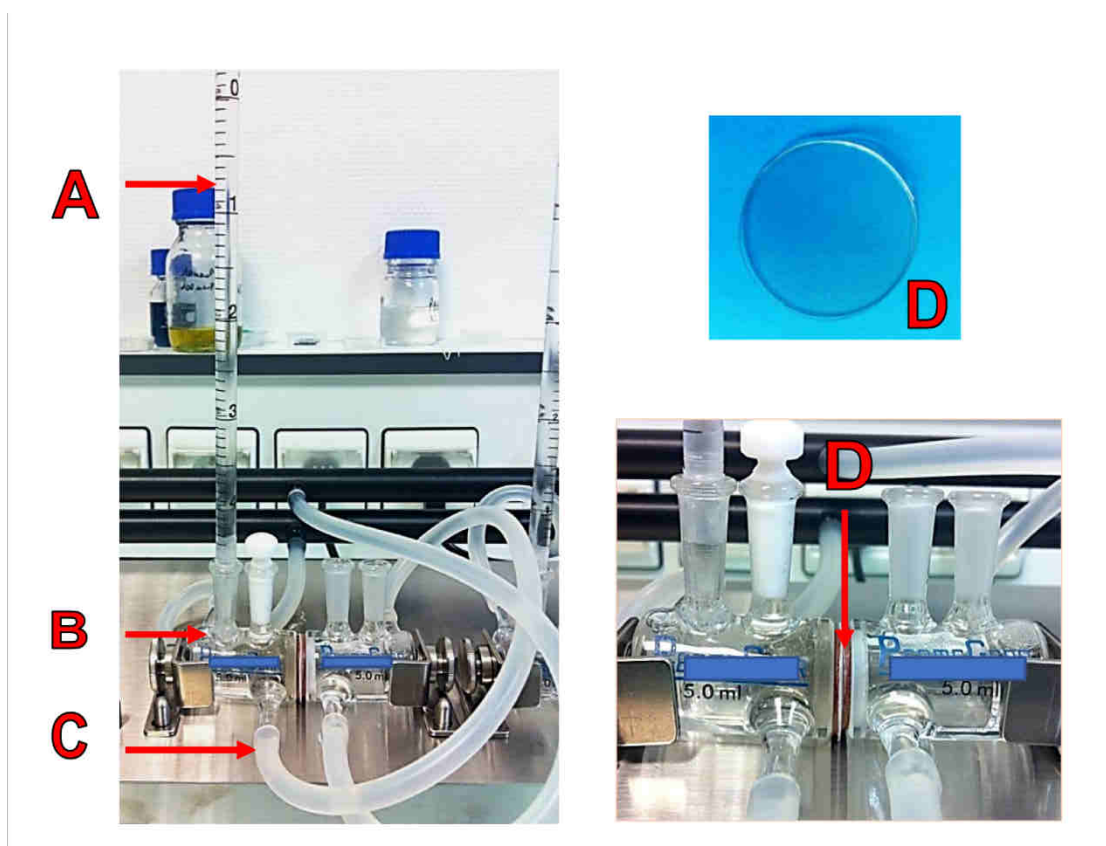


Figure II-2: Horizontal diffusion chamber. A: water column, B: diffusion chamber with degradation fluid, C: 37°C independent liquid circuit. D: Sample to test, surrounded by cellulose joints.

2.6. Mechanical properties measurement

RIBS samples were put in degradation medium following the protocol described in §2.4. At defined time-points, compressive mechanical tests were realized at a controlled temperature of 37°C on the RIBS samples (5 mm length) over the degradation period. At least three specimens were used for each test. Mechanical tests consisted in 3 successive cycles, load at 10, 20 and 50% respective strain level, with a loading speed rate of 6 mm/min followed by an unload with a speed rate of 0.05 mm/min. Mechanical tests were performed with a Gabo Eplexor mechanical test machine with a load cell of 25 N at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 weeks of degradation. To measure the strain field, a Digital image correlation software Vic2D was used to measure the section deformation of the RIBS. During mechanical tests, images of the specimens were recorded with a camera at a frequency of 30Hz. The mechanical work (N.m) to deform the RIBS was evaluated it was calculated by means of the area under the force-displacement curve.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Syntheses

In an attempt to provide an alternative to RIBS that have poor mechanical properties or inadequate degradation rate (too low for PCL or crystalline PLA, too fast for PLGA), we synthesized in a preliminary study multiblock copolymers made of amorphous PLA₅₀ (also known as PD,L-LA) and Pluronic®, Poloxamer® or PEG by ring-opening polymerization of lactide (**Table II-1**). As described in our previous study, this strategy leads to a family of copolymers with good control of the macromolecular parameters (molecular weight, linear vs. star block copolymers, crystallinity) [232]. This control allows one to find the best match between the copolymer candidate and the application requirements. Based on preliminary evaluation and previous studies (resumed on Table II-1), PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ was selected for RIBS development as it showed mechanical and degradation properties corresponding to specifications (flexibility after drying, low Young's modulus and *in vivo* estimated degradation time of about 6 months for a complete resorption).

Composition	Theoretical block Mn (g/mol)	Theoretical Overall M _n (g/mol)	Successful filming	Behavior after drying	<i>E</i> (MPa)	Estimated degradation time <i>in vivo</i>	Ref
PLA ₉₄ -PEG-PLA ₉₄	44 000-12 000-44 000	100 000	Yes	Rigid ++	> 400	1.5 à 5 years	[236]
PLA ₉₄ -PEG-PLA ₉₄	90 000-20 000-90 000	200 000	No	-	> 400	1.5 à 5 years	[236]
PLA ₉₄ -Pluronic-PLA ₉₄	44 000-12 600-44 000	100 000	Yes	Rigid ++	> 400	1.5 à 5 years	[163,164]
PLA ₉₄ -Pluronic-PLA ₉₄	94 000-12 600-94 000	200 000	Yes	Rigid ++	> 400	1.5 à 5 years	[163,164]
PLA ₅₀ -Pluronic-PLA ₅₀	30 000-8 400-30 000	70 000	Yes	flexible ++	± 10	< 3 months	[232]
PLA₅₀-PEG-PLA₅₀	80 000-20 000-80 000	180 000	Yes	flexible +	± 10	< 6 months	[148,151]
PLA ₅₀ -Pluronic-PLA ₅₀	60 000-12 600-60 000	125 000	Yes	flexible +	± 10	< 4 months	[232]

E: Young's modulus; in bold: selected polymer for RIBS manufacturing.

Table II-1: Preliminary analysis, order of magnitude of copolymers properties.

Molecular weights of the copolymers were firstly determined by ^1H NMR spectroscopy, by means of Eqs. (1) and (2). $M_{n\text{tribloc}}$ was 345 000 g/mol. Results were close to theoretical values mentioned in methods section, although a little higher. On the opposite, SEC analyses gave molecular weight values about two times lower than those calculated by NMR, with an average $M_{n\text{tribloc}}$ at 179 000 g/mol. This difference was explained by the use of polystyrene standards for SEC calibration causing inaccurate measurements with aliphatic polyesters [237,238]. Moreover, the amphiphilic nature of the copolymers can modify their hydrodynamic volume and increase their retention time, giving underestimated results.

3.2. In vitro degradation

3.2.1. Morphological change

From a macroscopically point of view, during the degradation period, RIBS color gradually changed from an initial translucent state to a whitish color during the first week, and turned opaque white from the second week. This color change is due to the presence of water domains in the polymer matrix whose size and number affects the whitening effect that increases with immersion/degradation time [239]. From a surgical qualitative point of view, although initially relatively flexible before the degradation, the material gradually became more stiff until the 3rd week, before becoming fragile and brittle from the 6th week. This initial stiffening is due to microphase separation in PLA-*b*-PEG-*b*-PLA copolymers that will be discussed in more details in the paragraph 3.3 dealing with the evolution of the mechanical properties. After 8th week, still brittle, it became slightly deformable. Its shape and integrity could not be fully maintained from the 12th week, evolving to a friable and labile consistency, making tests impossible.

In order to evaluate the risk of bile duct obstruction the degradation medium was filtered to track the presence of small polymer particles leaching out of the stent bulk upon degradation. No particles were visualized on the filters under optical microscope observation at $\times 40$ magnification. The Oddi sphincter size was about a millimeter. There was thus no production of millimeter particles during degradation that could potentially be responsible for a biliary obstacle.

3.2.2. Mass loss, water uptake and molecular weight

The mass loss and the water uptake are presented in **Figure II-3** with an exponential function being observed for the polymer water uptake over time. Water uptake was 25% at 2 weeks, 50% at 4 weeks, 100% at 6 weeks, reaching more than 1000% at 12 weeks.

The mass loss gave information about water soluble oligomers generated during the hydrolysis process and released out of the polymer bulk. Two distinctive periods are visible. During the three first weeks, the mass loss rate was relatively low (about 3% per week) compared to the following weeks (about 10% per week). This induction period is commonly observed during the degradation of aliphatic polyesters and is due to the difficulty, at first, for the degraded chains to diffuse out of the sample [232,240]. After this period, the lower molecular weight and therefore lower entanglement allow the leaching of the degradation products in the degradation medium, which leads to a quasi linear weight decrease.

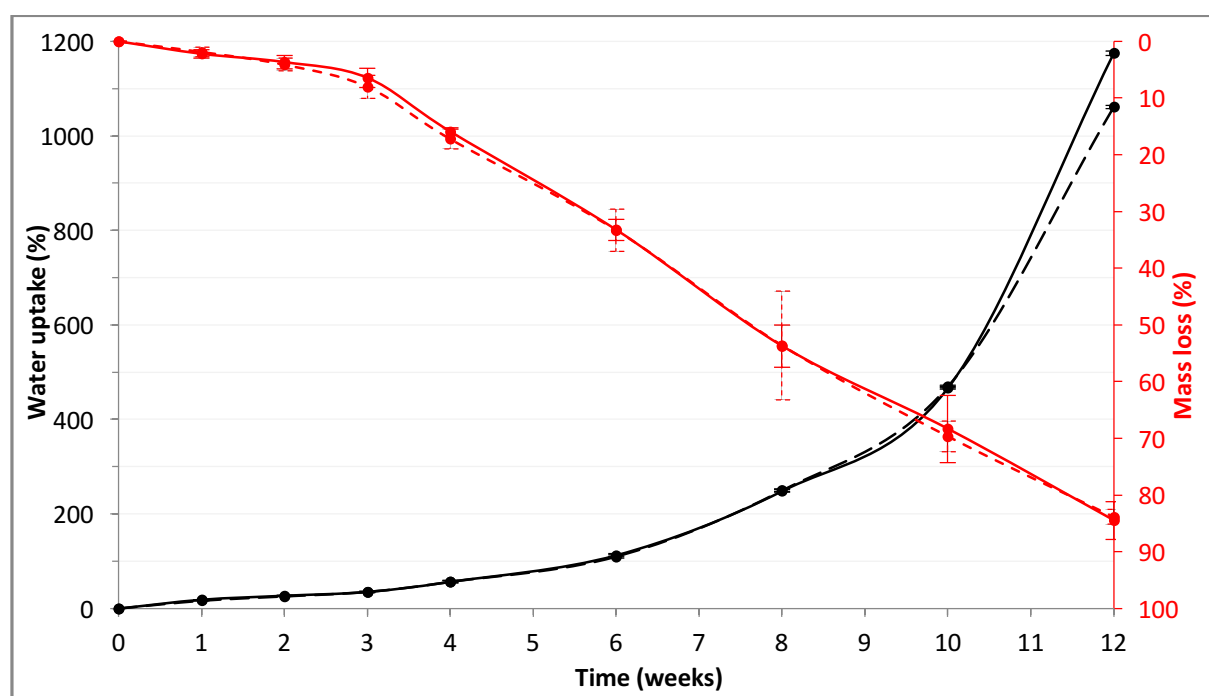


Figure II-3: Mass loss and water uptake of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA triblock copolymer during 12 weeks of degradation at 37°C. Solid line: ‘control group’ with PBS (pH 7.2) as degradation solution, dotted line: ‘biliary group’ with bile like serum (pH 8.4). (Data are represented as means \pm SD with $n=3$)

After the 12th week, even if polymers were not fully degraded, weight loss measurements were impossible to perform because of their friable consistency. Polyester-polyether block copolymers degradation is known to proceed via a bulk erosion, with random polymer chains scissions. The chains became progressively shorter during degradation, releasing soluble oligomers in the media. While keeping its original shape, polymer became an increasingly hollow structure, explaining the observed increase of brittleness.

Interestingly, over the degradation period studied, no significant differences were observed for the water uptake and weight loss for the “control group” and the “biliary group”.

Unlike mass loss, the molecular weight decrease was very important during the two first weeks as illustrated in **Figure II-4** with a 60% decrease. This trend is explained by the highest concentration of ester bonds per volume unit leading to a greater ability of long chains to be hydrolyzed [241]. In the latter stages, concentration of ester bonds is very low, making scission probability and hydrolysis rate almost non-existent. Dispersity index presented in Figure 4 is defined as the ratio of the mass average molecular weight and the number average molecular weight and describes the distribution of molecular mass in a given polymer sample. As expected, the increase of dispersity index follows the decrease of molecular weight. These results highlight the rise of dispersion of chain lengths due to the random scissions of polymer chains that occur during the degradation process. Again, over the degradation period studied, no significant differences were observed for the water uptake and weight loss for the “control group” (pH 7.2) and the “biliary group” (pH 8.4). This absence of difference both in terms of mass loss and molecular weight decrease indicate that the selected PLA-*b*-PEG-*b*-PLA copolymer can stand the more alkaline conditions found in the common bile duct.

3.2.1. Permeability evolution

The material was impermeable until the 8th week of in vitro degradation. There was no fluid diffusion from 1st to 2nd chamber, for both groups (control group and biliary group). From the 10th week, the tests were not practicable because of the fragility of the material at this stage of degradation. Based on incidence of anastomotic biliary leakage in literature [218–220], to prevent bile leak, RIBS must be impermeable for a minimum of 4 weeks. Specifications were respected on this point.

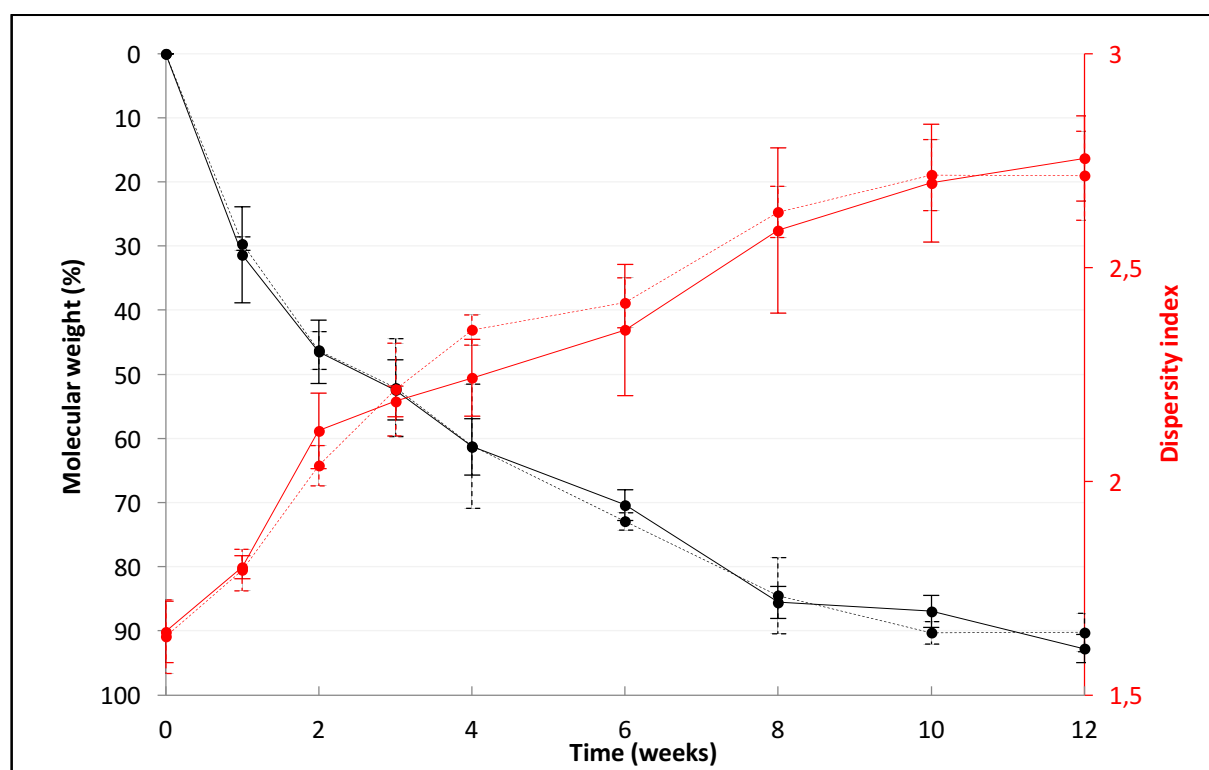


Figure II-4 : Molecular weight and dispersity index evolution of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA triblock copolymer during 12 weeks of degradation at 37°C. Solid line: ‘control group’ with PBS (pH 7.2) as degradation solution, dotted line: ‘biliary group’ with bile like serum (pH 8.4). (Data are represented as means \pm SD with $n=3$)

3.2.2. Influence of pH variations

Based on the reported degradation results for RIBS, no significant difference was identified between the two experimental groups. Whether for mass loss, water uptake or molecular weight, as well as for permeability or mechanical behavior.

The pH difference between the 2 study groups (i.e. "control group" with a 7.2 pH solution vs "biliary group" with an 8.4 pH solution) was too small to induce basic catalysis in biliary group. These results are confirmed by literature data, for acid or basic catalysis, pH differences must be higher, respectively less than 3 or more than 10 [242,243]. Physiological bile pH variations are between 7 and 8.4 [235]. As a result, these biliary pH variations have no impact on RIBS degradation kinetics.

3.3. Mechanical properties evolution

The **Figure II-5A** presents a typical result of a compression test on a RIBS, the illustration is proposed for 1 degradation week. All curves have the same general appearance. Each deformation cycle was characterized by a load (10, 20 or 50%) followed by an unload to zero stress. There was a strength plateau above a strain of 10% and stiffening after a strain of 30%. Unload could be decomposed into two phases: an instantaneous relaxation corresponding strength fall for a constant strain, and springback to zero stress. Regardless of degradation time, springback phase was constant for all samples, systematically starting at 1 N force (end of the instantaneous relaxation). Springback was 8% for 10% strain load, 15% for 20% strain load, and 40% for 50% strain load. For very large displacement a strain hardening can be observed meaning that the closures of the RIBS would need a large amount of force. The same mechanical test was applied on a silicone stent (*Tubular drain*[®] – *Péters Surgical, external diameter 5.3 mm, internal diameter 4.8 mm, length segment 5 mm*) currently used in liver transplantation [22], the result is presented in **Figure II-5B**. The curve presents a similar level of force for similar deformation, the main difference is that the initial slope is greater for the PLA-*b*-PEG-*b*-PLA and that the material presents more hysteresis. The silicone stent is efficient to solve the clinical problem but not perfect, the PLA-*b*-PEG-*b*-PLA having closed stiffness must be also a good candidate, but with different mechanical properties as hysteresis and the stress plateau.

The PLA-*b*-PEG-*b*-PLA curve evolves with the degradation process. The slopes of curves (represented by red arrows on Figure 5A) was evaluated for each deformation cycle at 10, 20 and 50% and measured for each degradation time. The results are presented in **Figure II-6**. It appears that the stiffness of the RIBS is first increasing during three weeks due to microphase separation in copolymers and is then continuously decreasing until 10 weeks, illustrating the normal degradation process.

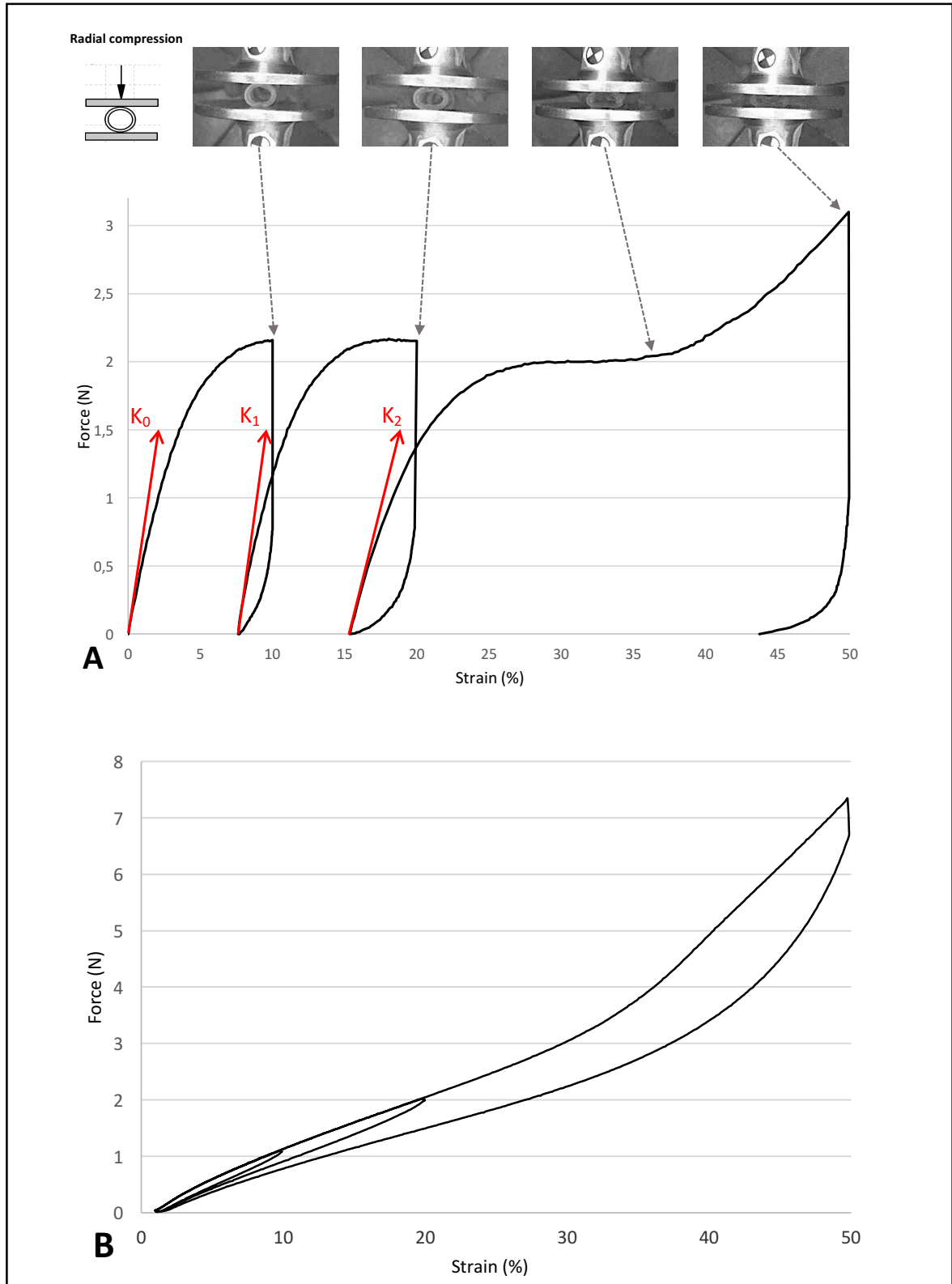


Figure II-5: Mechanical compression tests: 3 successive cycles with load at 10, 20 and 50% strain level, followed by an unload to zero strain.

A. Typical result of radial compression test on a RIBS. Stiffness (slope of curve at the origin in red) was evaluated for each deformation cycle.

B. Same mechanical test applied on a silicone stent segment.

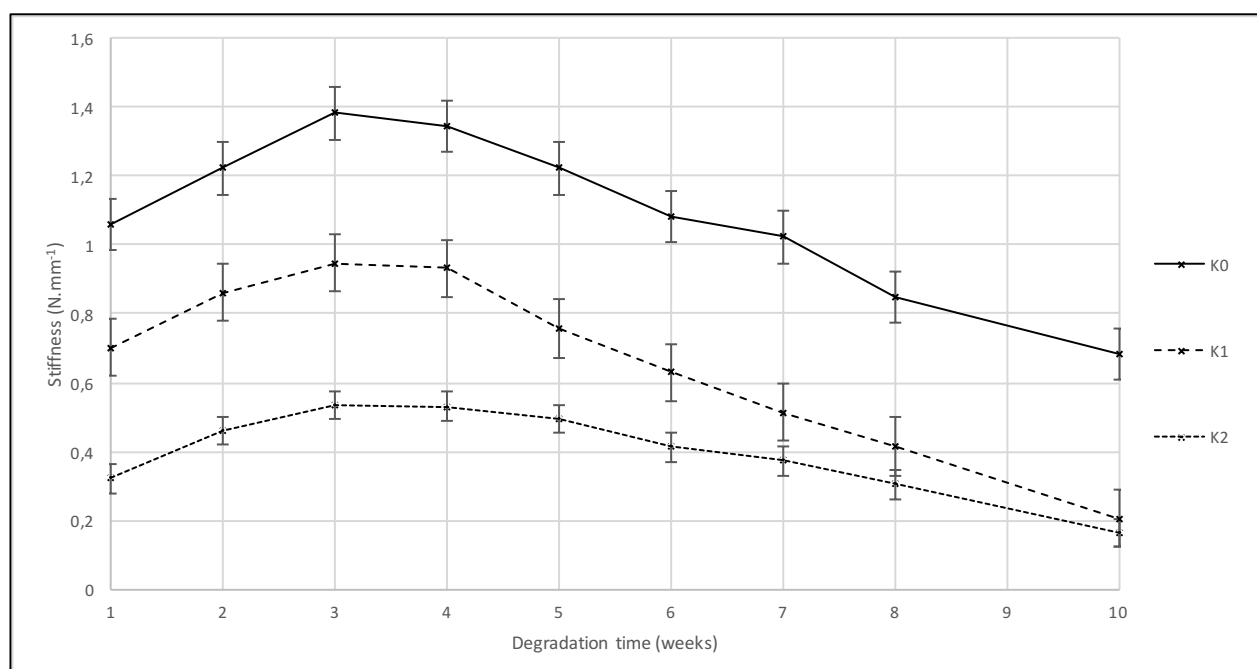


Figure II-6: Stiffness (K) for RIBS mechanical compression tests during degradation, for different strain cycles.

The observed evolution of stiffness, but also color changes can be explained as follows. In triblock copolymer PLA-*b*-PEG-*b*-PLA, PEG short blocks have a role of plasticizer and chains mobility and phase separation are facilitated by the water uptake which plasticizes the polymer. In the case of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA, this water uptake leads to microphase separation of the PLA and PEG blocks, which results in the fact that the plasticization of long PLA blocks by the short PEG blocks (more flexible with lower transition temperature) loses its effectiveness at the beginning of degradation [244,245]. Evolution of polymer properties during the first 3 weeks can therefore be explained by 2 phenomena. First, water uptake causes material whitening and a little plasticization [239]. In the present case, this plasticization effect is not perceptible because it is associated with the second phenomenon of microphase separation. This phenomenon in the triblock copolymers, results in a loss of plasticization of the PLA long blocks by the PEG short blocks, and in a stiffening of the structure [245]. This stiffening continues during degradation until separations phases are complete, or until degradation becomes preponderant. This last point is eased by the molecular weight decrease observed during the first 3 weeks (Figure II-4, 50% decrease) that facilitate microdomains rearrangements.

To measure the influence of the hysteresis of the material, the evolution of the work necessary to load and unload the material at 10, 20 and 50% was calculated, the result is presented in **Figure II-7**. As for the stiffness, the amount of work becomes greater after some weeks before drastically decreasing, illustrating the loss of mechanical properties. Work curves decrease was more important than the stiffness one. During degradation, polymer chains were shortened, but kept a good stiffness modulus. While properties with large deformation (illustrated by work) were lowered because of untangled chains.

The loss of mechanical properties is not important between the first and the tenth week ensuring the keep of enough mechanical properties of the RIBS and its efficiency. But as seen previously (Figure II-4), after 10 weeks, the polymer has lost more than 90% of its initial molecular weight, making mechanical tests impossible due to the extreme brittleness of the specimens. Finally, after 10 weeks, the material would lose the main part of the mechanical properties, meaning that the mechanical resistance should be performed by the constructs composed of infiltrated cells and remaining components of the RIBS.

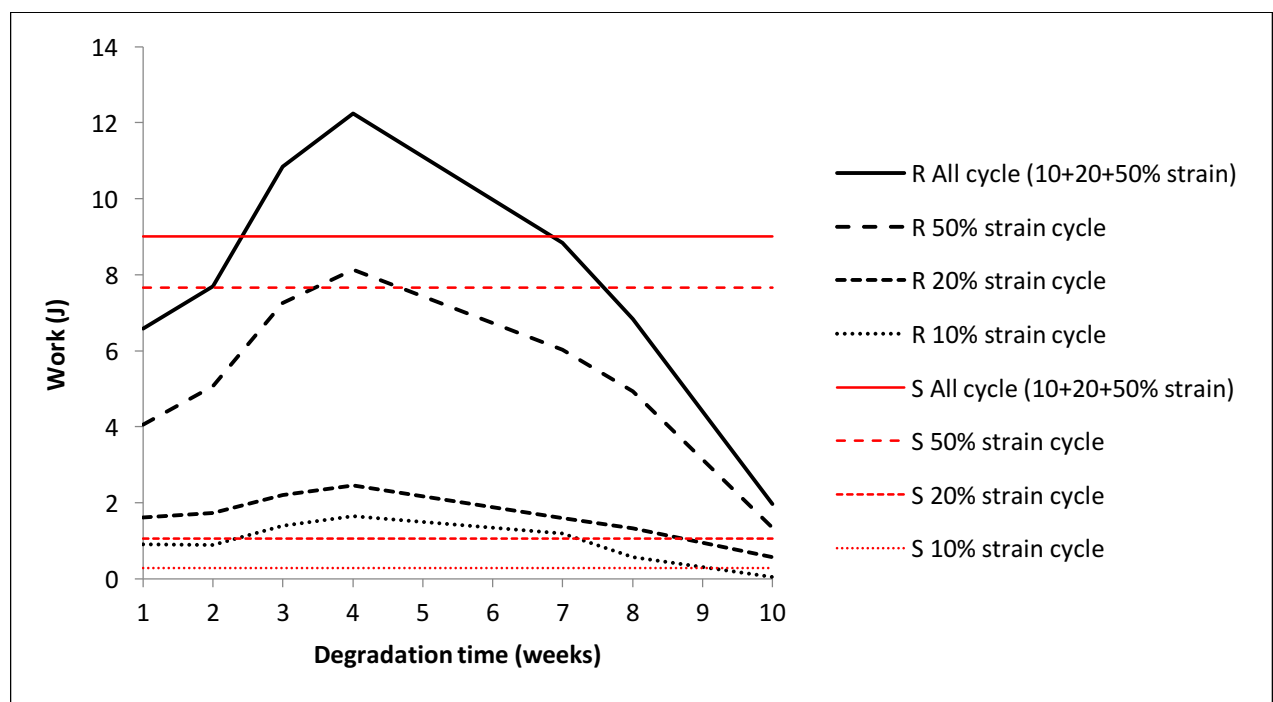


Figure 7: RIBS compressive mechanical tests. Work evolution during degradation for RIBS (R) in black, compare to work for silicone stent (S) in red.

4. CONCLUSION

In present study, we chose PLA-*b*-PEG-*b*-PLA as RIBS due to mechanical and degradation properties corresponding to the specifications required for biliary stents. We found no influence of pH on the kinetics of degradation for PBS (pH 7.2) and simulated bile fluid (pH 8.4), with in particular the material remaining impermeable for at least 8 weeks, and keeping its mechanical properties for 10 weeks. *In vitro* degradation was complete at 6 months. Results of present study proved that PLA-*b*-PEG-*b*-PLA RIBS had the required *in vitro* degradation characteristics to secure the biliary anastomosis in liver transplantation. *In vitro* results will be used as a guideline for planning later *in vivo* studies.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Ce chapitre a permis d'étudier les propriétés mécaniques et physico-chimiques du RIBS PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ au cours de la dégradation *in vitro* dans un milieu biliaire simulé. Aucune influence du pH en termes de cinétique de dégradation n'a été mise en évidence entre les 2 groupes (pH « témoin » à 7,2 et pH « biliaire » à 8,4). Cette étude a permis de valider les éléments suivants du cahier des charges : une dégradation complète en 6 mois sans macro-particules, une imperméabilité pendant minimum 4 semaines, une conservation des caractéristiques mécaniques pendant 8 semaines.

Néanmoins, cette étude ne permet pas de répondre à toutes les exigences du cahier des charges. La biocompatibilité, la stérilisation, l'élasticité compatible avec l'implantation, ou encore la visibilité radiologique seront traités dans le chapitre IV.

Les analyses mécaniques réalisées dans cette étude concernent uniquement la structure (c'est à dire le RIBS mis en forme) et non le matériau en lui-même. La caractérisation du comportement mécanique du matériau au cours de la dégradation, à partir d'éprouvettes de traction normalisées, sera réalisée dans le chapitre IV.

Nous avons considéré dans ce chapitre que la perte des propriétés mécaniques du RIBS survenait à partir du moment où les tests n'étaient plus réalisables à cause de la trop grande fragilité du matériau. Les propriétés mécaniques du matériau changent au cours du temps, et il est difficile d'établir une limite à partir de laquelle considérer que le RIBS n'aura plus d'effet mécanique sur la voie biliaire, c'est à dire qu'il ne permettra plus d'éviter les sténoses en calibrant l'anastomose biliaire. Afin d'appréhender le comportement synergique de la voie biliaire et du RIBS, l'étude du comportement mécanique de la voie biliaire s'avère nécessaire. Ce sera l'objet principal du chapitre suivant.

CHAPITRE III

ÉTUDE BIOMÉCANIQUE DE LA VOIE BILIAIRE

CHAPITRE III : ÉTUDE BIOMÉCANIQUE DE LA VOIE BILIAIRE

INTRODUCTION DU CHAPITRE III

Après avoir étudié le comportement mécanique du RIBS, et dans l'optique de son implantation chez l'homme, l'étude du comportement mécanique de la voie biliaire nous paraissait indispensable, d'autant qu'il n'existe que très peu de données sur le sujet dans la littérature. Un des points importants du cahier des charges du RIBS est le maintien des propriétés mécaniques. Une fois implanté, il doit exercer sur la voie biliaire une contrainte suffisante pendant 8 semaines pour éviter une cicatrisation sténosante de l'anastomose. Il est donc nécessaire d'évaluer la réponse mécanique de la voie biliaire à un stimulus afin d'appréhender le comportement synergique du RIBS et de la voie biliaire. Par analogie avec les expressions *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, le terme *in silico* a été introduit pour qualifier les méthodes mises en œuvre pour réaliser des simulations numériques centrées sur la biologie. Il s'agirait donc dans notre cas, à partir de la caractérisation expérimentale, de réaliser une modélisation numérique du comportement mécanique de la voie biliaire. Dans la démarche du développement de notre dispositif, il nous paraissait important d'intercaler cette partie *in silico* entre les études *in vitro* et *in vivo*. Nous avons donc réalisé la caractérisation expérimentale de la voie biliaire.

Afin de pouvoir interpréter les données expérimentales mécaniques, et dans l'optique de la modélisation, la connaissance de la microstructure de la voie biliaire est importante. N'ayant que peu d'informations disponibles dans la littérature, le premier objectif de cette étude était de décrire cette microstructure à partir d'observations histologiques.

De toute évidence, l'expérimentation sur des tissus humains *in vivo* est impensable pour des raisons éthiques, et l'utilisation de pièces anatomiques, c'est-à-dire les tissus humains post mortem, est une alternative. Les expérimentations sur tissus frais sont non seulement difficiles, mais les résultats ne sont souvent pas reproductibles, à cause de l'imprévisibilité des dons de corps, ainsi que du délai légal et moral entre le décès et l'arrivée au laboratoire d'anatomie pour expérimentation. Différents procédés de conservation sont couramment utilisés dans les

laboratoires d'anatomie, tels que la congélation ou la formolisation, afin d'éviter la dégradation des tissus avant les expérimentations. Néanmoins, les propriétés mécaniques des tissus mous sont affectées par ces procédures de conservation. Afin d'appréhender au mieux le comportement mécanique de la voie biliaire humaine à partir de pièces anatomiques, l'objectif de notre travail était également de comparer les différents procédés de conservation et d'étudier leur impact sur les propriétés mécaniques.

Le troisième chapitre est donc un prérequis à une étude *in silico*, de modélisation du comportement mécanique de la voie biliaire et du comportement synergique lors de l'implantation de la prothèse. Nous avons décrit la microstructure de la voie biliaire humaine au moyen d'une analyse histologique. Puis nous avons caractérisé le comportement mécanique de la voie biliaire humaine et l'impact de différents processus de conservation des tissus mous humains.

Ce chapitre est un projet d'article :

E. Girard, G. Chagnon, J-C. Vial, J. Boutonnat, E. Gremen, M. Calvez, M. Dalecky, B. Hodaj, B. Nottelet. *Biomechanical behaviour of human bile duct wall and impact of cadaveric preservation processes.*

1. INTRODUCTION

In the field of biomedical engineering and surgical areas, the understanding of the mechanical macroscopic behavior of human soft tissues is primordial in order to design and develop novel treatment solutions. Nowadays, different *in vivo* characterization methods exist. Some have the benefit of being noninvasive, such as elastography which estimates the elasticity of the tissue [246]. Other techniques, like nano-indentation [247] or aspiration devices [248], are a bit more invasive. These methods, however, only allow for simple tests, unlike the classical *ex vivo* characterization which allows the observation of more complex behaviors, like large strain deformations or viscoelasticity.

Obviously, experimentation on *in vivo* human tissues is unthinkable for ethical grounds, and animal testing is increasingly difficult both in terms of logistic and ethics reasons. Use of anatomical pieces, i.e. post mortem humans tissues is an alternative to the above experimentations. However, the inconsistency and unpredictability of the donated bodies, as well as time between tissues sampling and mechanical experiments play against us. Not only is the experiment on fresh tissues difficult but the results are often not reproducible. Difficulty on fresh soft tissues *ex-vivo* experimentations is that mechanical properties changes over time [249]. Different preservation processes are commonly used in anatomical laboratory such as freezing and embalming, in order to avoid tissue degradation before experimentation [250,251]. Mechanical properties of soft tissues are affected by these preservation procedures [251,252].

The bile duct system is divided into intrahepatic and extrahepatic bile ducts. Human extra-hepatic bile duct tract is responsible for transporting, storing and releasing bile into the digestive tract to aid digestion of fats [253]. In terms of histological and morphological description, most of the biliary tract has already been investigated, i.e. the intra-hepatic bile ducts, the gallbladder [254], the sphincter of Oddi and the cystic duct. The data concerning the extrahepatic main duct are scarce. Bile duct is lined by a single layer of columnar cells and its wall consists of intermixed dense fibrous tissue, elastic and collagen fibers in different proportion [249,255,256], and muscle fibers in low quantity [257,258].

Diseases of the bile duct system rank third in the diseases of the digestive system after surgery. There is a close relationship between the mechanical performance of the bile duct and its physiological function. Also, most pathologies, such as biliary lithiasis, cirrhotic liver, cholestasis and cholangitis, are treated using medical devices that interact with the bile duct. Therefore, knowledge of its mechanical behavior can improve the design of such devices.

The mechanical behavior of most tissues and organs has already been extensively studied [259], but data on extra-hepatic main biliary tract remains scarce. Several studies on the modeling of the human biliary system have been carried out. This is mostly bile rheology or bile fluids dynamics studies [260,261]. The focus is usually given on the properties of the gallbladder or cystic duct [253,261,262]. To the authors' knowledge, a single study by Li et al [254] provides data of biomechanical properties of human main bile duct. They studied compliance of cadaveric human bile duct by performing pressure tests. Apart from that, there are no experimental data available for mechanical behavior of the human extra-hepatic main biliary duct wall at the present time. All the other available data were produced on animals, on canine or porcine models [263,249,264,254]. The similarities between the human and the porcine bile duct were studied [254], and it was concluded that the pig's bile duct properties match that of the human.

The aims of this study were, on the one hand, to observe the microstructure of the human bile by means of histological analysis, on the other hand, to characterize the mechanical behavior and describe the impact of different preservation processes using comparative experimental tensile tests. The results of the mechanical tests are discussed and explained using the micro-structural observations.

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1. Anatomical description of extrahepatic biliary tract

The biliary tract emerges from the liver and finishes with the major duodenal papilla. In the liver, the bile canaliculi merge into the segmental bile ducts. The left and the right hepatic duct unite merge into the common hepatic duct. A common distinction is made between intra- and extra-hepatic bile ducts. **Figure III-1** represents an anatomic specimen of extrahepatic biliary tract after dissection (A) with an illustration of the corresponding parts of extrahepatic bile ducts (B). The extrahepatic bile duct starts right under the hepatic hilum. The gallbladder is located under the liver. From its medial side arises the cystic duct, which merges with the common hepatic duct to become the common bile duct. Gallbladder and the cystic duct form the accessory bile duct. The main bile duct includes common hepatic duct and common bile duct.

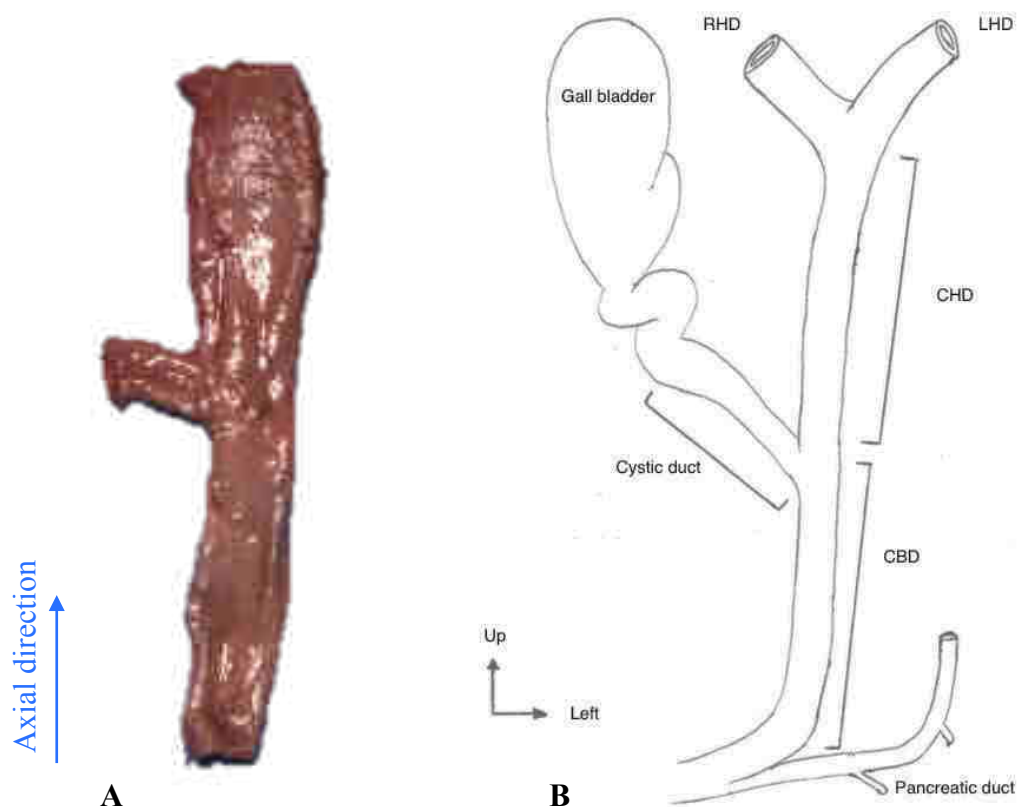


Figure III-1: A. Anatomic specimen of extrahepatic biliary tract after dissection; B. Illustration of the corresponding parts of extrahepatic bile ducts.
RHD: right hepatic duct; LHD: left hepatic duct; CHD: common hepatic duct; CBD: common bile duct.

2.2. Sample extraction and methodology

Cadavers were selected for anatomical dissection from the Anatomy laboratory, faculty of medicine, Grenoble, France (LADAF - Laboratoire d'Anatomie Des Alpes Françaises). This study was performed in compliance with French regulations on postmortem testing, and the protocol was approved by a local scientific committee of the Grenoble-Alpes University. In order to compare the different preservation process, three random groups were made, with frozen cadavers in the first group (G1), embalmed cadavers in the second group (G2) and fresh cadavers in the third group (G3). In the G1, cadavers were immediately entirely frozen on arrival to the LADAF. Cadavers randomized in G2 were embalmed with a formalin solution (ARTHYL[®]) injected into the carotid artery and drained from the jugular vein (9 L with a formaldehyde concentration of 1.3 %), and then preserved in a refrigerated room at 4°C. For G3, samples were collected on fresh cadavers immediately after their arrival in the LADAF. A maximum period of 48h was tolerated between the date of death and the biomechanical tests.

Preservation time is that between the beginning of the preservation process and the mechanical tests.

The main peritoneal cavity was approached by a right subcostal incision. A section of the falciform ligament was realized if necessary. The hepatic pedicle was opened and its components separated. Then the biliary tract was severed in three spots: the cystic duct, the common bile duct upstream of the major duodenal papilla, and the hepatic duct downstream of intrahepatic bile ducts junction.

Our study includes 12 anatomical dissections, without apparent hepato-biliary pathology, aged between 56 and 104 years (mean age 83 ± 6 years). Nine of the extracted samples were used for mechanical testing; demographical statistics are represented in **Table III-1**. Three samples were included in paraffin for histological observations.

	Frozen (G1)	Embalmed (G2)	Fresh (G3)	p
Men	1/3	2/3	1/3	0,67
Age (years)	88 ± 14	88 ± 8	76 ± 20	0,32
BMI ($kg.m^{-2}$)	20 ± 2	18 ± 1	19 ± 2	0,33
Preservation time (hours)	84 ± 62	90 ± 27	-	0,88

Mean \pm standard deviation. BMI: Body Mass Index. Preservation time is that between the beginning of the preservation process and the mechanical tests.

Table III-1: Demographical statistics on cadavers used for mechanical experiments

2.3. Histology

Three common bile duct removed on fresh cadavers were chosen for histological analysis. Axial and orthoradial sections of 1 cm on all samples were performed in the middle of the common bile duct. Samples were conserved in formaldehyde, fixed first in formalin 10% during 24 hours at 4°C and then embedded in paraffin according to usual protocol [265]. Sections of 3 μ m were then realized with a microtome Leica RM 2245 (Wetzlar, Germany). The slides were then stained with Hematoxylin Eosin Saffron (HES) to see nucleic acids and connective tissue (amongst other collagen), or with Orscein staining to highlight elastin fibers. An immunohistochemistry staining against α smooth muscle actin was also performed in order to visualize the muscle layer. Sections were dewaxed, rehydrated, and the antigen retrieval

was performed with a preheated protease. Antibody binding was detected using the ultraView Universal DAB Detection kit (Automate Benchmark XT IHC/ISH (ROCHE-VENTANA) 760-500) and 3,3-diaminobenzidine (DAB) as chromogen. Slides were then examined qualitatively by light microscopy focusing particularly on elastin and collagen fibers' orientation. Pictures were acquired by a digital camera (Leica Microsystems) connected to an optical microscope (Leica Microsystems).

2.4. Mechanical tests

Samples were tested as soon as possible after explantation, during which they were preserved in a saline solution. A maximum period of 48h was tolerated between the date of death and the biomechanical tests. Tests were carried out by means of a GABO Eplexor 500N mechanical test machine. In order to respect physiological experimental conditions, an experimental thermo-regulated tank filled with 0.9% sodium chloride solution was designed, it was previously presented in *Breche et al* [148]. The saline solution was heated to a temperature of $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

The bile duct was cut and unraveled along its axial direction, as illustrated in **Figure III-2 A**. Rectangular specimens of 48.2 ± 0.3 mm width, 0.5 ± 0.1 mm thickness and 10 mm height were gathered from the main bile duct along the axial directions, and 20.9 ± 0.4 mm width, 0.5 ± 0.1 mm thickness and 10 mm height for the orthoradial direction, as shown in **Figure III-2 B**. The samples were mounted in a rigid structure containing clamps outside the tank in order to ensure a consistent geometry for the samples, i.e., a fixed height of 2 mm and a width large enough (≥ 20 mm) so that the samples stay rectangular throughout the tests. **Figure III-2 C** shows the rigid clamps-sample assembly which was then transferred into the testing apparatus. During the test, it is supposed that the sample stays rectangular and border effects are neglected [266]. The test is described by the deformation gradient tensor $\bar{\bar{F}}$. Non-porous soft tissues are classically considered incompressible [267], which translates into $\det(\bar{\bar{F}})=1$. This implies that in planar tension condition $\bar{\bar{F}}$ can be written as:

$$(1) \quad [\bar{\bar{F}}] = \begin{bmatrix} \lambda & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{\lambda} \end{bmatrix}$$

where $\lambda = \frac{l}{l_0}$ is the stretch (l and l_0 are the current and initial height of the specimen). Each sample underwent a cyclic planar tension test consisting of a series of loading and unloading phases then a loading until rupture at a constant strain rate of 5.10^{-3} s^{-1} . For axial direction

tests, 2 cycles at 5% strain followed by 2 cycles at 10% strain were realized. For orthoradial direction tests, 2 cycles at 20% strain were realized. The tests are analyzed by measuring the nominal stress defined as:

$$(2) \quad \Pi = \frac{F}{A_0}$$

where F is the force and A_0 the initial cross section.

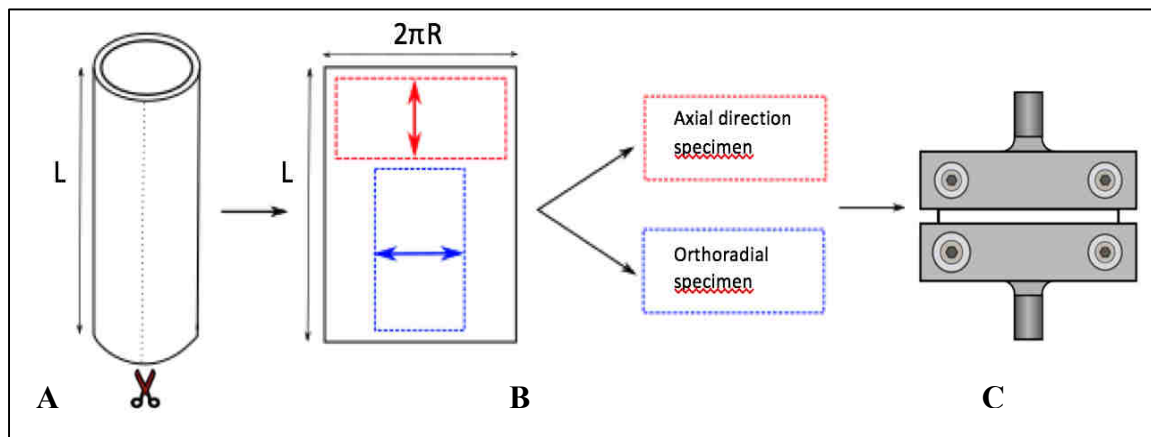


Figure III-2: A. Bile duct cut along its axial direction. B. Planar tension specimens gathered from the unfolded bile duct. C. Specimen inserted in the clamps before transfer into the thermostatic tank.

2.5. Statistical analysis

Evidently, due to the nature of the present work based on post-mortem studies, the number of samples is limited for statistical analysis, but sufficient to ensure reproducibility. All data are presented as mean \pm standard deviation. We compared continuous variables using the Mann–Whitney test or an ANOVA test for more than two modalities, and categorical variables using the Fisher exact test. A difference was considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Histological analysis

Starting from the lumen to the outer diameter of the tissue in the orthoradial plane, the bile duct is composed of four layers shown in **Figure III-3-5**: the mucous layer numbered 1, corresponding to a simple cylindrical epithelium measuring approximately 20 μm . Beneath a lamina propria (chorion), corresponding to submucosal connective tissue divided into internal submucosal layer, numbered 2, and external submucosal layer, numbered 3, of 60-80 μm thick for each. Everything is surrounded by an adventitia, numbered 4, composed of loose conjunctive tissue containing vascular and nervous axes.

On HES staining (**Figure III-3**), cells were purple stained (dark purple for nucleus, light purple for cytoplasm). Bordering the lumen, the simple columnar epithelium was abraded. In the submucosal connective layer cells visualized corresponding to fibroblasts or lymphoid cells with a predominant distribution right under the basement membrane. Smooth muscle fibers were pink stained on HES. They had a specific orientation with a different distribution in the submucosal layers. On the axial section (**Figure III-3 AB**), they had a predominant distribution on the internal submucosal (layer 2), with longitudinal orientation. On the orthoradial section (**Figure III-3 CD**), fibers had a predominant distribution in the external submucosal (layer 3), with a transversal orientation. Concerning the conjunctive tissue, collagen fibers were orange stained on HES. They had a uniformly distribution in the lamina propria layer without specific orientation, whatever the section. The adventitious layer contained very thick collagen fibers with a predominant longitudinal orientation.

The orcein staining enabled the visualization of the elastic fibers (deep blue) as illustrated in **Figure III-4**. These orcein stained sections confirmed the muscle fibers distribution in submucosal layers. Fibers were oriented longitudinally in the internal layer and transversely in the external layer, with a greater proportion of longitudinal fibers. Geometrically, although the angle of orientation of the fibers of the different layers in relation to the axis of the lumen was difficult to measure. However, it appears that the transverse and longitudinal elastic fibers are orthogonal.

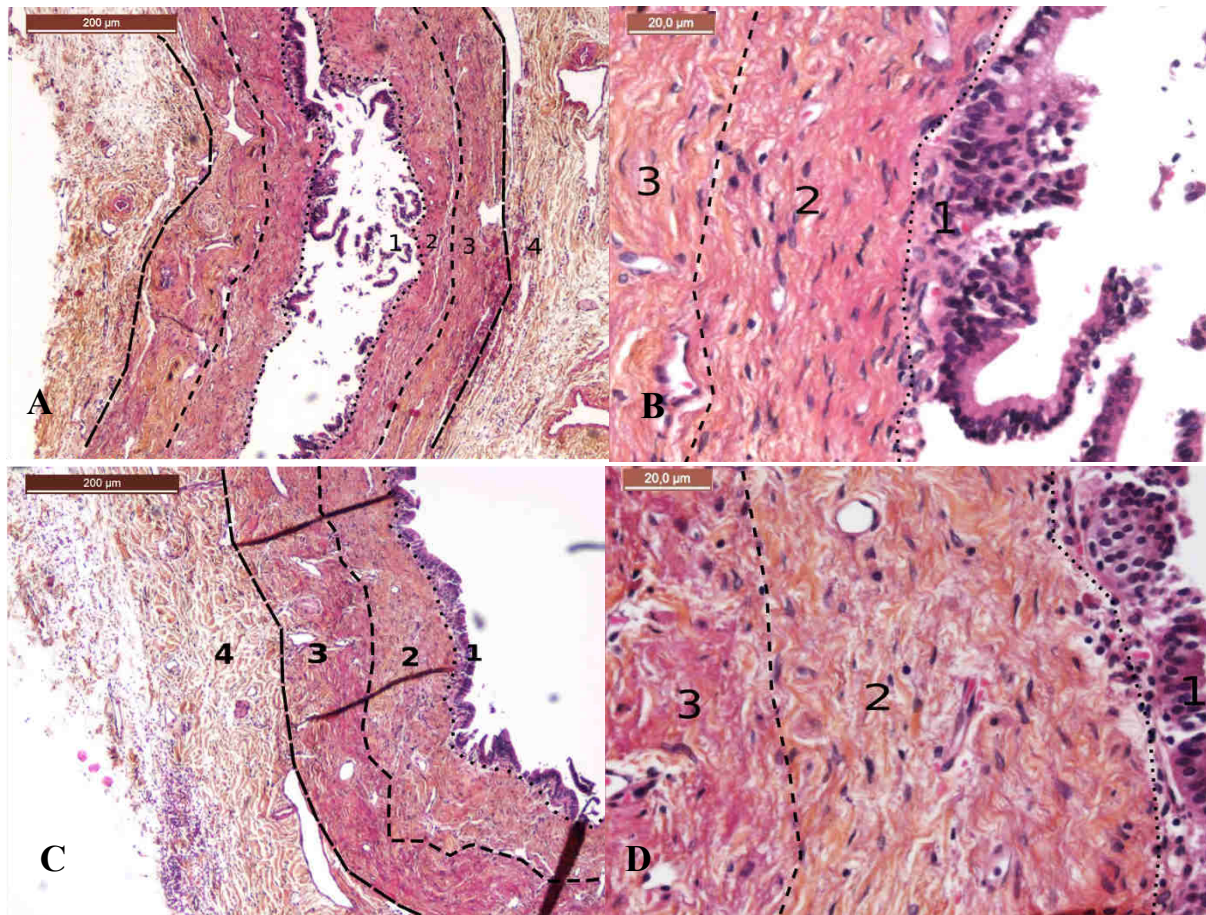


Figure III-3: HES staining.

A: axial section $\times 4$; B: axial section $\times 20$; C: orthoradial section $\times 4$; D : orthoradial section $\times 20$. Layers: epithelium (1), lamina propria with internal submucosa (2) and external submucosa (3) and adventitia (4).

Cells were purple stained (dark purple for nucleus, light purple for cytoplasm). The collagen was orange stained, composed submucosal and adventitial layers without specific organization. Smooth muscle fibers were pink stained. They had a specific orientation with a different distribution in the submucosa layers.

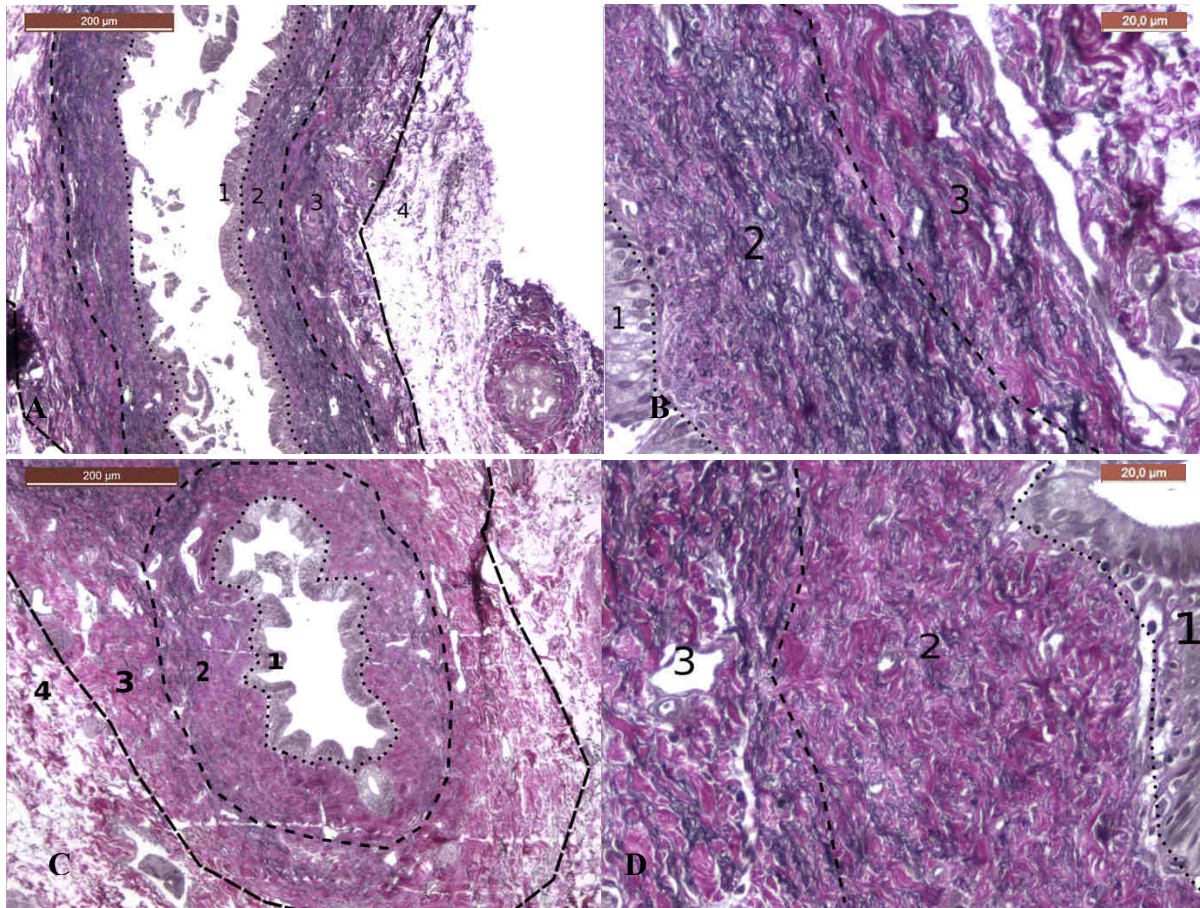


Figure III-4: Orcein staining.

A: axial section $x4$; B: axial section $x20$; C: orthoradial section $x4$; D : orthoradial section $x20$. Layers: epithelium (1), lamina propria with internal submucosa (2) and external submucosa (3) and adventitia (4).

Elastic fibers were deep blue stained. Fibers were oriented longitudinally in the internal layer and transversely in the external layer, with a greater proportion of longitudinal fibers.

The immunohistochemistry enabled the smooth muscle cells visualization in brown presented in **Figure III-S1**. This slide confirmed the scattered of muscle fibers distribution in submucosal layers, and their absence in the adventitia.

Histological observations are resumed in the 3D illustration **Figure III-5**.

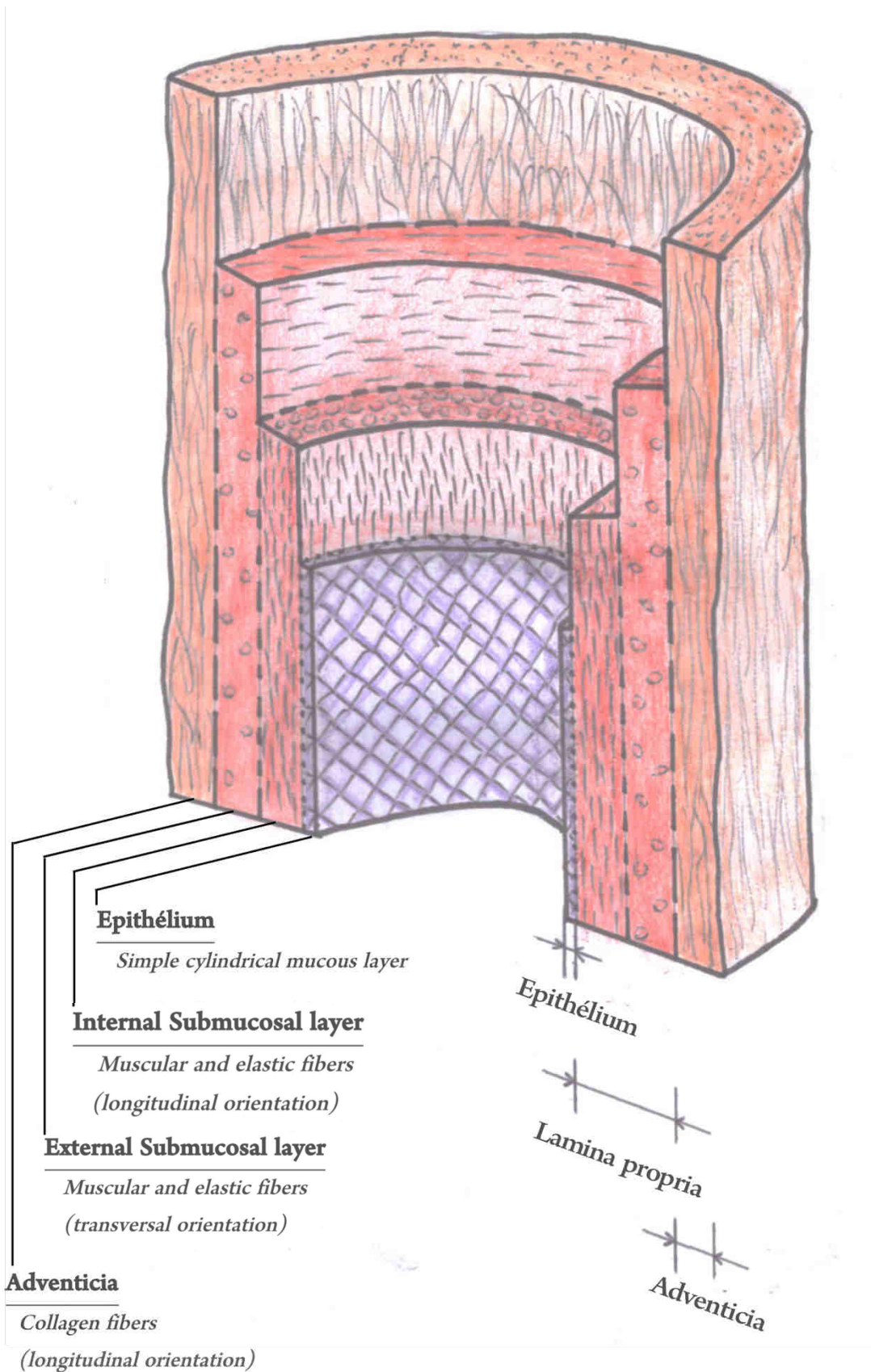


Figure III-5: 3D illustration of the main bile duct. Only the 4 main layers are represented along with the main fiber directions.

3.2. Mechanical behavior

3.2.1. Description of the experimental curves.

Histological observations proved that specimens were cut in the symmetry axes of the materials, ensuring that the planar tensile test hypotheses were respected. The **Figure III-6** compared the results of planar tension tests in the three studied groups (*G1: frozen group*, *G2: embalmed group*, *G3: fresh group*), for both directions. Only one representative result is presented in each figure as the results on the different anatomical dissections were very close. By observing the first loads only, tissues present a nonlinear response to an applied strain with a strain hardening at large deformation, which is typical of a soft tissue. A hysteresis is observed, highlighting the viscoelastic behavior of the bile duct. Considering two successive loading cycles, a stress softening can be observed between the first and second loading.

Residual strain is also observed after each cycle, it is characterized by stress reaching zero while strain was still positive. This residual strain increases with the maximum strain applied to the material throughout the cycles.

No conclusions could be deduced on the possibility to recover this residual strain due to the limited number of specimens. It is important to note that the value of the stress lower than 0 should not be trusted as the specimen was compressed and local buckling occurs. Whatever the group, the bile duct presents a stiffer mechanical behavior in the axial direction compared to the orthoradial one. This anisotropy is well visualized on **Figure III-S2**, which compared results for both planar tension test directions of the common hepatic duct, for the fresh group. The ratio between stresses for both directions gives an idea about anisotropy, this ratio is about 3 for G1 and G2 group but is largely greater for the G3 group and is largely increasing with strain increases.

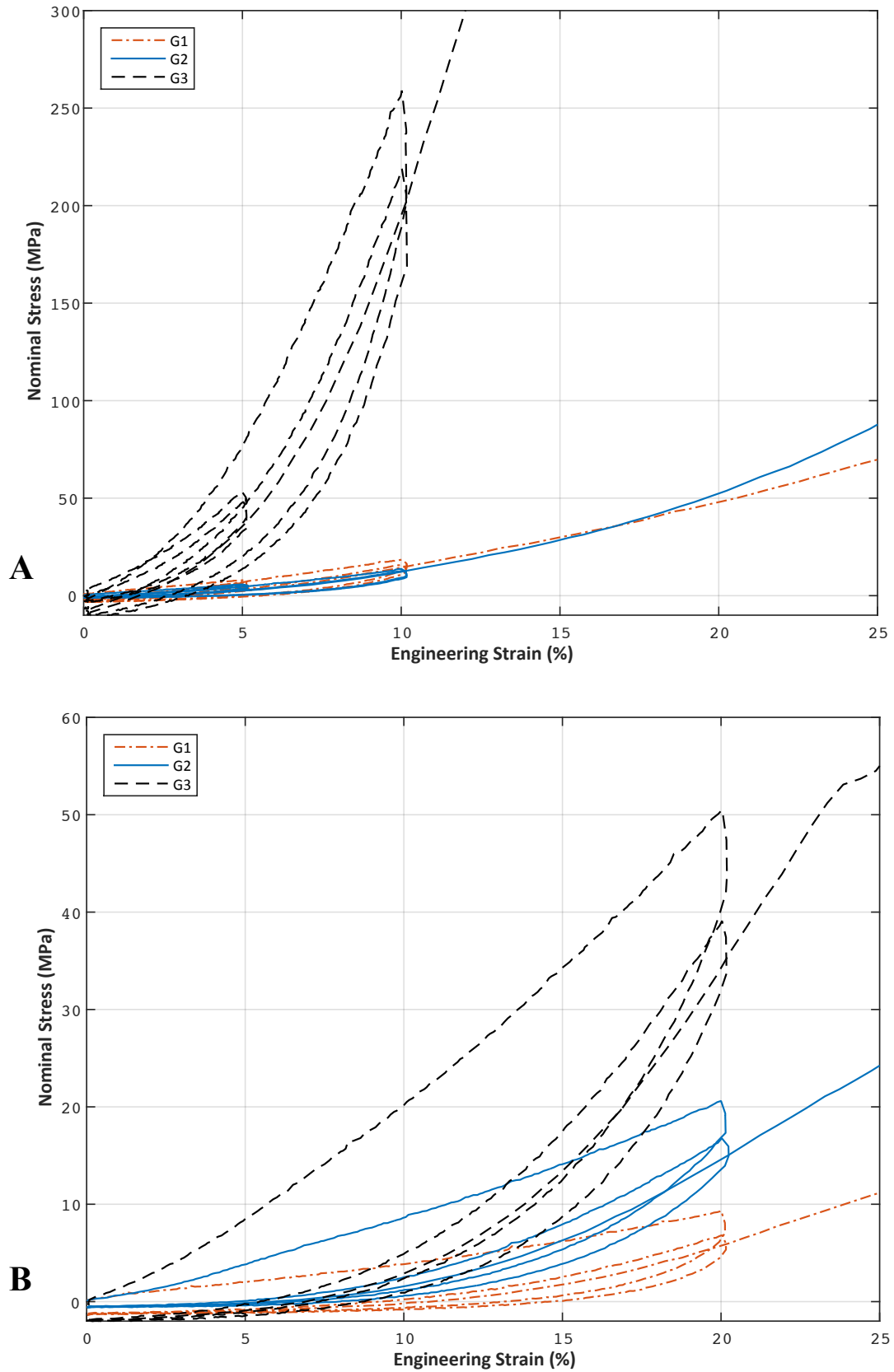


Figure III-6: Experimental results of planar tension tests in the 3 studied groups for both directions. A: axial direction, B: orthoradial direction.

3.2.2. Comparison of the three groups

Different quantities were measured and calculated according to the curves of figure 6. The slope of the curves (engineering stress - engineering strain) were evaluated, corresponding to the local elastic modulus of the tissue. They were calculated during the loads and the unloads on a 2 percent long interval. All these slopes were evaluated for the three groups (G1, G2 and G3) and for the two directions (orthoradial and axial), they are summarized in the **Tables III-2 and III-3** and illustrated in **Figures III-7 and III-8**.

The observations are different according to the direction of the loading. In the axial direction, it appears that the values are very closed for the G1 and G2 groups but are far from the G3 group, the values are different from a factor 3 to 10. In the orthoradial direction, the G1 and G2 groups are different and also far from the G3 group, the ratio is not so important as in the axial direction.

The energy dissipated in the hysteresis cycle is evaluated for the different tests, the values are summarized in the **Tables III-2 and III-3** and illustrated in **Figure III-7 and III-8**. As for the values of the stress, the energy dissipated for the G1 and G2 group is largely weaker than the G3 group. The effects are here more important in the axial direction than in the orthoradial one, but they are strongly affected by the preservation conditions.

Axial	1st load		1st unload		2nd load		3rd load	3rd unload	4th load	Hysteresis
	0-2%	2-4%	0-2%	2-4%	0-2%	2-4%	8-10%	8-10%	8-10%	
G1	6,03	5,86	2,27	5,26	4,33	6,79	11,26	15,88	12,97	121,91
(Frozen)	(2,79)	(3,75)	(1,02)	(2,77)	(1,68)	(3,61)	(10,45)	(12,47)	(10,81)	(52,20)
G2	5,69	6,21	2,86	5,59	4,54	6,76	11,39	15,73	14,08	129,51
(Embalmed)	(2,33)	(4,00)	(2,07)	(3,29)	2,80)	3,62)	(6,50)	(7,94)	(7,38)	(69,90)
G3	19,50	37,46	8,91	28,58	16,31	37,17	132,72	160,29	151,87	846,47
(Fresh)	(14,78)	(37,04)	(6,57)	(28,18)	(13,16)	(36,47)	(170,47)	(199,24)	(196,88)	(977,16)

Mean (standard deviation) (kPa)

Table III-2: Modulus and hysteresis for 3 comparative groups experimental planar tension tests in axial direction.

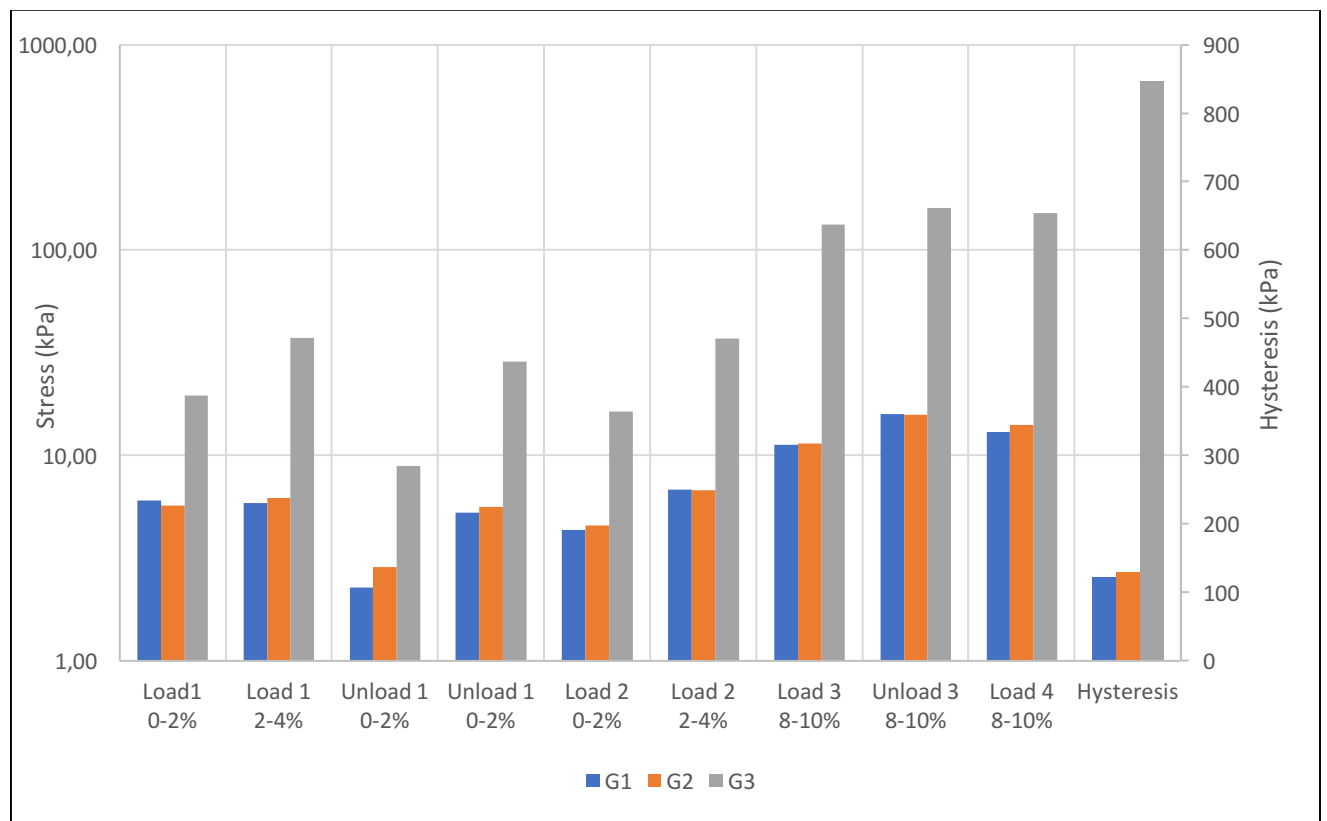


Figure III-7: Modulus representation for 3 comparative groups experimental planar tension tests in axial direction.

Orthoradial	1st load			1st unload			2nd load			Hysteresis
	0-4%	4-8%	16-20%	0-4%	4-8%	16-20%	0-4%	4-8%	16-20%	
G1	1,27	1,33	1,89	0,21	0,40	3,77	0,36	0,62	2,75	74,52
(Frozen)	1,08	1,18	1,51	0,24	0,45	3,10	0,35	0,61	2,24	58,74
G2	1,90	2,74	3,91	0,20	0,59	7,00	0,38	1,00	5,31	121,30
(Embalmed)	2,69	3,79	4,96	0,14	0,62	9,47	0,28	1,23	6,69	163,01
G3	3,21	4,27	6,57	0,26	0,77	11,87	0,50	1,35	9,15	198,10
(Fresh)	3,02	4,65	5,68	0,28	0,99	10,87	0,53	1,59	8,05	173,69

Mean (standard deviation) (kPa)

Table III-3: Modulus and hysteresis for 3 comparative groups experimental planar tension tests in orthoradial direction.

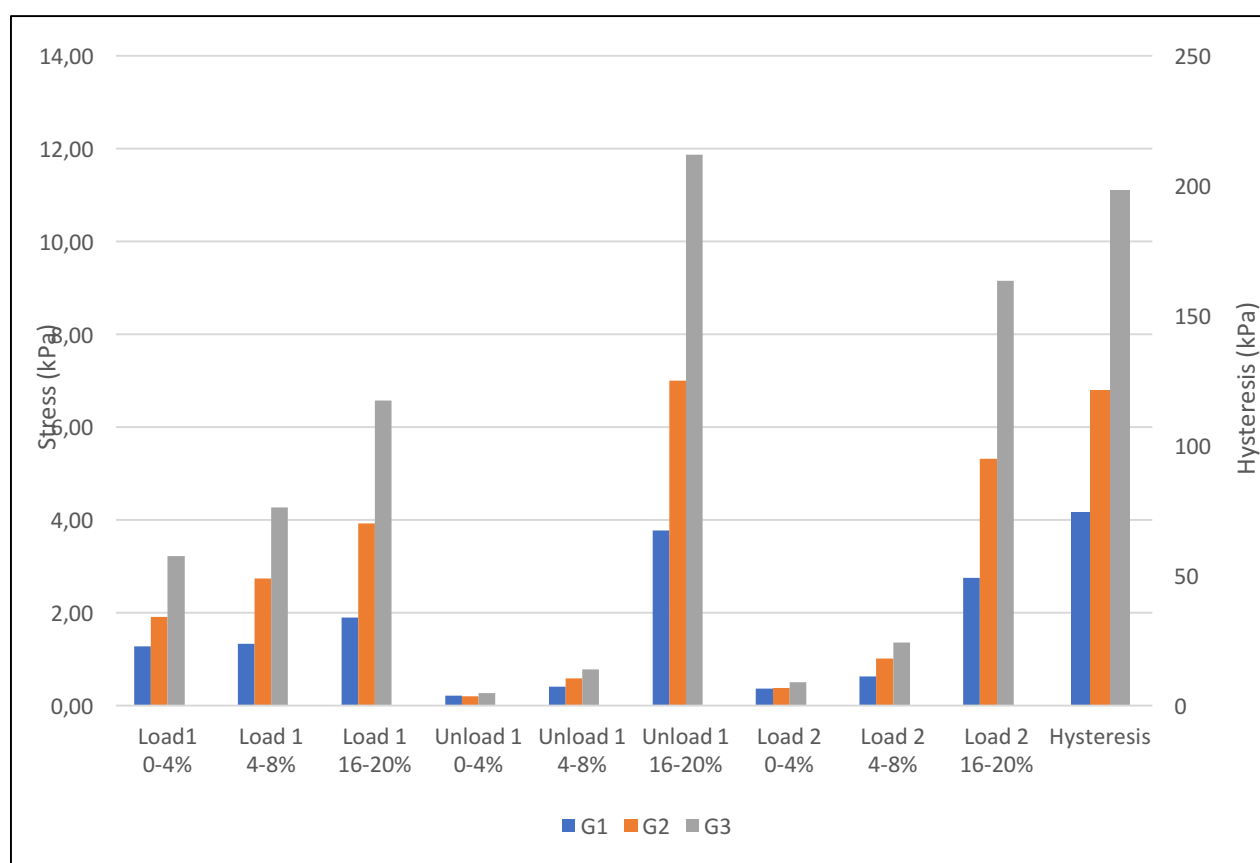


Figure III-8: Modulus representation for 3 comparative groups experimental planar tension tests in orthoradial direction.

4. DISCUSSION

As evocated before, only few studies have analyzed the mechanical behavior of the human bile duct. The objectives of this work were therefore to characterize the mechanical behavior of the human bile duct and to test different preservation conditions.

At first, a histological study was made in order to observe structure and orientation of the different components involved in main bile duct. Histological observations allowed mechanical tests interpretation. Globally, 3 types of fibers were to be differentiated because of their different mechanical properties, elastic fibers, muscular fibers and collagen fibers. The collagen fibers have a distribution in the lamina propria layer without specific orientation, but with an increasing centrifugal gradient density. Variously, the adventitia is exclusively composed by collagen fibers, mainly longitudinally oriented. Muscle fibers are present only in the lamina propria layer with a different orientation according to the sub-layers. They were oriented longitudinally in the internal sub-layer and transversally in the external layer with a greater proportion of longitudinal fibers. As muscle fibers, elastic fibers are present only in the lamina propria layer, with the same orientations, but with a different distribution according to the sub-layers. There is a greater proportion of longitudinal elastic fibers on internal submucosal layer compared to external submucosal layer.

Anisotropic behavior of main bile duct can be correlated with histological observations. The stiffer mechanical behavior in the axial direction compared to the orthoradial one corresponded to the longitudinal orientation of the collagen fibers in the adventitious layer. Collagen provides tissues with tensile strength to resist deformation [268]. Conversely, elastic fibers provide tissues with elasticity to withstand repetitive stress [268]. The general behavior of the main bile duct in both directions can be explained by its physiological functions. The main bile duct stores the bile which is secreted continuously by the liver, to expel it only a few times a day during meals. During this storage period, main bile duct endures large radial distension, with an increased pressure in, which can explain its softer behavior in this direction [254,269]. This anisotropic behavior confirms the results of Li et al. obtained by performing pressure tests [254].

Different preservation conditions were tested on biliary duct, the objective was to compare the values obtained after freezing or embalming in comparison to fresh specimens. The conclusions are summarized in **Table III-4**. The use of a preservation process, even if it

permits to keep the form of the organs, has important effects on the fiber structure of the biliary duct. Preservation process does not modify the shape of the mechanical response; however, they do not faithfully reflect biomechanical characteristics of fresh specimens. In this case, the mechanical properties are lost about 80% in the axial direction and 40 to 60% in the radial direction. The influence is more important in the axial direction because the collagen fibers, mainly present in the longitudinal orientation, are more impacted. This is confirmed by hysteresis differences, that mainly increased for fresh tissues in the axial direction.

		Modulus		Hysteresis
		Relative variation means	Relative variation Standard deviations	
<i>Relative variation</i>	<i>Direction test</i>	%	%	%
G1 / G3	Axial	82,0	8,3	85,6
	Orthoradial	54,2	19,1	62,4
G2 / G3	Axial	81,0	9,0	84,7
	Orthoradial	33,2	8,2	38,8

Table III-4: Relative variation of modulus and hysteresis means, for G1/G3 and G2/G3, in both directions.

Even if the two processes of preservation are different, they both affect the fiber network. The mechanical effects of embalming on connective tissues are complex, since on one hand the tissues are likely softened by partial denaturing of the collagen, while on the other hand, there are also effects of collagen cross-linking due to the formalin embalming solution [270]. The effects of collagen denaturing probably predominate over those of the formalin cross-linking. Muscle fibers modifications were also observed after embalming [271]. A fragmentation of the muscle proteins, probably caused by embalming solution, could explain the suppleness of the BD. Biomechanical studies on different tissues after embalming find echo to our, showing reduced mechanical performance of bone [272] or tendons [270] and a loss of 80 to 96% of the mechanical properties for the spine [273].

For preservation by freezing, the reasons are different but the mechanical properties modifications are also present. Regarding microstructural modifications, the mean diameter of collagen fibrils and the fibril non-occupation mean ratio are increased, while the mean number of fibrils decreased [274]. Mechanical changes related to freezing appear to affect different organs; tendons and bones in the first place [251,274].

The results in the literature are nevertheless discordant, with several studies that demonstrate a stiffening related to embalming [252,275,276], and identical properties between fresh and frozen specimens tests [277,278]. The problem is that studies are not standardized, making comparison difficult. The results may change depending on many factors: the type of tested tissues, the embalming protocol, the freezing or defrosting protocols, the experimental conditions, the delay before experimentation, etc. The different studied tissues also differently respond to the embalmed, because the formalin solution penetration is different according to the tissues. When a cadaver is arterially perfused, highly vascular skeletal muscle will be more readily penetrated than less vascular bone, tendon or bile duct. The standardization of embalmed protocol could avoid inter studies variations. Indeed, the injected formalin quantity, the formalin concentration or the injection technique could modify the properties. Colman et al. recommended a minimal formalin concentration between 0.5 and 0.75% [279]. It was respected in this study, with an injection of 9L of solution for 500ml of formaldehyde (25%) at final concentration of 1.3%, that means only half of total volume could be used in others studies [280], knowing that a too high concentration can also damage the tissues.

Defrosting protocol was also important. For example, Cartner and al. [281] demonstrated that the physical properties of bone may be detrimentally affected in biomechanical testing that exceeds the 50-hour time point after removal from the freezer. However, to our knowledge, there is no standardized protocol in the literature. For the future, it will be interesting to determine the mechanical behavior impact of defrosting variations on the tissues. Mechanical properties depend on hydration state, with stiffening with drying [282]. In our study, all the tissues were preserved from dehydration by plunging them as far as possible into a physiologic solution. Experimentation were also realized in physiologic conditions, in a thermostatic immersed tank.

The present study has several limitations. First, in this study only samples from elder people have been analyzed. It is known that biological tissues lose water and collagen with age [283], and therefore, their mechanical properties can be affected, so, a wider experimental test with higher range of ages should be performed to drive non-age dependent conclusions. Secondly, the biliary tissues are in contact with the bile, which is responsible for a postmortem deterioration of the surrounding tissues. Mechanical properties on biliary tract changes over time with tissue deterioration [249]. Even though we have limited all delay between death and testing, the fact that they are not similar between the 3 groups induces a bias. Thirdly, the delay between death and the cadaver arrival in the laboratory is a limit that cannot be avoided because of the current legislation. To avoid this bias from impacting our study, cadavers must be treated less 48 hours after the death. Finally, there is a variability from different experimental data, fact that can be related with the different individual's samples. Therefore, more samples would be necessary to draw more accurate conclusions.

5. CONCLUSION

This study investigated the mechanical behavior of main bile duct and compare the impact of different preservation processes. After a histomorphological analysis of the tissue, a mechanical study in a controlled environment consisting of cyclic tests was made. The results show an influence of the loading direction, which is representative of an anisotropic behavior. A strong hysteresis due to the viscoelastic properties of soft tissues was also observed. This study confirmed that embalming and freezing preservation methods had an impact on the biomechanical properties of human main bile duct. That may further provide a useful quantitative baseline for anatomical and surgical training using embalming and freezing. Our work may improve our understanding of the mechanical properties of the main bile duct and will allow us in a further study to reproduce the bile duct behavior in computational models. That can help the digestive surgeon to detect anomalies and, when necessary, to choose the appropriate type of prosthesis in function of the specific patient.

6. SUPPLEMENTARY DATA

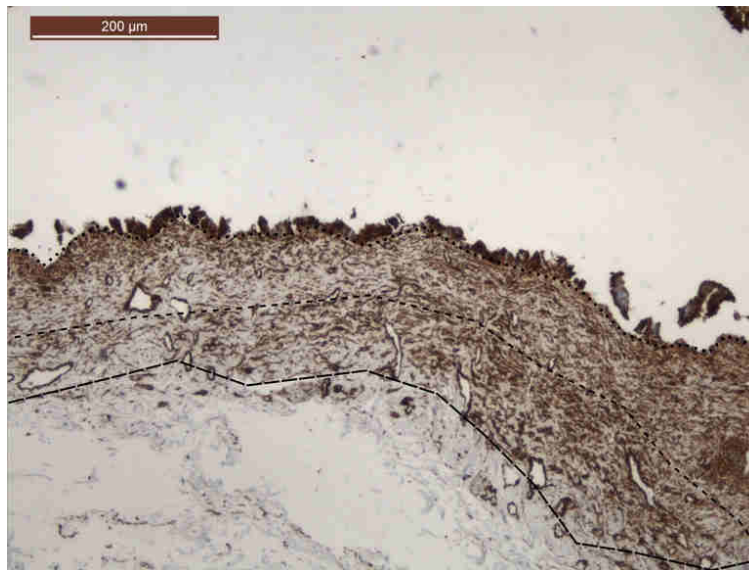


Figure III-S1: Immunohistochemistry staining against muscle fibers, axial section $\times 4$

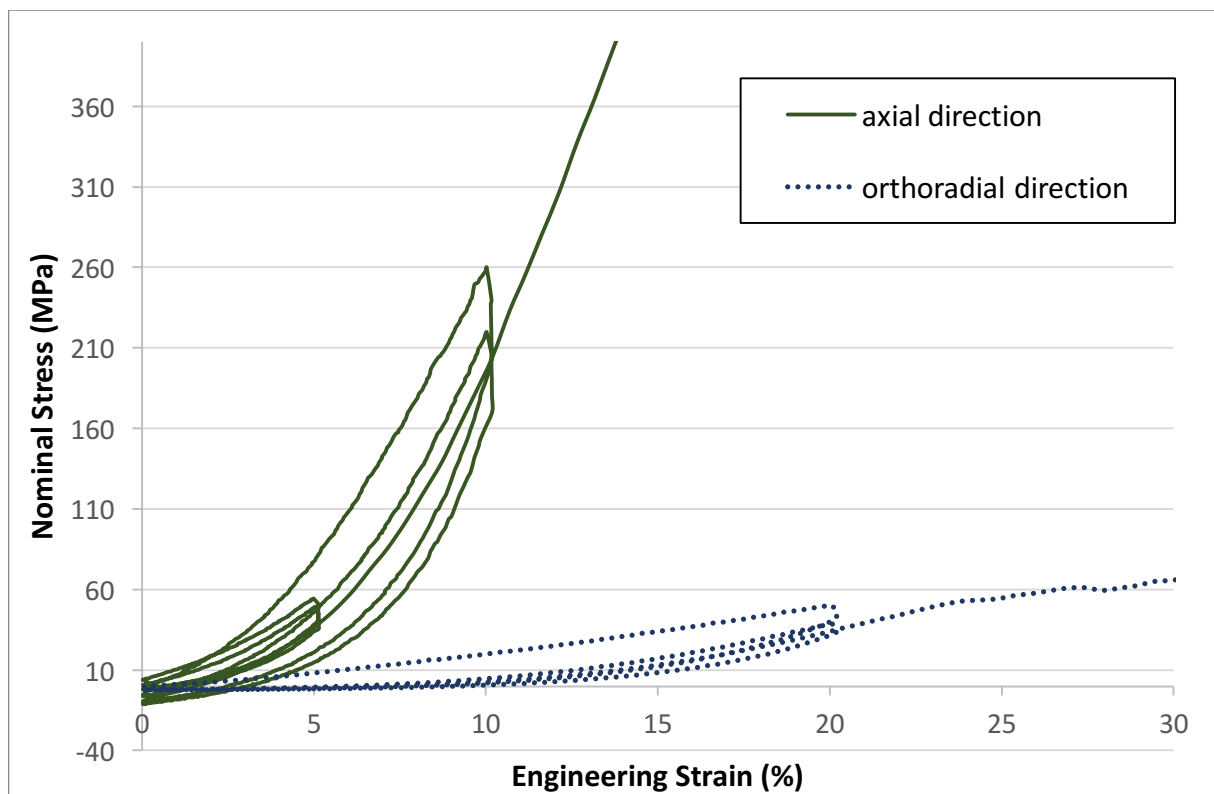


Figure III-S2: Experimental results of planar tension tests in both directions of the common hepatic duct for fresh group.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Les objectifs de ce chapitre étaient de décrire les propriétés mécaniques de la voie biliaire principale chez l'homme, et d'étudier l'impact des différents procédés de conservation sur ces propriétés.

L'étude histomorphologique de la voie biliaire a permis d'interpréter les résultats des essais mécaniques. Nous avons mis en évidence les propriétés d'anisotropie avec une influence de la direction soumis à la contrainte, ainsi qu'un comportement viscoélastique avec une hystérésis majeure. Cette compréhension des propriétés mécaniques nous permettra à l'avenir de reproduire le comportement mécanique à l'aide d'une modélisation numérique.

Nous avons également mis en évidence l'impact de la congélation et de la formolisation sur les propriétés mécaniques. La perte des propriétés liée aux procédés de conservation serait due à une altération de la microarchitecture tissulaire. Cette étude comparative sur les procédés de conservation pourra nous servir de référence quantitative pour des études ultérieures réalisées sur des pièces anatomiques congelées ou formolées.

CHAPITRE IV

VALIDATION D'UN DRAIN BILIAIRE INTERNE RÉSORBABLE (RIBS)

CHAPITRE IV : VALIDATION D'UN DRAIN BILIAIRE INTERNE RÉSORBABLE (RIBS)

INTRODUCTION DU CHAPITRE IV

Dans la perspective d'utilisation du RIBS chez l'homme, les chapitres II et III nous ont permis respectivement de caractériser le RIBS au cours de la dégradation *in vitro* et de déterminer le comportement mécanique de la voie biliaire. Dans le chapitre II, la caractérisation du comportement biomécanique au cours de la dégradation n'a été fait que sur la structure du RIBS, et non pas sur le matériau en lui-même. De plus, cette étude de dégradation *in vitro* ne permettait pas de répondre à toutes les exigences du cahier des charges.

Ce nouveau chapitre a comme objectif d'évaluer les propriétés physico-chimiques et le comportement mécanique du matériau au cours de la dégradation *in vitro* et *in vivo* chez le rat. Cela nous permettra de valider les éléments manquants du cahier des charges, c'est à dire la visibilité radiologique au cours du temps, la biocompatibilité, ou encore l'élasticité compatible avec l'implantation.

Le matériau étudié est toujours réalisé à partir d'une matrice copolymère tribloc PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀, auquel nous avons rajouté un additif radio-opaque, le poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB). Nous avons démontré dans une étude préliminaire la capacité de la PCL-TIB à générer des mélanges stables au cours du temps avec les copolymères PLA/PEG et à générer une radio-opacité suffisante avec de faibles pourcentages d'iode dans les mélanges [192]. Cette étude préliminaire sera évoquée plus en détail dans le chapitre, elle est également est présentée en **Annexe I-6**.

La biocompatibilité sera évaluée dans ce chapitre grâce à l'implantation des éprouvettes chez l'animal, et l'analyse histologique après explantation. Avant l'implantation chez l'animal, des tests de cytocompatibilité ont été réalisés avec succès pour le copolymère implanté (PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀/PCL-TIB) [192], ils seront exposés plus en détail dans ce chapitre.

Concernant la mise en forme du RIBS, dans le chapitre II nous avons utilisé le procédé de film par évaporation de solvant puis collage. Ce procédé n'est pas du tout reproductible ou

industrialisable. Plusieurs techniques ont été testées en étude préliminaire, c'est la technique de moulage par injection qui a été finalement sélectionnée (**Annexe I-5**).

Des prototypes de RIBS ont été réalisés, et nous avons demandé à des chirurgiens expérimentés en transplantation hépatique de tester leur implantabilité *ex vivo* chez l'homme, notamment afin de répondre au point du cahier des charges concernant l'élasticité compatible avec l'implantation.

Ce quatrième chapitre est donc une étude *in vivo* chez le rat, évaluant le comportement mécanique, radiologique et histologique du polymère PCL-TIB / PLA-PEG-PLA au cours de la dégradation afin d'explorer son utilité pour la confection d'un RIBS. Nous avons ensuite évalué l'implantabilité *ex vivo* du prototype de RIBS chez l'homme.

Ce chapitre est un projet d'article :

E. Girard, G. Chagnon, A. Broisat, S. Dejean, A. Soubies, H. Gil, T. Sharkawi, F. Boucher, B. Trilling, B. Nottelet. *Radiopaque and resorbable internal biliary stent for liver transplantation: from in vitro to in vivo studies and human ex vivo validations.*

1. INTRODUCTION

Biliary reconstruction during liver transplantation (LT) may be viewed improperly as the easy step of a difficult operation. Biliary complications are a source of postoperative morbidity and mortality, may eventually compromise outcomes [12,13,213]. Complications arising from the biliary anastomosis (leakage, stricture) are usually considered as the technical Achilles heel of LT. In the literature, incidence of anastomotic biliary complications remains high, ranging from 10% to 50% [214]. Duct-to-duct reconstruction with T-tube placement has been advocated to lower pressure in the biliary system and decrease anastomotic complications [103,213,215,216]. A growing number of centers have abandoned T-tube placement along with accumulating evidence pointing out at specific T-tube induced morbidity and showing safe, efficient and cost-effective outcomes without T-tube placement [18,19,36,96,99,100]. The use of internal biliary stenting (IBS) has been reported as a safe alternative to T-tube placement in LT, allowing to decrease anastomotic biliary complications [20–22,105]. The main advantage of IBS is the absence of choledochotomy which is a major source of biliary leakage after T-tube placement [215,217]. Although IBS is an interesting option, several technical issues such as the nature of the material (silastic, rubber) require further refinement. In particular, the main disadvantage of the materials currently used is their non-degradability, which leads to an additional surgical procedure for ablation, involving potential complications and an additional cost.

The ideal technique might be to perform a duct-to-duct with intraoperative insertion of a Resorbable Internal Biliary Stent (RIBS). This, unlike the silastic stent, avoids a gesture of device ablation. To be usable and useful, RIBS must comply with following specifications. RIBS or its degradation metabolites must be biocompatible without inducing immune or tumor reaction. Based on incidence of anastomotic biliary leakage and anastomotic biliary stricture in literature [218–220], to prevent bile leak and to avoid bile duct strictures, RIBS must keep its mechanical properties to calibrate the anastomosis for 8 weeks. Moreover, on a practical aspect, it must be flexible enough to be easily implantable during liver transplantation, so as not to complicate the biliary anastomosis realization. RIBS visualization by conventional imaging techniques during the postoperative period is also essential, in order to be able to diagnose or eliminate a biliary complication related to the device (an obstruction for example). Finally, it must be completely resorbed in approximately 6 months, without inducing an excessive inflammatory response.

To fulfill these requirements, one can think of resorbable polymers. Indeed, many biodegradable polymers such as polyglycolide, polylactide, and their copolymers are industrially used for the manufacture of implantable medical devices such as surgical suture, bone fixation, drug delivery, stents, and tissue scaffolds [143,221–224]. Biodegradable stent are also developing in clinical practice for many applications, particularly vascular, reflecting safety of these devices [223,225]. For the biliary system, several studies have been conducted since 2006. Xu et al in 2009 investigated degradation of a biodegradable poly-L-Lactide-*co*-Glycolide (PLGA) stent *in vitro* in bile [177]. Physicochemical and mechanical characteristics were compatible with bile duct implantation, but material complete degradation duration was around 4-5 weeks, which is not long enough for a liver transplantation application. Several studies experimented stent degradation in large animals' bile ducts (dog or pig). All demonstrated good biocompatibility and no bile sludge stent obstruction [174,194–196]. These examples highlight the fact that kinetics of degradation and mechanical properties are crucial data for material selection. To match both of these criteria, poly(lactide)/poly(ethylene glycol) copolymers (PLA/PEG) are excellent candidates as they offer a large range of mechanical properties and degradation times, while being approved the regulatory agencies, Tremendous amounts of recent research have therefore focused on PLA/PEG copolymers in tissue engineering applications ranging from vascular grafts, to nerve guides or bone scaffolds [227–231]. In particular, some of us developed PLA-*b*-Poloxamer and PLA-*b*-Poloxamine triblock copolymers for ligament tissue engineering [163,164,232,233], and studied the non-linear viscoelastic behavior of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA over degradation in an effort to produce degradable copolymers for softer tissues [148,234].

However, on strong limitation of such copolymers is their intrinsic X-rays transparency. They are generally made radiopaque by addition of an X-ray absorbing additive such as metal powders, metal salt based on tantalum, barium, bismuth, gold *etc.* [284–286]. For example, Lamsa *et al.* reported on a radiopaque stent composed of PLA₉₆ with 25 wt% of BaSO₄ that was used as radiopaque bioabsorbable biliary stents [287,288]. To circumvent the problem of potential toxicity encountered with metallic additives [190], organic radio-opacifiers containing heavy atoms such as bromine or iodine were proposed. However, the resulting polyester/radio-opacifier blends also suffer from leaching problems that result in the loss of imaging capabilities and potential toxicities [191]. To avoid leaching, two strategies are described. The first one relies on covalent grafting of radio-opacifiers (generally iodinated molecules) to polymer backbone either by using radiopaque initiators or by post-polymerization modification. In a

second approach, radiopaque monomers (generally iodinated monomers) are copolymerized to yield radiopaque copolymers. These methodologies have been applied to various polymeric materials (cellulose, poly(meth)acrylates, polyurethanes, *etc.* [289–291]). However, only few studies report on functional aliphatic polyesters for X-ray modalities. To the best of our knowledge, the first radiopaque polyester bearing iodine was described by some of us [292]. Poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -iodo- ϵ -caprolactone) (PCL-I) was synthesized by introducing iodine in the α position of the carbonyl group of PCL thanks to an anionic activation of PCL followed by substitution with iodine. Copolyesters containing from 10% to 25% of iodized-units were thus obtained. The X-rays opacity was assessed, and appeared high enough to be of interest for biomedical applications although stability of aliphatic carbone–iodine bond could be improved. Other groups focused on the use of radiopaque initiator or chain ends to yield X-ray visible (co)polyesters, a strategy that leads to low overall contents of the radiopacifier (maximum of one initiator per chain) [293,294]. To tackle this limitation, some of us described the synthesis and improved stability of a new cytocompatible radiopaque PCL-based additive for X-ray imaging, poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB) [192]. The advantage of TIB substitution compared to direct iodine substitution was the higher iodine content that is reachable even at low substitution degrees of the PCL backbone. This family of macromolecular X-ray contrast agents could be blended in (co)polyester matrices to induce X-ray opacity. In this previous study, we assessed blends of PCL-TIB_{3,5} and PLA-PEG copolymers [192]. We demonstrated a stable over time radio-opacity, compatible with *in vivo* clinical application, with an optimal iodine ratio 2,5 wt%. Mechanical properties of the blends were not significantly impacted by PCL-TIB_{3,5} compared to the raw polymer matrices.

Taking advantage of the good mechanical properties of the PLA-PEG-PLA with respect to IBS application, while adding clinical imaging possibilities thanks to the PCL-TIB macromolecular agent, we aim in the present work to evaluate the feasibility of RIBS implantation in human bile duct for liver transplantation. For this purpose, PCL-TIB/PLA-PEG-PLA RIBS have been prepared and studied, both *in vitro* and *in vivo*, to evaluate their properties over degradation. In more details, we focus here (1) on the assessment of mechanical, radiological and histological behavior of this radiopaque biomaterial *in vivo* degradation after rat implantation over a 6 months' period, and (2) on the *ex vivo* evaluation of human implantability and imaging of RIBS prototype on human cadavers.

2. METHODS

2.1. Chemicals

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $\overline{M}_n = 32\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $D = 1.8$), 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA, 98%), thionyl chloride (97%), lithium diisopropylamide (LDA, 2 M in THF/heptane/ethylbenzene), poly(ethylene glycol) (PEG, $\overline{M}_n = 20\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 95%), were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). D,L-lactide (D,L-LA) was purchased from Purac (Lyon, France). Ammonium chloride (NH_4Cl , >99%) was obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade magnesium sulfate (MgSO_4) from Carlo Erba (Val de Reuil, France), Harris's haematoxylin from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France), saffron dye from Microm Microtech France (Brignais, France), methanol (MeOH , $\geq 99.8\%$), dichloromethane (DCM, $\geq 99.9\%$), anhydrous tetrahydrofuran (THF, $\geq 99.9\%$) and erythrosin extra bluish from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Physiologic serum was purchased from Ecoflac[®] B. Braun (Saint-Cloud, France). Phosphate Buffered Saline (PBS), was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). THF was dried using a Pure Solv Micro Single Unit (Inert[®]) system.

2.2. Synthesis

The $\text{PLA}_{50}\text{-}b\text{-PEG}\text{-}b\text{-PLA}_{50}$ triblock copolymer was synthesized following a procedure previously described by some of us [232]. Typically, predetermined amounts of D, L-LA and PEG were introduced in a flask. $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (0.1 molar % with respect to LA units) was then added. After degassing, the flask was sealed under vacuum and polymerization was allowed to proceed at 110°C . After 5 days, the copolymer was recovered by dissolution in DCM and precipitation in cold diethyl ether. Finally, the product was dried under reduced pressure to constant mass. The copolymer was obtained with a yield of 90%. Polymerization degree (DP) of each PLA block was calculated using equation (1):

$$(1) DP_{PLA}(\%) = \frac{1}{2} \times \frac{DP_{PEG}}{\frac{EG}{LA}}$$

with EG/LA being the ratio of ethylene oxide and lactyl units calculated from ^1H NMR spectrum.

The overall molecular weight of the synthesized triblock copolymers was calculated using equation (2):

$$(2) M_{ntriblock}(\%) = 2 \times (DP_{PLA} \times 72) + M_{nPEG}$$

with $M_{nPEG \text{ theoretical}} = 20\,000 \text{ g.mol}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$: (300MHz; CDCl_3): δ (ppm)=5.1 (q, 1H, CO-CH(CH₃)-O), 3.6 (s, 4H, CH₂-CH₂-O), 1.5 (m, 3H, CO-CH(CH₃)-O). $M_{n \text{ NMR}} = 320\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ with central block PEG $M_{n \text{ PEG theoretical}} = 20\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ and side blocks PLA₅₀ $M_{n \text{ PLA50 NMR}} = 175\,000 \text{ g.mol}^{-1}$, LA/EG=9/1.

Poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB) was synthesized following a procedure previously described by some of us using a post-polymerization functionalization of PCL by 2,3,5-triiodobenzoyl chloride (TIBC) [192]. Typically, PCL (35 mmol of CL unit, 4 g) was dissolved in anhydrous THF (400 mL) in a four-necked reactor equipped with a mechanical stirrer and kept at -50 °C under argon atmosphere. A solution of LDA (0.5 eq./CL unit, 8.8 mL) was injected with a syringe through a septum and the mixture was kept at -50 °C under stirring for 30 min. After this activation step, TIBC (0.3 eq./CL unit, 5.6 g) was added, the mixture was kept under stirring for 30 min at a temperature raising from -50 °C to -30°C. The reaction was then stopped by addition of a saturated solution of NH_4Cl (300 mL) and pH was adjusted to 7 with 1M HCl. The polymer was extracted with dichloromethane ($3 \times 150 \text{ mL}$). The combined organic phases were washed three times with distilled water ($3 \times 150 \text{ mL}$), dried on anhydrous MgSO_4 and filtered. After partial solvent evaporation under reduced pressure, the polymer was recovered by two precipitations in cold methanol and dried overnight under vacuum. The polymer PCL-TIB₁₁ was obtained with a yield of 80 % and 11 % substitution with respect to CL units.

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm) = 8.3 and 7.4-7.6 (2H, CH), 4.0 (2H, CH₂-O), 2.3 (2H, C(O)CH₂), 1.6 (4H, C(O)CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O), 1.4 (2H, C(O)CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O) (**Figure IV-S1**). $\overline{M}_n = 24\,000 \text{ g.mol}^{-1}$, $\overline{D} = 1.7$

2.3. Physico-chemical characterizations

Degradation of the copolymer blend was followed by size exclusion chromatography (SEC) and ^1H NMR analyses. The number average molecular weight (\overline{M}_n) and dispersity (D) of the polymers were determined by SEC using a Viscotek GPCMax auto sampler system fitted two Viscotek LT5000L Mixed Medium columns (300 x 7.8mm), a Viscotek VE 3580 RI detector. The mobile phase was THF at 1 mL.min $^{-1}$ flow and 30°C. Typically, the polymer (20 mg) was dissolved in THF (2 mL) and the resulting solution was filtered through a 0.45 μm Millipore filter before injection of 20 μL of filtered solution. \overline{M}_n was expressed according to calibration using Polystyrene standards. ^1H NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform was used as solvent, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS).

2.4. Implant preparation

Two types of implants were prepared, *i.e.* Films for rat *in vivo* implantation and stents (tube shape) for the studies of implantability in anatomical specimen. For all samples, blends were prepared from PLA $_{50}$ -*b*-PEG-*b*-PLA $_{50}$ ($M_{n, \text{NMR}} = 320\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and PCL-TIB $_{11}$ (PCL-TIB $_{11} = 24\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ratios of PCL-TIB $_{11}$ and PLA $_{50}$ -PEG-PLA $_{50}$ were adjusted to yield polymer blend containing 2.5 wt% of iodine, which corresponds to PCL-TIB $_{11}$ weight ratio in blend of 10 wt%.

Polymer films with a targeted thickness of 0.6 mm (based on commercially available stents) were manufactured by solvent evaporation. A predefined quantity of polymer was solubilized in acetone, the solution was poured in a small dish and placed for 36h in dark under an extractor hood for evaporation. Final solvent removal was obtained by further drying in vacuum under 1.10 $^{-3}$ mbar for 3 days. A 0.5 mm thick film was obtained, and implants (corresponding to a Dogbone-style tensile specimen: 40 x 6 x 0.5 mm 3) were then realized from it (**Figure IV-S2**).

Resorbable internal biliary stents (RIBS) were obtained from the blend by injection molding. They were made by a specialized company (*confidentiality agreements not allowing this partner to be quoted*) according to the following protocol. After preheating the blend to 120-130 °C in an injection chamber, the melt blend was injecting into a mold with an insert (the thickness of the tube is controlled with the dimensions of the insert). The tube was finally

demolded after nitrogen cooling. Dimensions were selected based on commercial silicone internal biliary stent (IBS) (3.5 mm external diameter, 150 mm length, 0.5 mm thickness).

All implants were then sterilized by gamma radiations (radiation sources of ^{60}Co , ARC-nucleart, CEA Grenoble, France) with gamma doses of 25 kGy. The adequate gamma dose for sterilization was previously studied by some of us [295].

2.5. Experimental design: *in vitro* and *in vivo* degradation

Experimental design was illustrated in **Figure IV-S3**. Samples were implanted in the rats (*surgical procedure hereafter*) to evaluate their *in vivo* degradation. Radiological acquisitions, physicochemical characterization and mechanical analyzes were realized at different time points. Each analysis was conducted on a minimum of 3 samples. The different time points were: baseline, 1 week, 1 month, 2 months, 3 months and 6 months. Additionally, histological analyses were performed at 3 months and 6 months post-implantation.

In parallel, an *in vitro* degradation study was carried out to compare with the *in vivo* degradation data. Samples were placed in 20 mL test tubes in PBS at 37°C within an agitator/incubator. Physicochemical characterization and mechanical analyzes were realized at the same different time points.

2.6. Animals and Surgical procedures

Male rats aged of 7 weeks and weighing 250 – 300 g (Charles River, France) were housed in groups of 1-2 in metabolic cages under standard laboratory condition (12h light/dark cycle with lights off at 7:00 p.m. and controlled temperature in 22 ± 2 °C). Water and standard laboratory chow were provided ad libitum. For all experiments, rectal temperature was monitored and rats were maintained at 37.0 ± 0.5 °C. Anesthesia was induced by the inhalation of 5% isoflurane (Abbott Scandinavia AB, Solna, Sweden), and maintained throughout all surgical and imaging procedures with 2% isoflurane through a facial mask in 50% air-50% oxygen.

Surgical procedures were performed under sterile conditions in a veterinary surgical room. A median laparotomy was performed and one of the implants was inserted into the peritoneal space in left lateral position. The muscular abdominal wall and the skin were finally separately sutured and the animals were allowed to recover from anesthesia. After surgery, the

animals received a single subcutaneous injection of an analgesic (Rimadyl, 5 mg.kg⁻¹). The rats were sacrificed under anesthesia (inhalation of 5% isoflurane), by intra-cardiac injection of sodium pentobarbital (100 mg).

All animal procedures conformed to French government guidelines and were performed under the licence number #5612-2016060910392662v3 (for experimental and animal care facilities) from the French Ministry of Agriculture (Articles R214-117 to R214-127 published on March 31, 2017). This study is in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting in Vivo Experiments) [296] with the approval of the animal experimentation ethical committee of Grenoble, (“Comité d’éthique en expérimentation animale de Grenoble”, National agreement n°012).

2.7. Mechanical tests

Polymer mechanical properties were determined by performing tensile mechanical tests on dogbone-style tensile specimens (**Figure IV-S2**), with a MTS Criterion[®] Electromechanical test machine, equipped with a 25 N cell force. In order to respect physiological experimental conditions, an experimental thermo-regulated tank filled with 0.9% sodium chloride solution was designed and used, as previously reported by some of us [148]. The saline solution was heated to a temperature of 37 ± 1 °C. Tests were realized at 0, 1, 4 and 8 weeks of degradation. Beyond 8 weeks, the loss of mechanical properties of the specimen were too important to be tested.

Two types of mechanical tests were realized. First, cyclic loading tests that consist in a load at two strain levels (5% and 10%) followed by an unload to zero strain, with a constant strain rate of 1% per second. Secondly, relaxation tests that consist in a load at two strain levels (5% and 10%) with a strain rate of 1% per second, followed by a tensile relaxation test of 30 min each. Between the 5% strain and the 10% strain relaxation phases, an unload to zero strain and a 10 minutes waiting period were realized. Young's modulus (E , MPa), was expressed as the mean value of the three measurements. E was calculated using the initial linear portion of the stress/strain curves.

2.8. In vivo Computed Tomography (CT) imaging

The *in vivo* biodegradation of the implants was evaluated non-invasively using dynamic CT acquisitions. To that purpose, CT-scans were acquired at baseline, 1 week, 1 month, 2 months and 3 months on a subset of 7 rats using a dedicated small-animal system (nanoCT, Mediso). At 3 months, 3 rats were euthanized for the *ex vivo* evaluation of the implants, and an additional CT-scan was performed at 6 months on the remaining 4 animals.

The animals, anesthetized with 2% isoflurane in a mixture of air and oxygen (1:1) were placed on a heating bed and their respiratory rate was continuously monitored. For acquisition parameters, a rapid CT-SCAN was performed to image the whole abdomen and locate the implant. Then, a focused acquisition was performed at the level of the implant using the following parameters: medium zoom, 720 projections and 300 ms per projection at 70Kvp. The acquisition was reconstructed using dedicated software with isotropic voxels of 0.14mm (Nucline, Mediso). For image analysis, the implant was semi automatically segmented using a connected thresholding algorithm and 600 Housfield Units (HU) as the minimum threshold to discriminate the implant from the soft tissues (Vivoquant, Invicro). The obtained volume of interest (VOI) was used to determine the volume of the implant, as well as the mean and max signal intensity (HU). Moreover, the distribution of the signal intensity within the VOI was also visualized as a histogram.

2.9. Histological analyzes

For histological analyzes, at 3 and 6 months postsurgery, animals were sacrificed, abdomen was open, and samples was remove in monobloc with neighboring structures. Samples were conserved in formaldehyde, fixed first in formalin 10% during 24 hours at 4°C and then embedded in paraffin. Subsequently, to obtain cross-sections of the implant and the surrounding adipose tissue, samples were sliced using CTM6 coverslipper microtome Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA USA) into 50 µm slices. The sections were deparaffinized and stained with Hematoxylin Eosin Saffron (HES) according to standard protocols on a Leica ST5020 automated slide stainer (Wetzlar, Germany), and then examined qualitatively by light microscopy focusing particularly on inflammatory processes associated with the implant.

2.10. Human cadaveric implantability tests

RIBS implantability tests on the human bile duct were performed on cadavers by 4 experienced liver transplant digestive surgeons. RIBS dimensions were similar to those of the silicone internal biliary stent (IBS) used in routine clinical practice (3,5 mm external diameter, 150 mm length, 0,5 mm thickness).

Formalin-fixed cadavers were selected for anatomical dissection from the Anatomy laboratory, faculty of medicine, Grenoble, France (Laboratoire d'Anatomie Des Alpes Françaises). Cadavers were embalmed with a formalin solution (ARTHYL) injected into the carotid artery and drained from the jugular vein, and then preserved in a refrigerated room. All the tests were performed in compliance with French regulations on postmortem testing, and the protocol was approved by a local scientific committee of the Grenoble Alpes University.

A subcostal laparotomy was performed, with a main bile duct anterior approach. After bile duct radial section, biliary reconstruction was performed using a standardized duct-to-duct biliary reconstruction through an end-to-end choledoco-choledocostomy. The posterior face of the biliary anastomosis was made with a 6/0 polydioxanone running suture, and the anterior face with 6/0 polydioxanone interrupted sutures. A RIBS was inserted after construction of the posterior anastomotic suture. The stent length was tailored to bridge the whole common bile duct from the papilla to the hilar bifurcation. The subjective stiffness evaluation of RIBS compared to silastic IBS, the ease of implantation assessment, the used technique and the overall appreciation were evaluated by surgeons using a questionnaire. Then, the RIBS implantation on human bile duct was evaluated using CT acquisition of the anatomic piece.

2.11. Statistical analysis

All data are presented as mean and standard deviation. Statistical analysis was conducted with XLSTAT (Addinsoft, Japan). Multiple time point data were evaluated by repeated measures ANOVA followed by a Student's t-test. Max signals intensity determined by CT-scans were compared from baseline using one-way ANOVA corrected for multiple comparisons by Holm-Sidak method (GraphPad software, CA USA). A difference was considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characteristics of PCL-TIB/PLA-PEG-PLA blends

The objective was to evaluate the feasibility of RIBS design and to study it *in vitro* and *in vivo* properties over degradation using a blend of PCL-TIB, used as degradable macromolecular contrast agent, and of a PLA/PEG copolymer, used as matrix biomaterial for the device. PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ triblock was selected for RIBS development as it showed mechanical and degradation properties corresponding to RIBS specifications (flexibility after drying, low Young's modulus and *in vivo* estimated degradation time of about 6 months for a complete resorption), as described in chapter I and previous studies [148,234]. On the other hand, PCL-TIB was selected as a radiopaque macromolecular additive due to its demonstrated ability to generate homogeneous blends with PLA/PEG copolymers and to generate radiopacity even at low percentages of iodine in the blends. In more details, radiopaque PCL-TIB_{3,5}/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blend with as low as 2,5 wt% iodine yielded good X-ray visualization in a preliminary study [192]. To reach this iodine content, blends were containing 25 wt% of PCL-TIB_{3,5}. Such a high ratio of low molecular weight PCL-TIB in the blend may however impact the mechanical and degradation properties of the targeted RIBS. For this reason, we targeted in the present work a PCL-TIB with higher substitution degree.

The polymers were synthesized according to well-established methods described in the experimental part. The molecular weight of the synthesized PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ triblock copolymer was firstly determined by ¹H NMR spectroscopy, thanks to Eqs. (1) and (2). $M_{n,NMR}$ was 320 000 g.mol⁻¹ in good agreement with the expected value ($M_{n,theoretical} = 300\ 000\ g.mol^{-1}$). On the opposite, SEC analyses gave molecular weight values about two times lower than those calculated by NMR, with an average molecular weight $\overline{M}_n = 179\ 000\ g.mol^{-1}$. This difference is explained by the use of polystyrene standards for SEC calibration causing inaccurate measurements with aliphatic polyesters [237,238]. Moreover, the amphiphilic nature of the copolymers can modify their hydrodynamic volume and increase their retention time, giving underestimated results. Concerning PCL-TIB, post-polymerization reaction conditions were optimized to increase the substitution degree of the PCL backbone. A substitution degree of 11% of TIB with respect to CL units was calculated based on the NMR spectrum provided in **Figure IV-S1**, by comparing the integrations of the signals in the range 7.4-8.3 ppm corresponding to the aromatic protons of TIB with the integration of the proton at 4.0 ppm corresponding to the methylene group of PCL. An average molecular weight $\overline{M}_n = 24\ 000\ g.mol^{-1}$ with $\text{Đ} = 1.7$ was obtained by SEC analysis.

The two polymers were then blended to target a 2.5wt% iodine content. This was achieved with only 10 wt% of PCL-TIB₁₁ within the blend (**Figure IV-1**). Preliminary film formation tests confirmed that this polymer mix was able to give homogeneous films with no visible phase separation. In addition, at this iodine content, PCL-TIB/PLA_{50-b}-PEG-*b*-PLA₅₀ was found to be cytocompatible under the conditions recommended by International and European standards (ISO 10993-5:2009) using murine fibroblast for proliferation assay, which confirmed that this biomaterial may be suitable for the growth of fibroblasts and cell-contacting applications and may be used for the design of X-ray visible medical devices (**Figure IV-S3**).

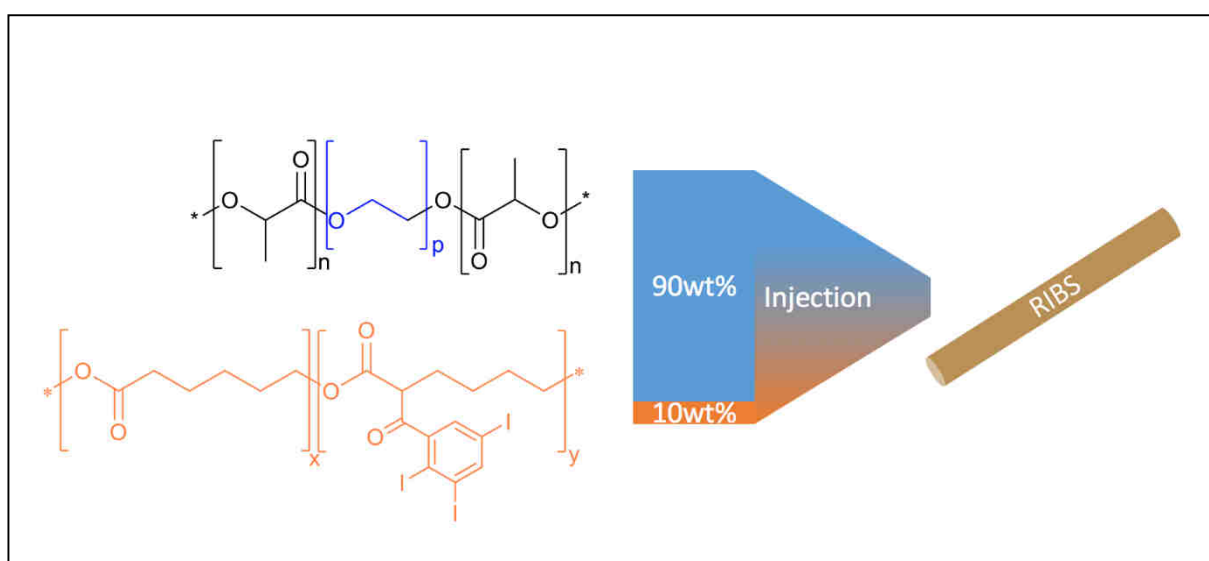


Figure IV-1: Schematic representation of the RIBS production.

3.2. Rats implantation and animal tolerance

In order to conduct a comparative *in vitro* vs. *in vivo* study of the polymer degradation and evolution of the mechanical properties, flat samples under the shape of Dogbone-style tensile specimen were then prepared from the blend using the easy and reproducible solvent evaporation technique. Following careful removal of the residual solvent traces, specimens were punched out from films and sterilized prior to implantation. Specimens were implanted in 17 male rats into the peritoneal space in left lateral position. All 17 implant samples were well-tolerated as further confirmed by the histological analyses (see corresponding paragraph). All the 17 rats showed mild wound reactions surrounding the incision resolved few days after surgery, without postoperative pain. There were no signs of parietal or wound infection during the postoperative follow-up and no premature death to deplore.

3.3. In vitro vs. in vivo degradation study

Degradation of the copolymer blend was followed by size exclusion chromatography and ^1H NMR analyses. Regarding molecular weight, the same trend was observed both *in vitro* and *in vivo* with fast and quasi-linear molecular weight decrease during the first 10 weeks before stabilization at ca. 15% of the initial value (Mw around 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (**Figure IV-2A**). Dispersity slightly increased until the 10th week before stabilization at Đ -2.3.

The composition of the copolymer blend evolved during the degradation with again similar trends observed *in vitro* and *in vivo* (**Figure IV-2B**). LA/EG monomer unit's ratio remained quasi constant over the degradation study. This was not the case for LA/CL ratio with an initial value of 12.5 that drastically decreased after 15 weeks to level off below 1.

This combine information allows to draw the following degradation scenario. During the first 10 weeks, in accordance with the reported slow degradation of PCL, only the PLA-*b*-PEG-*b*-PLA copolymer degrades. If it exists, the contribution of the PCL-TIB in the molecular weight distribution is not visible under the conditions used to study the degradation due to the rather large dispersity of the triblock ($\text{Đ} = 1.64$) and the low content of PCL-TIB (10 wt%) in the blend. In parallel, the overall composition does not change as a result of the low, if any, diffusivity of the degraded PLA-*b*-PEG-*b*-PLA chains whose molecular weight are still above 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. After 10 weeks, the molecular weight levels off at 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ which corresponds to the molecular weight of the central PEG block and of PCL-TIB, whereas the LA/CL ratio drops as a result of the diffusion of the PLA oligomers.

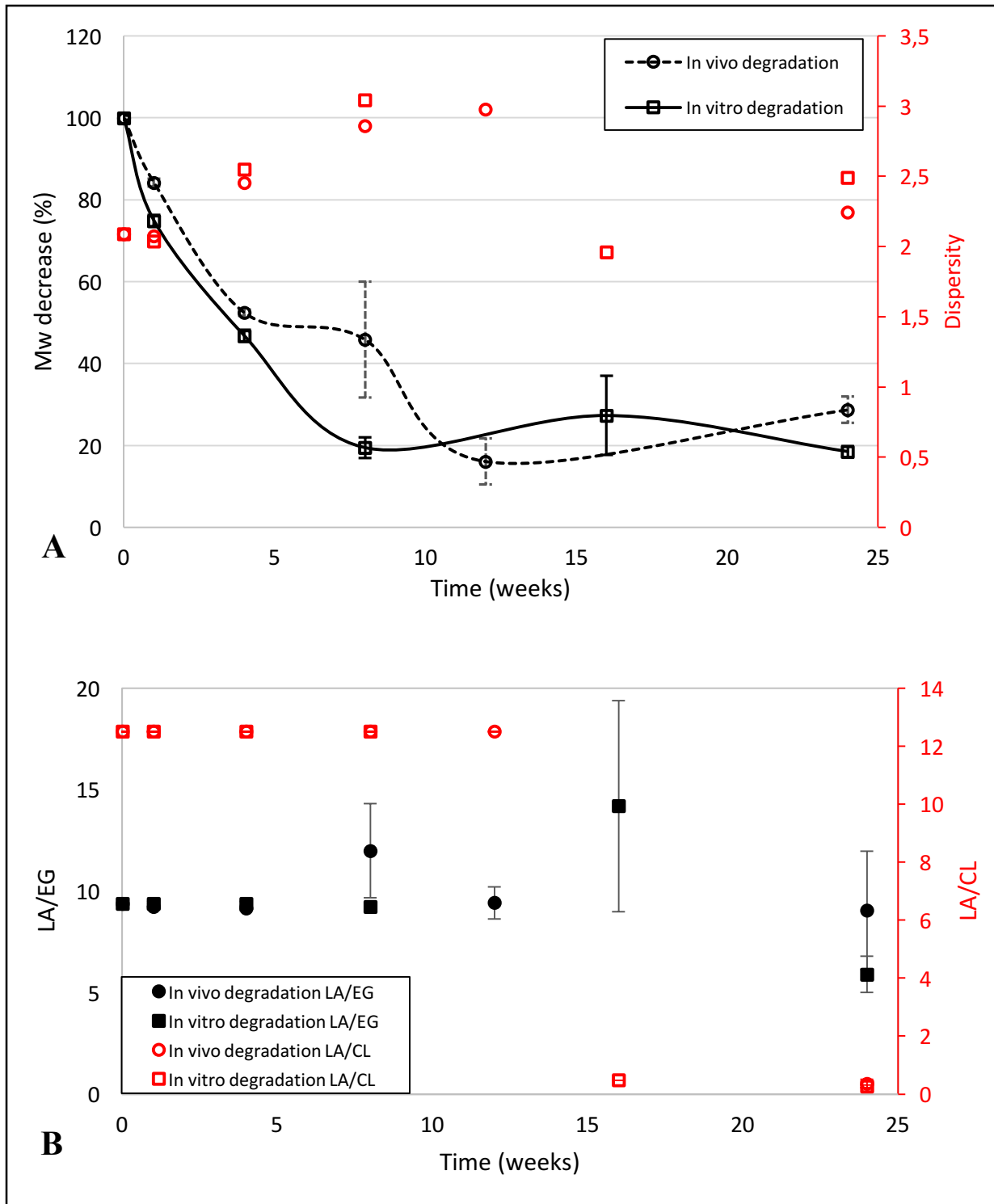


Figure IV-2: Comparative study of the degradation of PCL-TIB₁₁/PLA-*b*-PEG-*b*-PLA *in vitro* (PBS at 37°C, solid line & square markers) or *in vivo* (in rat intraperitoneal cavity, dotted line & round markers).

- A.** Molecular weight (M_w) (black color) and dispersity (\mathcal{D}) (red color) evolutions.
B. Evolution of LA/EG monomer units ratio (black color) and LA/CL monomer units ratio (red color).

In summary, up to 10 weeks, samples contain degraded PLA-*b*-PEG-*b*-PLA chains and PCL-TIB, and the degradation of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA is not advanced enough to impact the overall composition. After 10 weeks, the diffusion of the shortest PLA segments and of the more hydrophilic PLA-*b*-PEG residues leaves samples enriched in PCL-TIB, explaining the drop-in LA/CL ratio, while the small population of less degraded and more hydrophobic PLA-*b*-PEG-*b*-PLA that are still present in the samples explain the stable LA/EG ratio.

3.4. Mechanical properties evolution

The **Figure IV-3** presents the stress–strain curves of the material for the cyclic loading tests from zero to eight weeks. On the initial load, stress is first increasing between 0 and 1% strain up to the maximum stress, and decreased then during the rest of the load.

In the course of degradation, the long polymeric chains were cleaved, leading to a decrease of molecular weight and mechanical properties. The shape of the curves was modified and the stress is decreasing for any strain, after 8 weeks, the polymer has lost almost 80% of its initial molecular weight, making mechanical tests impossible due to the extreme brittleness of the specimens. The Young's modulus (E) was measured for each deformation cycle at 5 and 10% for each degradation time. The results were presented in **Figure IV-4**. It appeared that stiffness of material was exponentially decreasing until 8 weeks, in a way parallel to molecular mass decay (cf. Figure 2A), illustrating the degradation process. *In vivo* degradation presents a similar evolution than *in vitro* degradation, no significant difference was highlighted, with overlapping standard deviations.

The viscoelastic properties of the material were studied by means of the relaxation analysis, **Figure IV-5** present normalized relaxation test during *in vivo* degradation, at 5 and 10% strain load, defined as:

$$(3) \quad \sigma_{nr} = \frac{\sigma_{relax}}{\sigma_m} = \frac{\sigma_{relax}}{\sigma_{relax}(t=0)}$$

σ_m is the static stress reached at the end of the load and σ_{relax} the stress recorded during relaxation at any time t .

The normalized curves for relaxation at 5% and 10% were nearly similar during the 4 first weeks of degradation for the two values of maximal strain. In other words, it means that the temporal viscous component of the mechanical behavior was invariant during early stages of degradation. This means that, during this period, only instantaneous elastic properties degraded.

From week 8 results, some changes in the normalized relaxation curves are observed, corresponding also to the time when the specimens become very difficult to test.

The mechanical tests ensure that the viscoelastic properties of the material are nearly not evolving during the first 8 weeks whereas the stiffness of the material is decreasing about 70% after four weeks. Nevertheless, the material was chosen with mechanical properties largely greater than biliary duct, factor about 10 (*cf. Chapter III*) ensuring that the mechanical properties of the RIBS stay greater than the biliary duct after 4 weeks avoiding stenosing healing and permitting to keep the tube lumen open, to avoid a biliary obstruction. After 4 weeks, the properties continue to decrease but less rapidly and the tissue has started its regeneration, ensuring a good efficiency of the RIBS during the eight weeks.

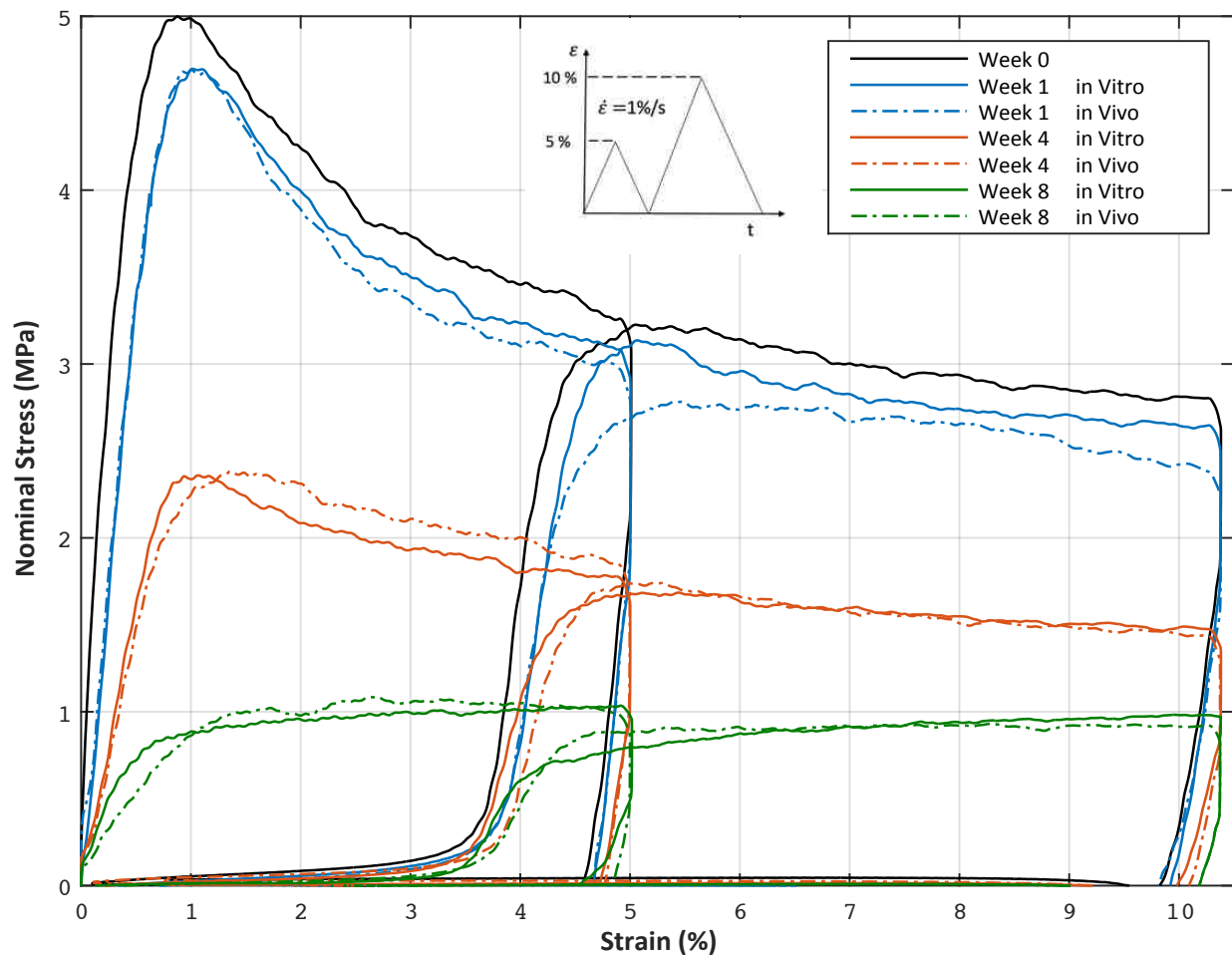


Figure IV-3: Stress–strain curves for cyclic loading tests at 0, 1, 4 and 8 degradation weeks.

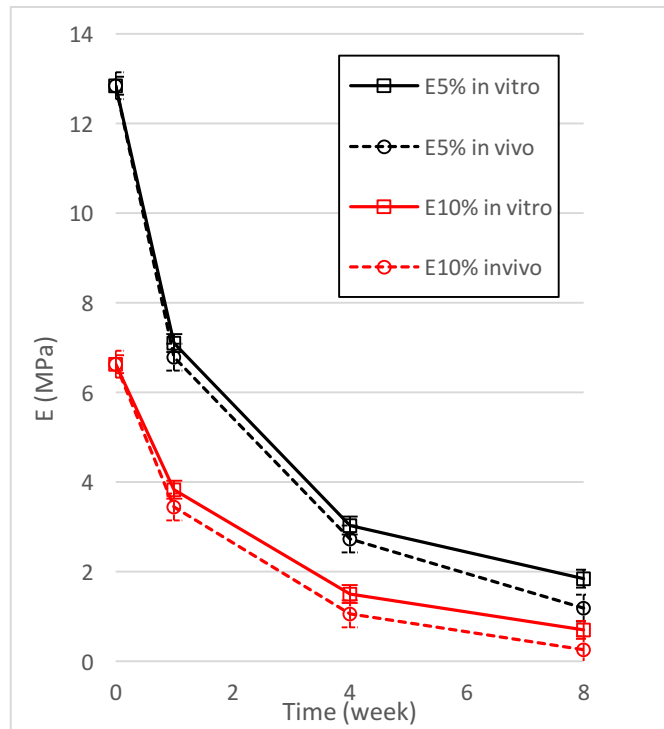


Figure IV-4: Young's modulus on 5 and 10% strain load cycles during degradation, comparison between *in vitro* and *in vivo* degradation.

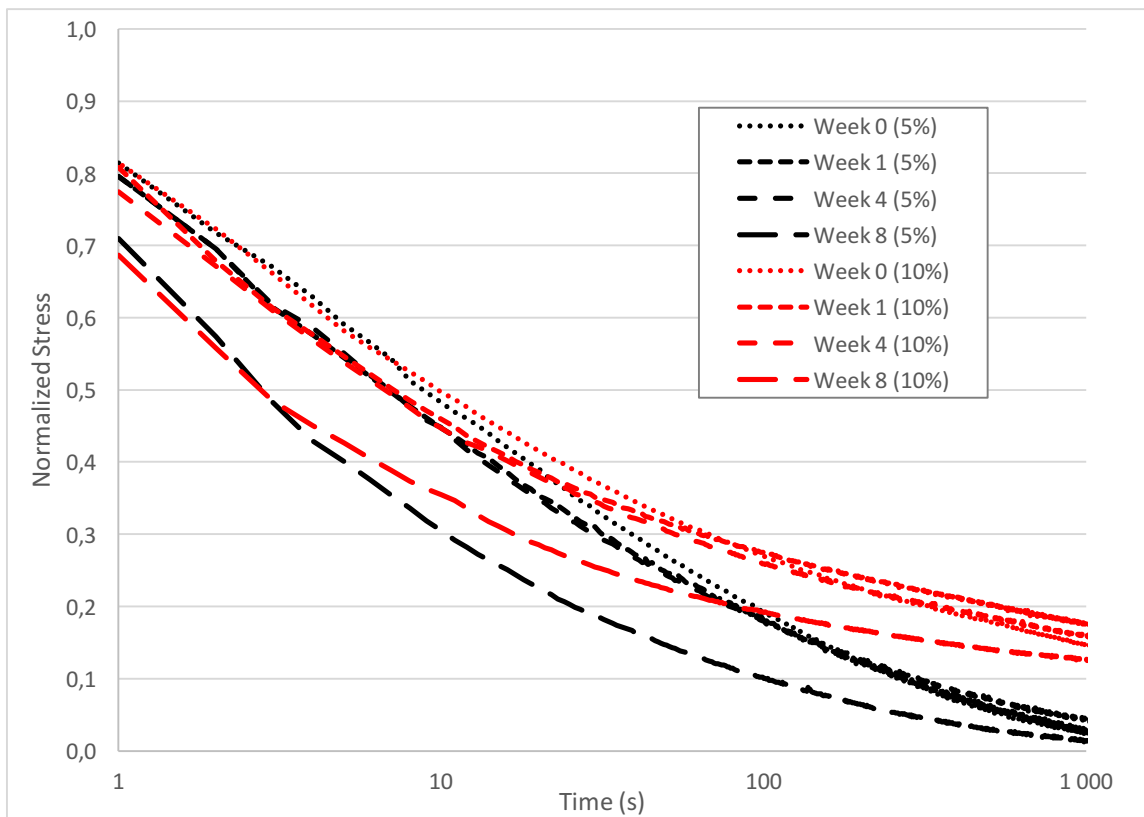


Figure IV-5: Normalized relaxation test during *in vivo* degradation, 5% and 10% strain load.

3.5. Computed Tomography imaging

From baseline up to 3 months, no significant change was observed by CT-scan imaging quantification (**Figure IV-6 A-C**). Indeed, the volume and mean signal intensity were of $75.3 \pm 9.4 \text{ mm}^3$ and $1037 \pm 155 \text{ HU}$ at baseline, and similar values were observed at 3 months ($74.0 \pm 13.7 \text{ mm}^3$ and $967 \pm 89 \text{ HU}$). It could however be noticed that, at 3 months, the shape of the implant appeared more compact and rounded than at earlier time points (**Figure IV-6 D**). At 6 months, the implants appeared to be fragmented. Even when considering the sum of the fragments, the volume was significantly reduced in comparison to baseline ($47.3 \pm 5.1 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$) (**Figure IV-6 A**). Moreover, mean ($1386 \pm 154 \text{ HU}$, $P < 0.01$) but even more dramatically maximum signal intensity (4556 ± 707 vs $2100 \pm 214 \text{ HU}$ at baseline, $P < 0.0001$) were found to be significantly increased (**Figure IV-6 B-C**). These focal increases in signal intensity were readily visualized on CT-scan images, and were also well identified on volumes of interest (VOIs) histograms (**Figure IV-6 C-D**). On **Figure IV-6 D**, each curve represents the average signal distribution within the VOIs at a given time point. All quantifications were performed based on VOIs. The **Figure IV-6 D** illustrated the CT-scan appearance of implants over time from the same animal, left images obtained with a semi-automated segmentation of CT-scans and right images by selected intensity scale from -1000 to 5000 HU. On these representative images, the shape of the implant appears to be less well defined at 3 months, and fragments are visible at 6 months (red and green colors). Moreover, focal hypersignals are visible at 6 months both on CT-scans and on the distribution curve (**Figure IV-6 D**) with voxels $> 2000 \text{ HU}$ (gray area).

These results are consistent with degradation analysis. Up to 3 months, samples contain degraded PLA-*b*-PEG-*b*-PLA chains and PCL-TIB, and the degradation of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA is not advanced enough to impact the implant volume. As visualized on Figure IV-2B overall composition was the same during this period. From 3 to 6 months, the diffusion of the shortest PLA segments and of the more hydrophilic PLA-*b*-PEG residues leaves samples enriched in PCL-TIB, explained by the drop-in LA/CL ratio on Figure IV-2B. This explains the implant fragmentation, and the loss of volume. The focal gains in signal intensity is due to the increased concentration of PCL-TIB in the remaining fragments.

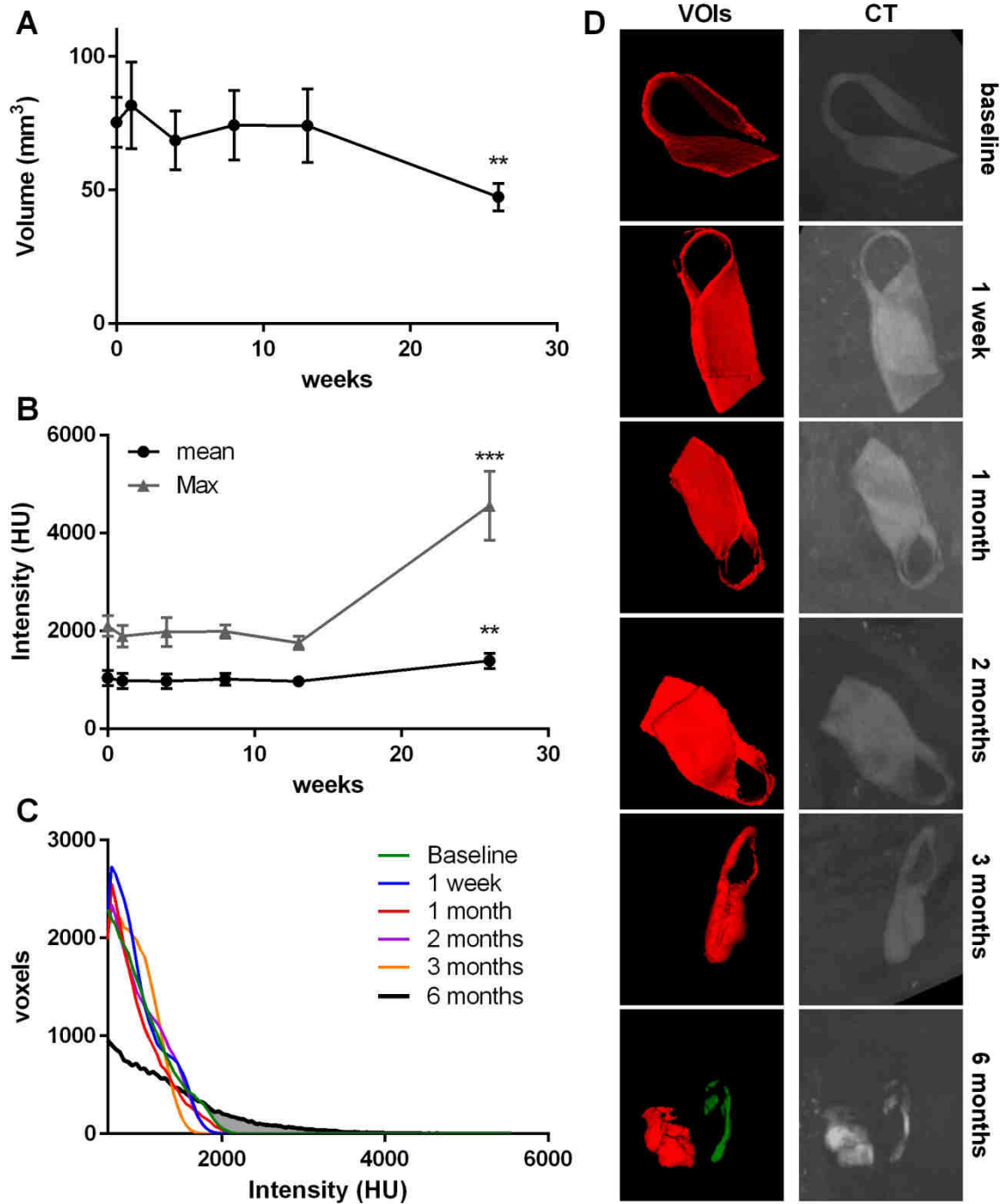


Figure IV-6: Computed Tomography imaging. A. Volume of the implant from baseline to 6 months. B. Mean and maximum signal intensity from baseline to 6 months. C. Average signal distribution within the VOIs at a given time point. All quantifications were performed based on VOIs. D. CT-scan appearance of implants over time from the same animal (D-left : obtained by semi-automated segmentation of CT-scans, D-right: scaled from -1000 to 5000 HU). HU: Hounsfield unit; VOIs: Volumes Of Interest; CT: Computed Tomography. ** and *** $P < 0.01$ and $P < 0.0001$ vs baseline, respectively.

3.6. Histological results

Histopathological examinations of the implanted stents were performed at 3 and 6 months postsurgery. All samples were removed and analyzed in monobloc with adipose neighboring structures. At 3 months (**Figure IV-7 A**), the exogenous material is intact, circled by a thin fibrotic line, bordered by a few multinucleated giant cells, without any inflammatory reaction. At 6 months (**Figure IV-7 B-C**), the exogenous material is fragmented, resorbed by a histiocytic and giant cell reaction, with a few lympho-plasma cells. This reaction is mild, well limited, circumscribed and does not spread to the adjacent adipose tissue, without chronic inflammation or intense fibrosis. Identically to radiologic observations, material was fragmented at 6 months of degradation. Almost all the PLA-*b*-PEG blocks were degraded, and remain only PCL-TIB fragments, that have a longer degradation time. Tissue integration seems optimal with a minimal inflammatory reaction, acceptable for this application, less important than that visualized for the resorption of suture for example.

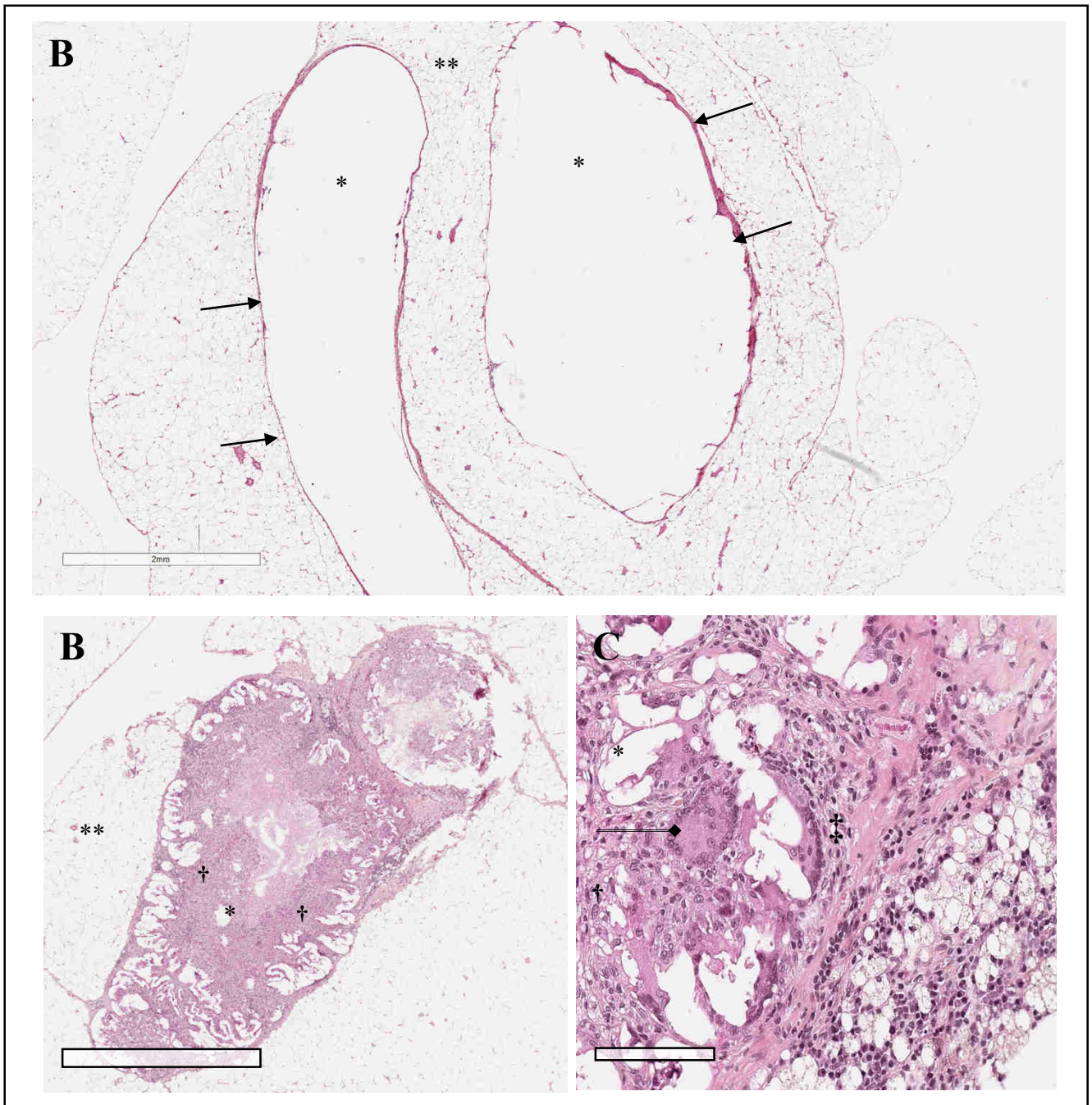


Figure IV-7: Histopathological examinations of the implanted stents with HES staining.
 A. At 3 months postsurgery (*x2 magnification*). B. At 6 months post surgery (*x2 magnification*). C. At 6 months post surgery (*x200 magnification*).
 →Fibrotic line, *Exogenous material, **adipose tissue, †Histiocytic resorption,
 ‡Lympho-plasma cells, —◆Multinucleated cell.

3.7. Implantability on human bile ducts

Four surgeons performed 4 anatomical dissections on human cadavers, without apparent abdominal pathology or scars, sex ratio 1:1, median body mass index 27 kg.m⁻². For 25% of surgeons, RIBS was too rigid compared to the silicone drain, which could increase the difficulty of implantation. The RIBS was easily tailored with surgical scissors in 100% of cases, 70% of the surgeons succeeded in implanting the RIBS, thanks to a slightly modified biliary reconstruction technique. In fact, the usual technique was: the first made of the posterior face of the biliary anastomosis by a continuous suture, then the RIBS insertion and finally the anterior face made by interrupted sutures. The relative stiffness of RIBS compared to a silicone drain didn't allow this usual technique to be performed. The modified technique was illustrated on **Figure IV-8 AD**. It consisted making posterior face with interrupted sutures, by passing the sutures without tying, then inserting the RIBS and tying sutures on it. Anterior face was finally realized as usual. This technique did not necessarily extend the operating time, and didn't increase morbidity risk [40,297]. When the anastomosis was performed, the surgeon was satisfied in 100% of the cases. Seventy five percent of them would use RIBS if it was possible. The RIBS implantation on human bile duct was evaluated using CT acquisition of the anatomic piece. RIBS were easily visualized on the images (**Figure IV-8 E**), with sufficient density contrasting with surrounding soft tissues. The punctuality of air in the lumen prevented RIBS entire visualization. This was related to the absence of biliary flow on cadavers, which normally helps to air evacuation. RIBS was properly implanted, without bending, with an open lumen allowing to bile fluid circulation.

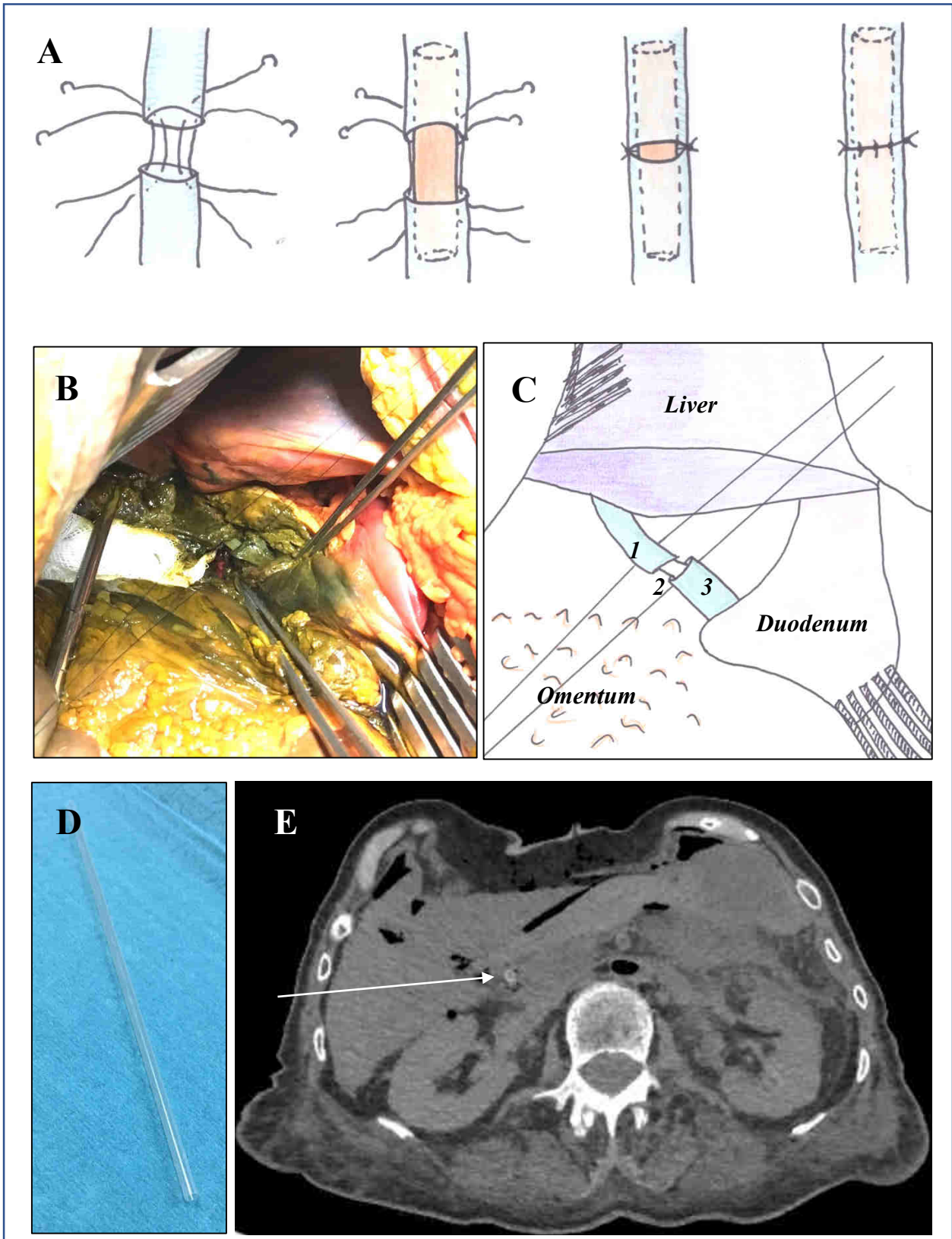


Figure IV-8: A. Illustration of choledococholedostomy with RIBS implantation. B. Intraoperative view of choledococholedostomy with RIBS implantation. C. Schematic illustration of figure B (1. Proximal bile duct, 2. RIBS, 3. Distal bile duct). D. RIBS prototype before implantation. E. CT-scan cross section after implantation with RIBS visualization (white arrow).

4. CONCLUSION

The aim of the present work was to evaluate the feasibility of RIBS implantation in human bile duct for liver transplantation. For this purpose, we chose PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ as the RIBS material because its degradation characteristics matches the healing time required for bile duct support. The *in vitro* and *in vivo* degradation allowed to assess mechanical, radiological and histological behavior of this biomaterial. PCL-TIB₁₁ radiopacifier additive did not impact RIBS properties, and was stable over time, allowing for an excellent CT-scan visualization of the implant throughout all degradation. No significant difference between *in vivo* and *in vitro* degradation evolution was observed. Mechanical tests proved the maintain mechanical properties for at least 8 weeks, matches the healing time required for the application. Histological observations indicated a compatible degradation with human implantation, without major chronic inflammation or significant fibrosis. The *ex vivo* evaluation of human implantability and imaging of RIBS prototype on human cadavers demonstrated the feasibility of RIBS in human bile duct for liver transplantation.

5. SUPPLEMENTARY DATA

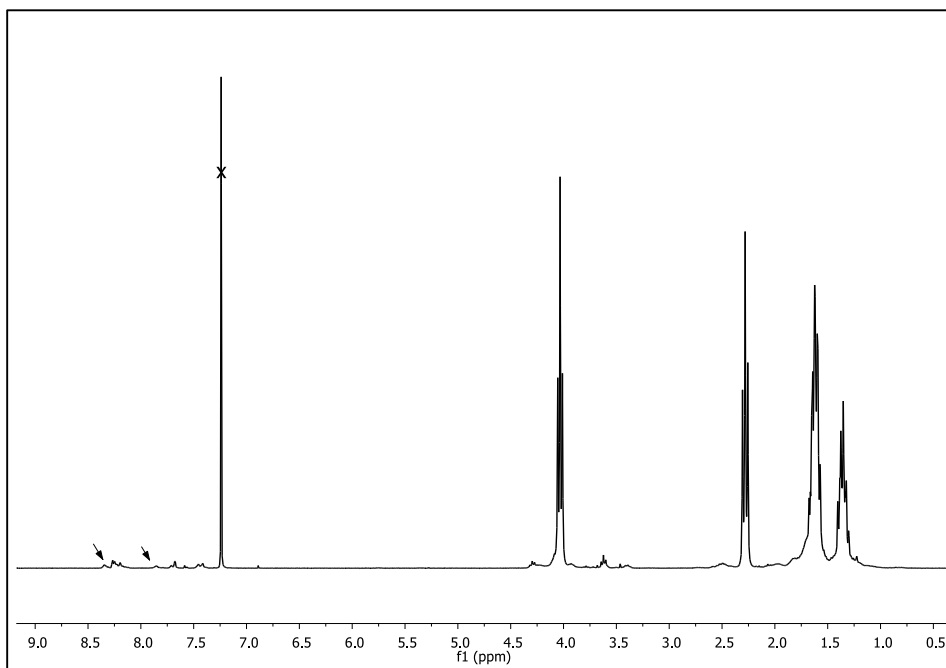


Figure S1: ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) spectrum of PCLT-TIB₁₁ (cross corresponds to residual solvent, arrows point out the traces of residual free TIB whose signal was not taken into account to calculate the percentage of iodine)

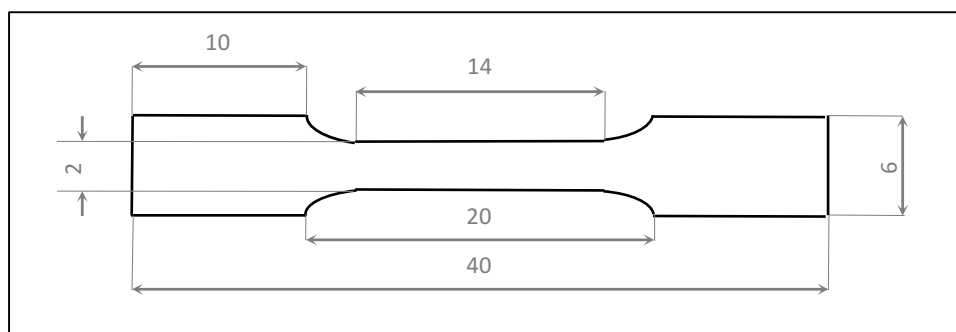


Figure S2: Dogbone tensile specimen used for tensile mechanical testing, values in millimeters (thickness: 0.5 mm). Tested area was: $14 \times 2 \times 0.5 \text{ mm}^3$, section 1.10^{-6} mm^2 .

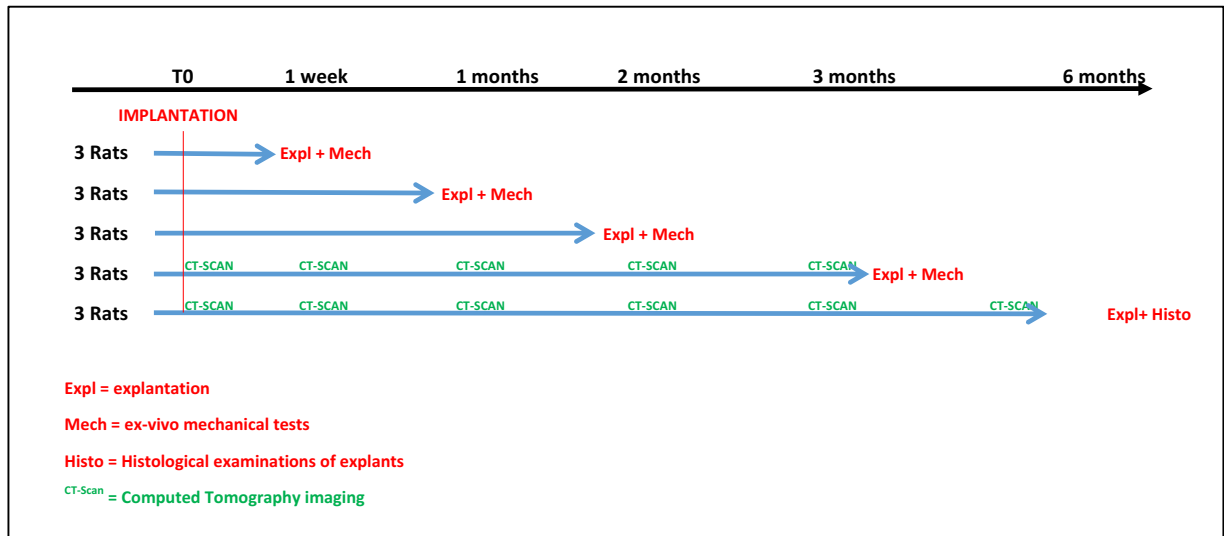


Figure S3: Experimental design, provisional table of analyzes

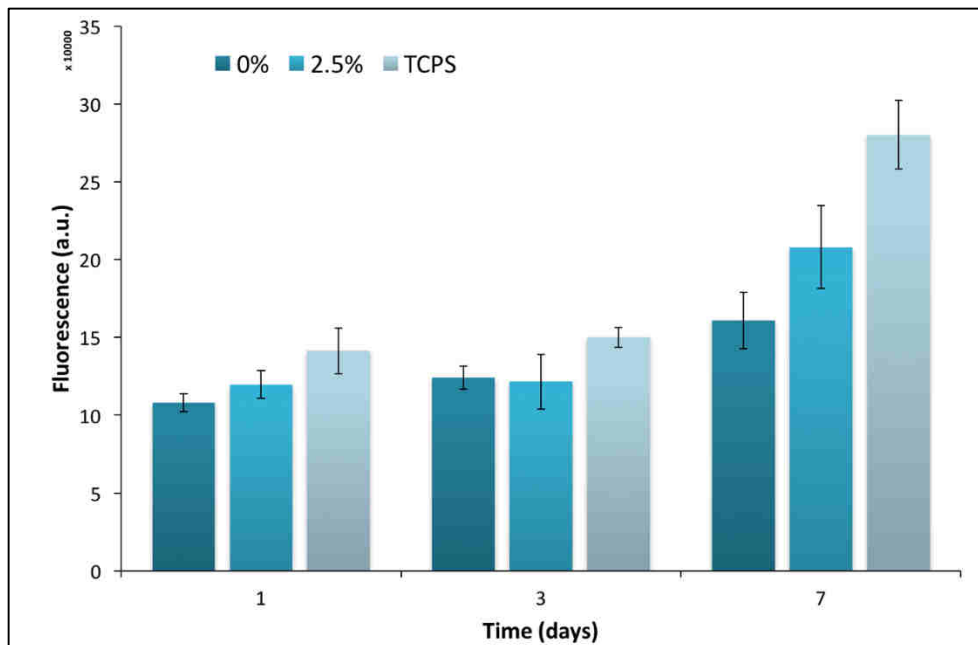


Figure S4: Cytocompatibility test. Proliferation at 1, 3 and 7 days of L929 murine fibroblasts on the radiopaque PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ (2,5 wt% iodine) blends compared to pure PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ (0 wt% iodine) and TCPS (Tissue Culture Polystyrene) positive control [192].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Ce chapitre a permis d'évaluer la faisabilité de l'implantation du RIBS chez l'homme. L'étude de la dégradation *in vitro* et *in vivo* a permis de caractériser le comportement mécanique, radiologique et histologique du biomatériau sélectionné pour l'étude (PCL-TIB₁₁/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀). Le PCL-TIB11 comme additif radio-opaque n'impacte pas les propriétés du matériau. Il reste stable au cours du temps, ce qui permet une excellente visualisation scannographique tout au long de la dégradation. Aucune différence entre la dégradation *in vivo* et *in vitro* n'a été mise en évidence. Les analyses histologiques confirment une dégradation compatible avec l'implantation humaine, sans inflammation ni fibrose trop importante. Les tests mécaniques prouvent le maintien des propriétés mécaniques pendant au moins 8 semaines, ce qui coïncide avec la durée requise par l'application. Et pour finir, l'évaluation *ex vivo* de l'implantabilité chez l'homme et l'imagerie post implantation ont démontré la faisabilité de l'utilisation du RIBS chez l'homme pour la transplantation hépatique.

Les analyses mécaniques réalisées dans cette étude ont permis de caractériser le comportement mécanique du matériau en lui-même, contrairement à celles réalisées dans le chapitre II qui évaluaient uniquement la structure (c'est à dire le RIBS mis en forme). Si les comportements mécaniques observés dans les 2 études présentent des similitudes (comme le maintien des propriétés mécaniques pendant au moins 8 semaines), nous avons également observé des discordances. En effet, dans le chapitre II, les propriétés mécaniques avaient tendance à se majorer au cours des 3 premières semaines de dégradation contrairement aux propriétés observées dans le chapitre IV, qui décroissaient de façon exponentielle à partir du premier temps de dégradation. Les 2 études ne sont pas comparables, puisque les échelles de volumes sont différentes. Dans le chapitre II, l'effet de structure entraîne une dégradation qui n'est pas uniforme, avec une dégradation initiale de l'intérieur liée à l'autocatalyse. Sur un plan mécanique, l'échelle de la structure n'est pas propice à la compréhension des comportements matériau puisque l'on moyenne des éléments qui se dégradent à une vitesse différente, sans connaître la proportion de chacun. L'essentiel pour notre application est néanmoins assuré, c'est à dire un maintien des propriétés mécaniques au-delà de 8 semaines, et une élasticité initiale compatible avec l'implantation.

La stérilisation du dispositif est le seul point du cahier des charges qui n'a pu être étudié complètement dans ce chapitre. Nous avons utilisé une stérilisation par rayons gamma, avec des doses d'irradiation préalablement déterminées par des études antérieures réalisées dans notre laboratoire [295]. Après implantation, nous n'avons pas eu de problèmes liés à un manque de stérilisation du dispositif (abcès profond, sepsis, décès). En revanche, les procédés de stérilisations entraînent une dégradation du matériau. Nous étudierons ce phénomène dans le chapitre V.

CHAPITRE V

PRÉ-REQUIS EN VUE D'UNE VALORISATION INDUSTRIELLE

CHAPITRE V : PRÉ-REQUIS EN VUE D'UNE VALORISATION INDUSTRIELLE

INTRODUCTION DU CHAPITRE V

Par définition, la prothèse biliaire interne résorbable (RIBS) est un dispositif médical (DM). La catégorie des DM regroupe une multitude de produits utilisés à des fins de diagnostics, de prévention, de contrôle ou de traitement. De la même façon qu'un médicament, le DM doit être testé d'abord *in vitro*, puis *in vivo* chez l'animal, puis chez l'homme avant son utilisation et sa mise sur le marché, afin de prouver sa sécurité, ses performances et son efficacité. Le DM est soumis à une réglementation spécifique avec un cadre légal pour lequel de nombreuses exigences doivent être respectées.

L'objectif de ce chapitre est de présenter les éléments prioritaires requis en vue d'une valorisation industrielle de notre dispositif, pour *in fine* l'utilisation chez l'homme en pratique courante. Pour cela, ce chapitre sera divisé en 4 parties :

- Premièrement, nous présenterons le dossier de conception de notre DM, c'est à dire la synthèse démontrant la conformité des résultats de la conception et du développement par rapport aux exigences auxquelles le produit doit satisfaire. Nous présenterons en parallèle les éléments essentiels de réglementation du dispositif médical. Cette partie, même si elle est centrée sur le dossier de conception du RIBS, reste très générale et réglementaire. Nous la terminerons donc sur un bilan des éléments manquants à notre dossier de conception afin de satisfaire aux exigences essentielles.
- Ensuite, nous développerons les éléments d'industrialisation, à savoir tous les éléments de développement, de synthèse, ou de conditionnement nécessaire à la fabrication industrielle du dispositif tout en respectant les normes et réglementations applicables.
- Puis, nous détaillerons le dossier technique pour l'obtention du marquage CE. Le marquage CE est une étape essentielle avant la mise sur le marché, le dossier technique permet de démontrer la conformité du DM aux exigences essentielles.
- Enfin, nous présenterons deux éléments nécessaires réglementaires à réaliser après le marquage CE et avant la mise sur le marché.

1. DOSSIER DE CONCEPTION – REGLEMENTATION DU DISPOSITIF MEDICAL

Le dossier de conception est une synthèse démontrant la conformité des résultats de la conception et du développement par rapport aux exigences listées dans les données d'entrée. Les données d'entrées de conception et développement sont les exigences auxquelles le produit doit satisfaire, provenant de plusieurs sources :

- Exigences fonctionnelles, de performance et de sécurité, selon l'usage prévu pour le produit et qui sont généralement définies dans une analyse fonctionnelle.
- Exigences normatives et réglementaires
- Exigences issues des résultats de l'analyse de risques.

Dans ce chapitre, après quelques définitions, nous exposerons les données d'entrées du dossier de conception (analyse fonctionnelle du besoin, cahier des charges fonctionnel, gestion des risques), avec les exigences normatives et réglementaires (classification du DM, exigences essentielles et normes applicables). Ensuite nous détaillerons les données de conception (spécifications du produit et performances revendiquées, essais de biocompatibilité, stérilisation et aptitude à l'utilisation).

1.1. Constitution du dossier de conception

Le dossier de conception est un livrable spécifique requis pour le développement des DM selon l'ISO 13485, dont l'objectif est d'inclure ou référencer les éléments permettant de démontrer la conformité aux exigences requises pour la conception et le développement, et les enregistrements des modifications de la conception et du développement.

Ce dossier de conception est constitué dans la mesure du possible tout au long du cycle de vie du DM. Le dossier de conception peut contenir directement les informations ou indiquer des liens vers les documents contenant les données, le but étant de ne pas contenir d'informations en doublon mais d'avoir une vue d'ensemble synthétique et consolidée des données de conception et développement.

1.2. Définition d'un dispositif médical

Par définition, une prothèse biliaire interne résorbable est un dispositif médical (DM). Les dispositifs médicaux doivent répondre aux exigences essentielles du règlement de l'union européenne (UE) 2017/745 [298].

Un DM est défini comme « *tout instrument, appareil, équipement, logiciel, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, ainsi que tout accessoire, y compris le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostique et/ ou thérapeutique, et nécessaire au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins :*

- *de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement ou d'atténuation d'une maladie,*
- *de diagnostic, de contrôle, de traitement, d'atténuation ou de compensation d'une blessure ou d'un handicap,*
- *d'étude, de remplacement ou de modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique,*
- *de maîtrise de la conception,*

et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. »

Ces définitions correspondent à des milliers de produits très divers par leur poids, leur taille, leur coût de production, mais répondant tous aux mêmes objectifs : prévenir, diagnostiquer, contrôler, atténuer une blessure, une maladie, un handicap.

Le règlement est également différent s'il s'agit d'un DM implantable actif ou d'un dispositif médical de diagnostic *in vitro*, ce qui n'est pas le cas de notre dispositif.

1.3. Analyse fonctionnelle du besoin

L'Analyse Fonctionnelle du Besoin (AFB) permet de décrire, aux différentes étapes du cycle de vie d'un produit, son environnement et les interactions entre l'environnement et le produit. L'analyse de ces interactions permet d'analyser et définir les besoins d'utilisation du produit afin d'optimiser son utilisation. L'AFB permet d'orienter le projet et est mis en forme à la fin de la phase de lancement d'un projet.

L'objectif est de modéliser les interactions d'un produit avec son environnement à différentes étapes du cycle de vie afin de déterminer le cahier des charges fonctionnel. L'Annexe V-1 présente l'AFB de notre dispositif. À partir de l'AFB et du cahier des charges fonctionnel pourra être réalisée l'analyse de risques (NF EN 16271).

1.4. Cahier des charges fonctionnel

Tout DM, selon le règlement (UE) 2017/745, doit être en mesure de prouver que les performances revendiquées ont été atteintes. Afin de prétendre à ces revendications, le dispositif médical doit répondre en tout point au cahier des charges. Le cahier des charges est présenté sous la forme d'une liste des fonctions et contraintes associées.

1.4.1. Fonctions de service

<u>Fonction 1</u> : Sécuriser l'anastomose biliaire en transplantation hépatique	Descriptif :	La pose du drain doit sécuriser l'anastomose biliaire
	Contraintes :	Éviter l'apparition de complications telles que fistule ou sténose

1.4.2. Fonctions souhaitées

<u>Fonction 1</u> : Être stérilisable	Descriptif :	Le dispositif est soumis aux rayonnements gamma
	Contraintes :	Avoir des propriétés matériau qui ne sont pas altérées par l'irradiation
<u>Fonction 2</u> : Être conforme aux exigences	Descriptif :	Le produit conçu respecte les réglementations applicables
	Contraintes :	Identifier les références applicables
<u>Fonction 3</u> : Être utilisé sans danger	Descriptif :	Rédaction d'une notice d'utilisation, étiquetage
	Contraintes :	Identifier de manière exhaustive les mauvaises situations d'utilisation potentielles

1.4.3. Fonctions attendues

<u>Fonction 1</u> : Être biorésorbable	Descriptif :	Doit se dégrader complètement en métabolites biocompatibles en 6 mois
	Contraintes :	Ne pas induire de réaction immunitaire ou tumorale ni de réaction inflammatoire démesurée, se dégrade sans macro-particules et sans obstruer les voies biliaires
<u>Fonction 2</u> : Être biocompatible	Descriptif :	N'induire aucun effet délétère sur l'organisme
	Contraintes :	N'induit pas de réaction immunitaire ou tumorale ni de réaction inflammatoire démesurée
<u>Fonction 3</u> : Conserver ses propriétés mécaniques au cours du temps	Descriptif :	Doit permettre de calibrer l'anastomose
	Contraintes :	Conserver ses propriétés mécaniques pendant au moins 8 semaines pour éviter les sténoses
<u>Fonction 4</u> : Avoir une élasticité compatible avec l'implantation	Descriptif :	Être suffisamment souple pour faciliter son implantation
	Contraintes :	Se rouvrir en cas de fermeture temporaire de la lumière
<u>Fonction 5</u> : Être imperméabilité	Descriptif :	Être imperméable
	Contraintes :	Maintenir ses propriétés imperméables au moins 4 semaines
<u>Fonction 6</u> : Ne pas perturber le fonctionnement normal du système biliaire	Descriptif :	Permet une fonctionnalité normale des voies biliaires
	Contraintes :	Ne pas être pro-lithiasique
<u>Fonction 7</u> : Être visible par imagerie médicale conventionnelle	Descriptif :	Permet la visualisation du dispositif
	Contraintes :	Les particules radio-opaques ne doivent pas migrer dans l'organisme

1.5. Gestion des risques

L'objectif de l'analyse de risques est de présenter les dangers identifiés lors de la conception, la fabrication et l'utilisation du DM. Les risques sociétaux sont traités indépendamment de ceux du produit (ISO 14971 et ISO 31000).

Le diagramme d'Ishikawa (**Figure V-1**) est un outil visuel permettant de mettre en évidence les causes qui ont une influence sur le DM fabriqué, et ce, de sa conception jusqu'à sa livraison au client. Il est utilisé comme support de travail pour l'élaboration d'une analyse AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité). Il s'agit d'une méthodologie d'analyse des problèmes potentiels de fiabilité. Elle permet de :

- Identifier les risques associés au produit et à son procédé de production ;
- Évaluer la criticité de ces risques ;
- Déterminer les outils, mesures ou actions à entreprendre pour abaisser cette criticité à des valeurs acceptables.

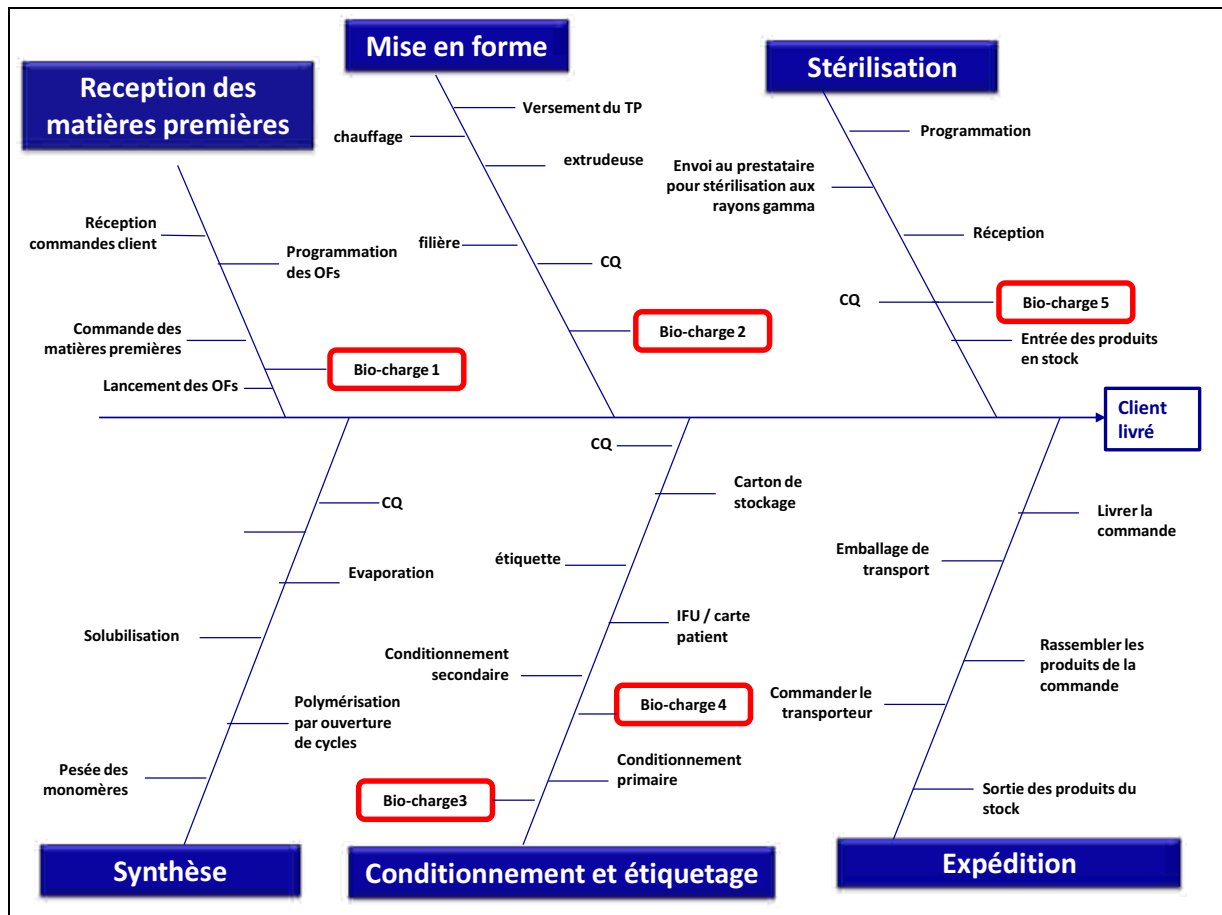


Figure V-1 : Diagramme d'Ishikawa, ou diagramme de cause à effet. Représente également le procédé de production avec les étapes où sont prélevés les échantillons pour la validation de la détermination de la bio-charge.

1.6. Classification

Les DM autres que les DM de diagnostic in vitro, sont répartis en quatre classes dénommées classe I, classe IIa, classe IIb et classe III (**Tableau V-1**). L'appartenance d'un dispositif à l'une ou l'autre de ces classes est déterminée conformément aux règles de classification du nouveau règlement européen 2017/745 [298]. Ces règles tiennent compte de la dangerosité des dispositifs médicaux quant à leur destination. Si une démonstration supplémentaire à celle du règlement venait à être nécessaire, le guide d'application des directives applicables aux DM « *MEDDEV 2.4/1 Rev. 9/06/2010* » peut apporter une aide à la classification des dispositifs médicaux. Notre dispositif selon le règlement (UE) 2017/745 est un DM de classe III.

Evaluation du risque	Classe du dispositif médical
Risque potentiel faible	Classe I
Risque potentiel modéré	Classe IIa
Risque potentiel élevé	Classe IIb
Risque potentiel critique	Classe III

Tableau V-1 : Classification des dispositifs médicaux

1.6.1. Définitions (en souligné ce qui concerne notre dispositif)

- **La durée d'utilisation.** On distingue les dispositifs médicaux utilisés en continu pendant moins d'une heure (temporaire), utilisés pendant une durée de 30 jours maximum (court terme) et utilisés pendant plus de 30 jours (long terme).

- **Le caractère invasif ou non, type d'invasivité.** Les dispositifs médicaux peuvent être développés dans l'objectif de pénétrer partiellement ou en totalité dans l'organisme, soit par le biais d'un orifice ou bien par la surface du corps, il s'agit d'un dispositif médical invasif. Les dispositifs invasifs de type chirurgicaux sont présents dans l'organisme dans le cadre d'un acte chirurgical.

1.6.2. Règles de classification, (selon le chapitre 5 - annexe VIII [298])

« **3.1.** Les règles de classification s'appliquent en fonction de la destination des dispositifs ».

« **3.5.** Si plusieurs règles ou, dans le cadre d'une même règle, plusieurs sous-règles s'appliquent au même dispositif du fait de la destination de celui-ci, la règle ou la sous-règle qui s'applique est la plus stricte, le dispositif étant classé dans la classe la plus élevée ».

« **3.6.** Pour le calcul de la durée visée à la section 1, on entend par utilisation en continu :

a) la durée totale d'utilisation du même dispositif sans tenir compte d'une interruption temporaire d'utilisation au cours d'une procédure ou du retrait temporaire pour le nettoyage ou la désinfection du dispositif. Le caractère temporaire de l'interruption de l'utilisation ou du retrait est établi au regard de la durée de l'utilisation avant et après la période pendant laquelle l'utilisation est interrompue ou le dispositif est retiré; et

b) l'utilisation accumulée d'un dispositif destiné par le fabricant à être immédiatement remplacé par un autre du même type ».

Règles 1 à 4 : Dispositifs non invasifs. Non applicable au RIBS qui est un dispositif invasif de type chirurgical.

Règle 8 : « *Tous les dispositifs implantables et les dispositifs invasifs de type chirurgical pour un usage à long terme relèvent de la classe IIb, sauf : s'ils ont un effet biologique ou sont absorbés en totalité ou en grande partie, auxquels cas ils relèvent de la classe III* ». Notre dispositif est destiné à être absorbé en totalité par l'organisme.

Règle 14 : « *Tous les dispositifs incorporant comme partie intégrante une substance qui, utilisée séparément, peut être considérée comme un médicament, y compris un médicament dérivé du sang ou du plasma humain, et dont l'action est accessoire à celle des dispositifs, relèvent de la classe III* ». Non-applicable à notre dispositif.

Règle 18 : « *Tous les dispositifs fabriqués à partir de tissus ou de cellules d'origine humaine ou animale, ou de leurs dérivés, non viables ou rendus non viables, relèvent de la classe III, sauf si ces dispositifs sont fabriqués à partir de tissus ou de cellules d'origine animale, ou de leurs dérivés, non viables ou rendus non viables et sont des dispositifs destinés à entrer en contact uniquement avec une peau intacte* ». Non-applicable à notre dispositif.

1.7. Exigences essentielles/Normes applicables

Les exigences essentielles auxquelles doivent répondre les dispositifs médicaux sont présentes dans l'annexe I de la directive. Elles découlent de la classification, impactant les données de conception relatives au DM. Les exigences essentielles sont les conditions techniques et cliniques auxquelles doivent répondre les DM. Elles permettent d'assurer la sécurité et la performance du dispositif médical et décrivent les modalités de mise sur le marché.

1.7.1. Généralités sur les directives européennes applicables

La « naissance » de la réglementation du DM est très récente par rapport à celle du médicament. En 1985, est signé l'acte unique européen prévoyant que les Etats Membres de l'Union Européenne s'engagent à constituer un marché unique pour permettre la libre circulation des personnes, des biens, des capitaux et des services. Cet acte introduit une réglementation communautaire harmonisée garantissant un niveau de protection élevé en matière de sécurité et de santé. Il s'agit du concept de la « nouvelle approche » mis en œuvre par la Commission Européenne :

- La liberté de circulation des DM Communauté Européenne (CE) repose sur le principe de reconnaissance mutuelle entre les Etats membres.
- Le marquage CE matérialise la conformité à des exigences essentielles, en sachant que le respect des normes harmonisées européennes entraîne une présomption de conformité aux exigences essentielles correspondantes.
- Les procédures d'établissement de la conformité aux exigences essentielles imposent, dans certains cas, le recours à une tierce partie indépendante, appelée organisme notifié.

Les Directives Européennes constituent les éléments de base de la législation applicable pour les pays de la Communauté européenne. Elles sont adoptées par les instances communautaires et sont destinées à servir de dénominateur commun aux législations de chaque Etat membre avant d'être transposées en droit national.

1.7.2. Exigences essentielles de sécurité et performances

Notre DM doit obligatoirement répondre à des exigences générales en matière de sécurité et de performances. Ces exigences générales sont de trois types :

- Des exigences générales, applicables à l'ensemble des dispositifs ;
- Des exigences relatives à la conception et à la fabrication qui pourront ou non être applicables en fonction des caractéristiques du dispositif ;
- Des exigences relatives aux informations fournies avec le dispositif concernant l'étiquetage et la notice d'utilisation.

La conformité aux exigences pourra être démontrée par l'application de normes harmonisées qui donnent présomption de conformité ou par d'autres moyens sous réserve de prouver que cela permet de répondre correctement aux exigences.

Le marquage CE est le symbole visuel qui atteste de la conformité des dispositifs médicaux aux exigences générales en matière de sécurité et de performances qui leurs sont applicables.

1.8. Textes et normes applicables

Les textes réglementaires et normes applicables relatifs à la conception, la production et l'utilisation de notre DM sont regroupés dans l'**Annexe V-2**.

1.9. Spécification du produit & performances revendiquées

L'objectif est de renseigner certaines des spécifications demandées dans la documentation technique du produit (résumé des caractéristiques du dispositif médical). À partir d'une description clinique, les exigences fonctionnelles de sécurité et de performances du DM sont définies. Son contexte d'utilisation et les impératifs qui lui sont assignés doivent être spécifiés.

Le **Tableau V-2** présente les exigences fonctionnelles de performances et de sécurité dans l'environnement d'utilisation prévu du RIBS. Ces fonctions essentielles seront validées suite aux essais cliniques effectués sur le produit fini.

Fonctions	Flexibilité	Objectifs : performances attendus
Sécuriser l'anastomose	A	Eviter l'apparition de complications telles que fistules ou sténoses
Être imperméable	A	Être imperméable au moins 4 semaines
Être élastique	A	Être suffisamment élastique pour l'implantation et se rouvrir si la lumière se bouche
Être résorbable	A	Se dégrader en métabolites biocompatibles en 6 mois
Ne pas obstruer	A	Ne pas engendrer de cholestase obstructive
Être biocompatible	A	Ne pas induire de réaction immunitaire ou tumorale ni de réaction inflammatoire démesurée
Être stérile	A	Être validé comme stérile
Être visible par imagerie	A	Être visible par imagerie rayons X
Dispenser 3 tailles	B	Être disponible en 3 tailles pour s'adapter au maximum à la morphologie
Être conforme aux exigences réglementaires	A	Respecter les réglementations applicables
Garder sa couleur	C	Garder la couleur du polymère ou autre

Tableau V-2 : exigences fonctionnelles de performances et de sécurité dans l'environnement d'utilisation prévu du dispositif médical. La flexibilité des fonctions est divisée en 3 catégories : A- La fonction doit être remplie, pas de dérogation possible ; arrêt du projet. B- La fonction peut être revue ; analyse avec recherche de solutions. C- La fonction ne remet pas en cause la sécurité ou les performances du dispositif.

Le **Tableau V-3** présente les performances cliniques revendiquées par notre DM, ainsi que les objectifs. Cela a permis de déterminer les essais à réaliser pour évaluer la conformité RIBS.

L'entreprise fabricante du RIBS s'engagera à respecter ces spécifications en vue d'obtenir le marquage CE.

Performances	Objectifs	Preuves
Être dégradable	Le dispositif est biodégradable : il est complètement dégradé en 6 mois, il possède une période initiale de minimum 4 semaines d'imperméabilité, il laisse perméable les voies biliaires en se dégradant	Chap. II : Étude de dégradation <i>in vitro</i> ; caractérisation physico-chimique et biomécanique ; Chap. IV : Visualisation radiologique de la dégradation du dispositif
Être radio-opaque	Développer une prothèse visible par rayons X	Chap. IV : Visualisation du dispositif implanté dans une souris
Garder sa tenue mécanique	Le dispositif est élastique pour rétablir sa forme s'il se collabe, il est souple pour pouvoir être implanté, il conserve ses propriétés mécaniques pour calibrer l'anastomose pendant 8 semaines	Chap. III : Étude <i>in silico</i> Chap. IV : Essais de traction sur le dispositif ; Essais mécanique <i>in vitro</i> ; Essais mécanique post dégradation <i>in vivo</i> ;
Ne pas perturber le fonctionnement normal du système biliaire	Le dispositif n'est pas pro lithiasique, il ne migre pas, il ne crée pas de lésions par friction	Chap. III : Étude <i>in silico</i> À prévoir : Essais <i>in vivo</i> avec implantation biliaire

Tableau V-3 : performances cliniques revendiquées et essais réalisés pour valider les objectifs

1.10. Évaluation de la conformité du DM et marquage CE

L'évaluation préclinique est une étape indispensable pour s'assurer de la sécurité et de l'efficacité du DM. La norme internationale NF EN ISO 10993 traite de l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, et décrit les essais appropriés à mettre en œuvre selon la nature du dispositif médical. Les essais biologiques, en particulier les essais de biocompatibilité sont présentés ensuite (§ 1.11. *Essais de biocompatibilité*). Concernant les tests mécaniques, les tests réalisés dans les chapitres précédents devront être réitérés par un organisme certifié sur des machines certifiées.

Les règles d'évaluation de la conformité du DM aux exigences essentielles varient en fonction de la classe du DM et donc de leur niveau de risque. L'évaluation de la conformité des DM doit être réalisée par un organisme notifié, à l'exception des dispositifs de classe I où le fabricant s'auto-certifie.

Obligatoire et de nature réglementaire, le marquage CE représente l'engagement visible du fabricant que son produit respecte la législation européenne. Notre DM comptant parmi les classes III, un organisme notifié européen de certification devra s'occuper des procédures d'évaluation de conformité, conformément à l'annexe V du Règlement 2017/745 (conformité du DM, du système qualité du fabricant, et évaluer les sous-traitants ainsi que la documentation technique du dispositif médical). Le LNE/G-MED (« *Laboratoire National de métrologie et d'Essais/Groupement pour l'évaluation des dispositifs médicaux* ») est le seul organisme notifié qualifié en France au titre des directives européennes applicables au DM. Une fois obtenu, le marquage CE confère la libre circulation du dispositif sur l'ensemble du territoire de l'Union Européenne. Le certificat de marquage CE est valable 5 ans au maximum. Il est renouvelable.

1.11. Essais de biocompatibilité

Conformément au cahier des charges élaboré pour ce produit, des essais de biocompatibilité sont à réaliser selon la norme ISO 10993, afin de prouver que notre DM ne présente aucun effet adverse sur l'organisme.

1.11.1. Principes généraux

La biocompatibilité n'est pas une propriété du matériau mais la résultante de son interaction avec les tissus vivants auquel il est exposé. Il est essentiel de mettre en évidence la biocompatibilité du matériau utilisé dans le cadre d'une gestion des risques appropriée [299]. Les risques biologiques potentiels pris en compte pour cette évaluation incluent les effets à court terme et les effets toxiques à long terme ou spécifiques.

Une étude de biocompatibilité a 2 objectifs principaux :

- Prouver l'absence vraisemblable d'effet délétère du matériau ou dispositif considéré,
- Accumuler les données prédictives du comportement *in vivo* du matériau ou dispositif considéré.

Dans la stratégie globale d'évaluation de la biocompatibilité, il faut tenir compte non seulement des caractéristiques et des propriétés (chimiques, toxicologiques, physiques, électriques, morphologiques et mécaniques) des matériaux, mais aussi la tolérance de ces matériaux. Ces propriétés sont appréhendées au cours de l'évaluation biologique *in vitro* avant d'envisager les études *in vivo* chez l'animal.

La biocompatibilité générale regroupe donc 4 points :

- Études physico-chimiques du biomatériau (*faits pour le RIBS, cf. chapitre II et IV*),
- Études de cytotoxicité (*faits pour le RIBS, cf. chapitre IV, Figure IV-S4*)
- Des études du potentiel de mutagenèse (*restent à faire pour le RIBS*)
- Des études du potentiel de carcinogenèse, (*restent à faire pour le RIBS*).

Ainsi des essais à court et à long terme sont destinés à évaluer les risques potentiels des matériaux et/ou des produits finis, à apprécier leur fonctionnalité et à prédire au mieux leur comportement en situation clinique.

1.11.2. Essais de cytotoxicité

Lors d'une étude préliminaire, nous avons réalisé des essais *in vitro* de cytocompatibilité du polymère d'intérêt PCL-TIB/PLA₅₀-b-PEG-b-PLA₅₀ (teneur en iode 2,5), selon les recommandations (ISO 10993-5:2009). Nous avons réalisé un essai de prolifération de fibroblaste murin (souche L929), qui confirmait la croissance des fibroblastes et donc la cytocompatibilité (*cf. chap. IV, Figure IV-S4 ou Annexe I-6 [192]*).

1.11.3. Estimation des risques et choix des essais

L'estimation des risques s'exprime en termes de matières premières (composition chimique et propriétés structurales) et de procédé de fabrication (utilisation d'additifs ou polluants, sites de fabrication etc.). Elle s'établit en fonction des données existantes sur le matériau, soit, le néant pour notre produit.

Afin de couvrir ces risques, plusieurs actions sont nécessaires :

- Caractérisation (*ISO 10993-18, -19 et ISO 10993-17*)
- Tests biologiques (*ISO 10993-3, -4, -5, -6, -10, -11, -12, -20 et ISO 17025*)

La caractérisation physico-chimique des matériaux est une étape préliminaire essentielle du processus d'évaluation biologique. L'étendue de la caractérisation chimique requise dépend des données de sécurité précliniques et cliniques et des données de toxicologie existantes, ainsi que de la nature et de la durée du contact du dispositif médical avec le corps. Notre dispositif étant constitué d'un matériau innovant, aucunes données précliniques, cliniques ou toxicologiques ne sont pré-existantes.

Les principaux risques biologiques à évaluer sur le dispositif médical dans le cadre d'une soumission aux autorités compétentes sont présentés dans le **Tableau V-4**. Dès lors que les données suffisantes à la preuve de l'innocuité de notre dispositif médical seront collectées, les tests in vivo seront proscrits. A résultat équivalent, les tests in vitro seront priorités.

ESSAIS BIOLOGIQUES	DESCRIPTION DE L'ESSAI
Cytotoxicité	Détermination de la lyse cellulaire et de l'inhibition de la croissance cellulaire lorsque le DM est en contact avec les cellules [192]
Sensibilisation	Essais d'irritation liée au contact du DM sur la peau ou les muqueuses chez l'animal et chez l'homme Essai d'hypersensibilité retardée chez l'animal (ISO 10993-10)
Irritation ou réaction intradermique	Evaluation de la réaction locale du tissu aux extraits du DM (ISO 10993-10)
Toxicité systémique aiguë	Evaluation des effets néfastes dus à une exposition unique ou répétées du DM pendant une durée < 24H sur un modèle animal (ISO 10993-11)
Toxicité subchronique et subaiguë	Evaluation de l'exposition répétée due au DM chez l'animal pendant une période allant de 24H jusqu'à, au plus, 10% de la vie totale de l'animal (ISO 10993-11)
Génotoxicité	Evaluation des mutations géniques, et de toutes altérations de l'ADN ou des gènes causés par le dispositif médical (ISO 10993-3)
Implantation	Evaluation des effets biologiques locaux sur tissus vivants du DM dans un site d'implantation ou un tissu approprié pour l'application prévue (ISO 10993-6)
Dégradation	Identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères (ISO 10993-13)

Tableau V-4 : Principaux tests d'évaluation biologique d'un DM classe III.

1.12. Stérilisation

La stérilisation de l'implant est nécessaire pour éviter une infection après implantation. Il est toujours difficile de choisir « la » méthode de stérilisation des dispositifs médicaux : chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Pour notre application, l'autoclavage est proscrit car les polymères sont dénaturés par la chaleur. Les procédés chimiques ne peuvent également pas être utilisés car ils détériorent les polymères. Deux types de stérilisation à froid sont disponibles pour les dispositifs médicaux : celle utilisant le peroxyde d'hydrogène sous vide d'air et l'ionisation par des faisceaux d'électrons, de rayons X ou gamma.

La stérilisation basse température au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un procédé couramment utilisé en stérilisation centrale des hôpitaux pour les dispositifs médicaux implantables. Il remplace petit à petit la stérilisation à l'oxyde d'éthylène dont l'inconvénient majeur est une désorption nécessaire de 4 jours des dispositifs exposés. Ce temps est nécessaire pour éliminer les résidus toxiques générés par l'oxyde d'éthylène et rend difficile la gestion des stocks de dispositifs médicaux stériles. Le cycle de stérilisation est rapide (20 min), il comprend des phases de vide partiel et d'injection d'un plasma d' H_2O_2 . Même si ce procédé de stérilisation est considéré comme « à froid », l'injection de plasma d' H_2O_2 se fait à une température d'environ $50^\circ C$. Cette température est supérieure à la température de transition (T_g) de notre matériau, ce procédé n'est donc pas adapté pour notre polymère.

1.12.1. Utilisation des rayonnements ionisants

La stérilisation par rayons ionisants peut se faire via un rayonnement alpha émis par des noyaux d'hélium, un rayonnement bêta émis par des électrons ou un rayonnement radioactif gamma. L'irradiation par un faisceau d'électrons accélérées est également une méthode de stérilisation, avec une facilité d'utilisation dans une ligne de production, mais la pénétration des rayons reste limitée en surface. L'utilisation d'une source radioactive de rayonnement gamma permet de s'affranchir du problème de pénétration du rayonnement dans la matière (pour les matériaux denses comme notre dispositif). La source que nous avons utilisée au CEA-ARC Nucleart est le ^{60}Co , fabriqué dans un réacteur nucléaire par collision neutronique avec du ^{59}Co . Sa demi-vie est d'environ 5 ans, ce qui permet de gérer relativement facilement les sources. Il émet lors de sa désintégration 2 γ de 1,17 et 1,33 MeV pour donner un noyau stable de ^{60}Ni . Ces photons de haute énergie interagissent avec la matière en ionisant les noyaux des atomes qu'ils rencontrent et en éjectant un électron : c'est le phénomène d'ionisation.

L'unité internationale de mesure de dose absorbée est le Gray (Gy), qui correspond à la quantité d'énergie absorbée par unité de masse (en J/Kg). Les doses appliquées sont variables selon d'effet que l'on veut obtenir : détruire les microorganismes pathogènes, de réduire le nombre de microorganismes totaux, permettre une plus longue conservation d'un produit alimentaire, etc...

1.12.2. Effets des rayonnements ionisants sur les polymères

Les radiations ionisantes permettent de stériliser les dispositifs médicaux thermosensibles, mais la dose d'irradiation émise est susceptible d'entraîner une scission et une réticulation des chaînes de polymère. Ce phénomène de dégradation des chaînes peut entraîner une variation des propriétés physico-chimiques du matériau et par conséquent également mécanique. La présence de cycles ou de structures en anneau dans les polymères à tendance à les rendre neutres vis-à-vis des rayonnements ionisants, car les radiations sont en quelque sorte absorbées et résonnent avec la structure du cycle lui-même. C'est le cas par exemple du polystyrène, ou des silicones.

L'irradiation gamma des DM constitués de PLA entraînent une dégradation des chaînes. L'irradiation crée des radicaux libres au sein des chaînes de polymères, qui peuvent réagir l'un avec l'autre ou bien initier des réactions entre les chaînes de polymères, modifiant ainsi les propriétés du matériau. Plus la longueur des motifs entre les fonctions esters augmente, plus le polymère est stable vis-à-vis des radiations. Ainsi, le PLA est sensible aux radiations gamma puisque la structure est composée d'un seul groupe méthylène (substitué) entre deux fonctions esters, et d'une fonction méthyle [300]. La dégradation des chaînes est évidemment dépendante de la dose d'irradiation appliquée au matériau. Plus la dose est faible, plus l'impact de la stérilisation est négligeable. De manière générale, l'irradiation gamma entraîne une scission des chaînes accompagnée d'une diminution des masses molaires moyennes selon deux mécanismes de dégradation : la scission des chaînes et la scission des chaînes par abstraction d'un hydrogène [301]. Pour un polymère semi-cristallin, tel qu'un PLA₁₀₀, des radicaux sont formés uniformément dans les zones amorphes et cristallines. Cependant, la proximité des chaînes dans les zones cristallines favorise l'exclusion de l'oxygène, des stabilisants et des espèces radicalaires actives. Les zones cristallines favorisent donc les radicaux libres piégés à se recombiner réduisant ainsi le nombre de scission des chaînes. La dégradation entraîne une diminution des masses molaires moyennes, accompagnée d'une diminution de la température de transition vitreuse [302], d'une perte de résistance à la traction. Le principal impact d'une stérilisation par irradiation gamma est la scission des chaînes. Cependant, en fonction de la structure du matériau on peut assister aussi à une réticulation des chaînes, notamment pour un matériau amorphe tel que le PLA₅₀ auquel cas on observe une augmentation de masse molaire et une augmentation de la dispersité.

1.12.3. Effets sur les propriétés du matériau

La stérilisation est un procédé indispensable pour la commercialisation d'un dispositif médical. Il est nécessaire d'étudier et d'anticiper l'impact du procédé de stérilisation après stérilisation. En parallèle à l'étude de dégradation in vivo présentée dans le chapitre IV, nous avons voulu étudier l'impact de la stérilisation sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques du matériau. Selon la même méthodologie que celle présentée dans le chapitre IV (cf. §2.4), nous avons testé les propriétés de 3 éprouvettes de PCL-TIB/PLA-PEG-PLA avant stérilisation et de 3 éprouvettes après stérilisation. Les implants étaient stérilisés avec une dose de 25kGy de rayons gamma. Nous n'avons pas pu étudier la dose adéquate pour une stérilisation optimale par manque d'échantillons et par manque de disponibilités au CEA pour l'irradiation. Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas pu étudier les variations des propriétés du matériau en fonction des doses d'irradiation. La dose d'irradiation de 25kGy a été choisie par rapport aux travaux précédents réalisés dans notre laboratoire [295].

Le **Tableau V-5** présente les résultats des caractéristiques physico-chimiques du polymère avant et après irradiation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart type. Sont répertoriés la masse molaire moyenne en poids (M_w), la masse molaire en nombre (M_n), la dispersité ($D = M_w/M_n$) correspondant à la dispersion de longueur des chaînes de polymères au sein d'un échantillon, et les rapports LA/EG et LA/CL des unités monomères présentes dans le matériau. Même si l'impact de l'irradiation sur la masse est assez important, il reste limité en termes de coupures de chaînes. Il y a environ une coupure par chaîne si l'on considère que M_n a été divisée par deux, soit si on considère le LA avec $M = 72$ g/mol et un degré de polymérisation initial ≈ 1250 ($M_n = 90\,000$ g/mol), un taux de coupure < 1 %. Cette dégradation entraîne une légère diminution de D . Les rapports LA/EG et LA/CL sont équivalents entre les 2 groupes, ce qui, comme attendu, confirme que la composition générale n'est pas impactée par la stérilisation.

	Avant irradiation γ (Moyenne \pm écart-type)	Après irradiation γ (Moyenne \pm écart-type)
M_n (g/mol)	89547 \pm 3391	47702 \pm 43
M_w (g/mol)	201953 \pm 375	99814 \pm 1017
Dispersité (\bar{D})	2,27 \pm 0,1	2,09 \pm 0,02
LA/EG	9,09 \pm 0	9,38 \pm 0,1
LA/CL	12,5 \pm 0	12,5 \pm 0
E charge 5%	0,88 \pm 0,06	0,44 \pm 0,05
E charge 10%	0,23 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01

M_w : Masse molaire en poids, M_n : masse molaire en nombre, E : Module de Young

Tableau V-5 : propriétés physico-chimiques du matériau (PCL-TIB/PLA-PEG-PLA) avant et après irradiation.

La **Figure V-2** représente les résultats des essais mécaniques de traction comparatifs avant et après irradiation. Sur la **Figure V-2A**, qui représente les courbes de contrainte-déformation pour les essais cycliques de charge, on constate que l'aspect général des courbes est similaire, avec un léger assouplissement et des contraintes maximales qui sont un peu moins importantes après irradiation. Concernant les propriétés mécaniques, les modules de Young (E), calculés à partir des courbes, sont plus faibles après irradiation (**Tableau V-5**). Cela traduit un assouplissement du matériau lié à un processus de dégradation. Les courbes de relaxations (**Figure V-2B**) sont équivalentes, ce qui signifie que l'irradiation ne modifie pas le comportement visqueux du matériau.

L'irradiation à la dose de 25K Gy entraîne un processus de dégradation du polymère, qui doit être connu, mais qui reste maîtrisé, puisqu'il ne modifie pas les propriétés mécaniques du matériau.

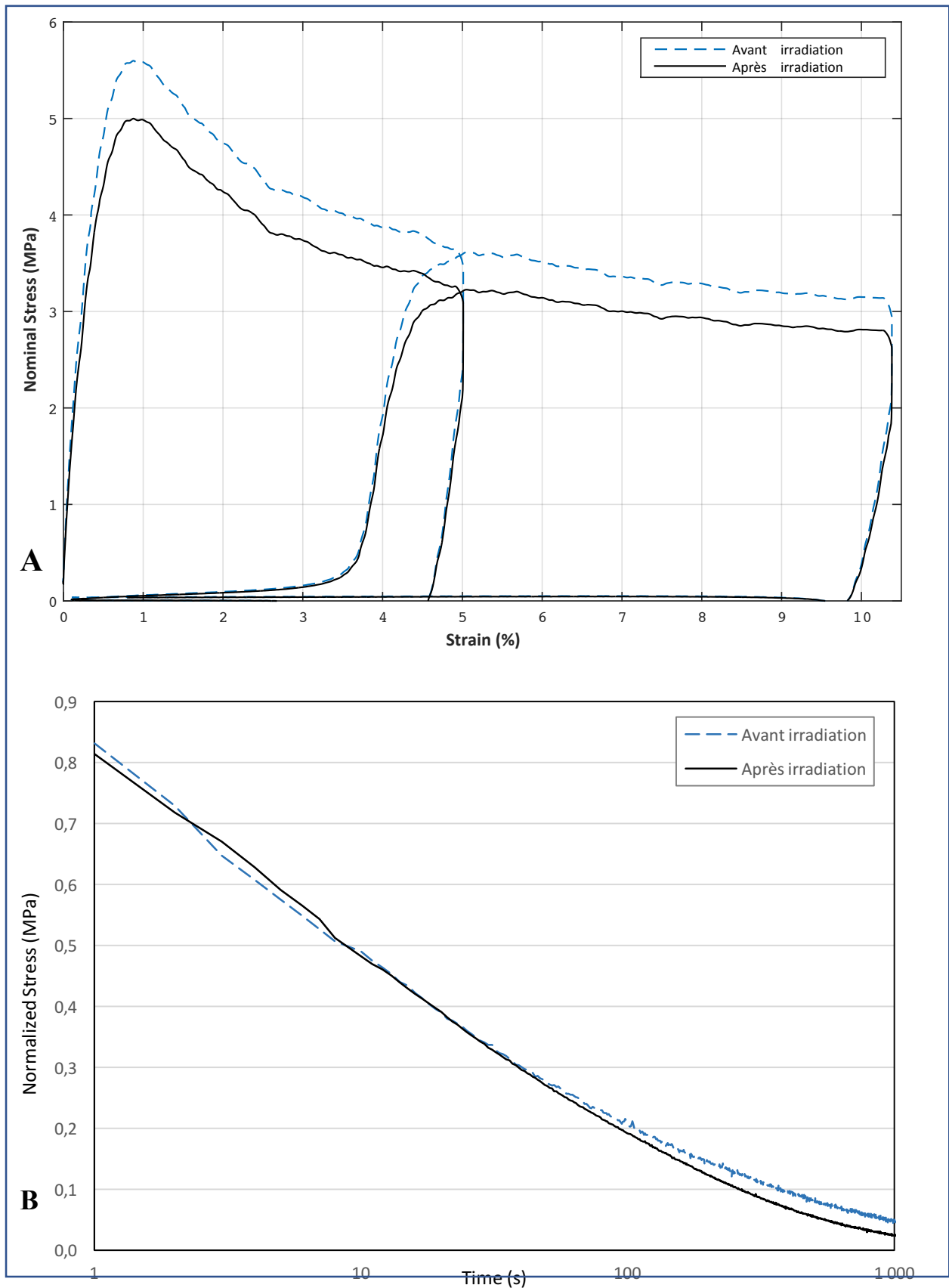


Figure V-2 : résultats des essais mécaniques de traction comparatifs avant et après irradiation. A. Courbes de contrainte-déformation pour les essais cycliques de charge. B. Courbe normalisée pour les essais de relaxation à 5% de déformation.

1.12.4. Dose stérilisante et dose maximale acceptable

L'irradiation est indispensable pour la stérilisation, mais a un impact sur les propriétés du matériau. Il est donc important de déterminer la dose d'irradiation possible, qui est compris entre la dose stérilisante et la dose maximale acceptable (**Figure V-3**).

Pour identifier la dose stérilisante, une étude mesurant la charge biologique au sein du dispositif après stérilisation à différentes doses d'irradiation doit être réalisée. La mesure de la charge biologique permet de dénombrer la population de micro-organismes viables sur les films de copolymère non stériles et stériles. Il est possible de déterminer la dose stérilisante permettant d'obtenir un niveau d'assurance de la stérilité (NAS) du dispositif médical. Le NAS constitue la probabilité de présence d'un seul micro-organisme viable sur le matériau après stérilisation, puisqu'il existe une probabilité non nulle de survie d'un micro-organisme après stérilisation et ce quel que soit le traitement appliqué. On considère qu'un NAS de 10^{-6} assure la stérilité d'un dispositif médical. La norme ISO 11137-2 présente la dose stérilisante nécessaire qui permet d'obtenir un niveau d'assurance de la stérilité (NAS) de 10^{-2} en fonction de la charge biologique initiale du matériau utilisé. Si une centaine de films est soumis à cette dose et subit ensuite un test de stérilité concluant, alors il est possible de déterminer la dose stérilisante pour n'importe quel NAS souhaité. La norme présente ainsi une méthode pour déterminer la dose stérilisante d'un dispositif médical.

Pour identifier la dose maximale acceptable, des tests sont normalement effectués sur les produits finis et emballés une fois le procédé de production validé. Ces tests doivent vérifier que les performances du produit restent conformes aux spécifications.

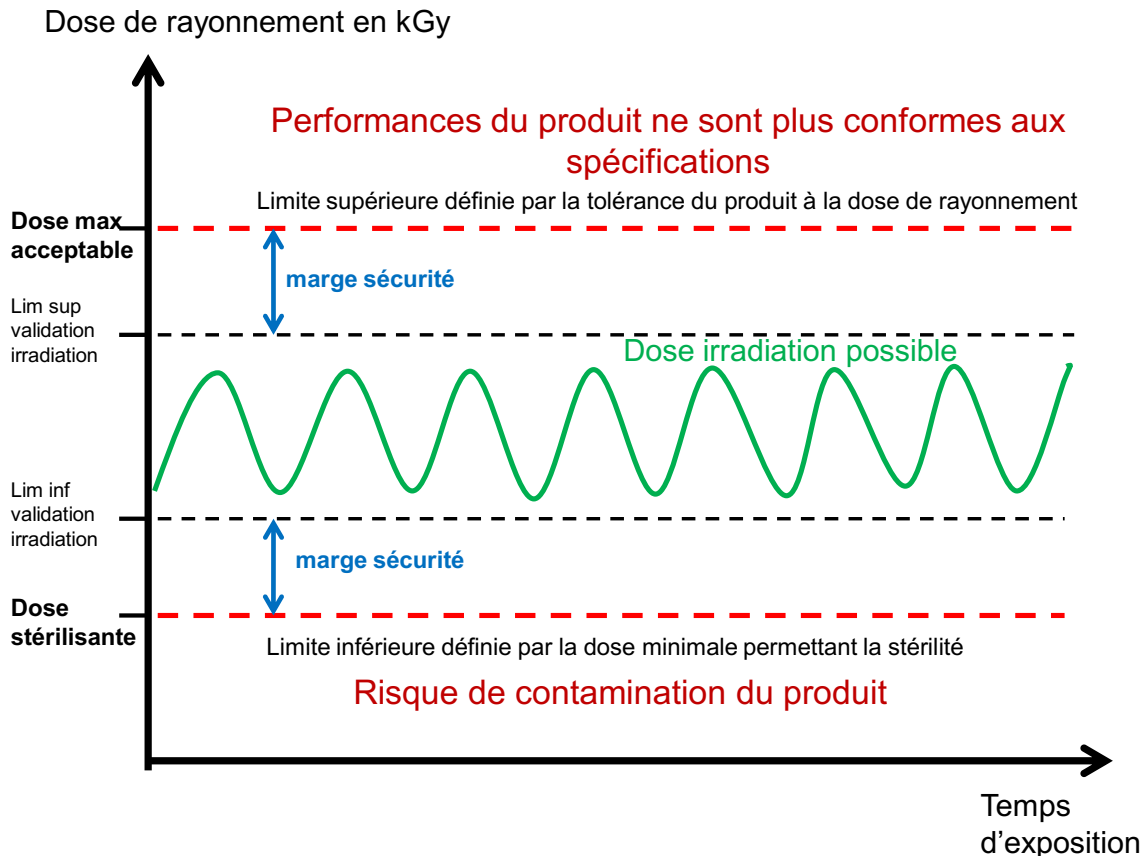


Figure V-3: Représentation de la dose stérilisante et de la dose maximale acceptable en fonction de la dose de rayonnement

1.12.5. Validation de la stérilisation

Pour une commercialisation du dispositif médical, la production industrielle et la mise en forme de ce dernier doivent être réalisées en salle blanche avec une contamination bactérienne inférieure à celle présente lors de la synthèse et de la mise en forme du dispositif médical réalisée au laboratoire. Pour valider la dose stérilisante et le maintien de la stérilité au cours du stockage du dispositif médical, des tests de bio-charge sont réalisés au cours du processus de fabrication à plusieurs étapes afin de maîtriser le procédé (**Figure V-1**). Les étapes auxquels sont réalisés les prélèvements pour valider la détermination de l'échantillon sont :

- Biocharge 1 : au niveau de la réception des matières premières ;
- Biocharge 2 : après la mise en forme ;
- Biocharge 3 : au niveau du conditionnement primaire ;
- Biocharge 4 : après conditionnement primaire ;
- Biocharge 5 : après stérilisation.

La stérilisation est finalement validée si le produit répond aux spécifications suivantes :

- Le produit conserve ses propriétés telles que décrites dans les spécifications après stérilisation ;
- Le produit est stérile après le procédé de stérilisation.

1.13. Aptitude à l'utilisation

1.13.1. Objectif

L'objectif est d'évaluer et de réduire les risques provoqués par les problèmes d'aptitude à l'utilisation, il est complémentaire de la démarche de management des risques. Ce processus est associé à une utilisation normale du dispositif, c'est-à-dire une utilisation correcte comprenant des erreurs d'utilisation. Il peut être utilisé pour identifier mais n'évalue pas et ne réduit pas les risques associés à une utilisation anormale (ISO 62366).

Le fabricant doit établir tout au long du cycle de vie du produit, un processus permettant :

- D'identifier les dangers et les situations dangereuses liées à l'interface utilisateur ;
- De mettre en place des mesures pour maîtriser les risques liés à cette interface ;
- De vérifier et valider les mesures de maîtrise du risque.

1.13.2. Spécification d'application : Profil des utilisateurs prévus

Le patient n'est jamais l'utilisateur de l'implant. L'utilisateur est la personne exploitant ou manipulant le dispositif médical, c'est à dire les chirurgiens et les IBODE (Infirmiers de bloc opératoire diplômé d'état).

Les personnes manipulant le DM doivent posséder à minima le degré d'instruction requis par leur fonction et une connaissance préalable de la notice d'instructions, de la technique opératoire et des étiquettes.

1.13.3. Identifications des fonctions

- Chirurgien :
- Implantation du RIBS ;
 - Contrôle pré et post opératoire de la position du RIBS ;
 - Lecture de la notice d'instruction et de la technique opératoire.

- IBODE :
- Ouverture de l'emballage / Manipulation des implants ;
 - Transport du RIBS au sein du bloc opératoire ;
 - Lecture de la technique opératoire et de l'étiquette.

1.13.4. Analyse du risque : Identification des pratiques à risque

Certaines pratiques à risque ont été dégagées lors de la gestion des risques utilisation :

- L'ouverture du conditionnement primaire, qui pourrait être à risque par rapport à un emballage trop résistant à l'ouverture qui pourrait entraîner la chute du drain ;
- La pose du drain, qui pourrait induire une plastification ou un dommage induit par un mauvais geste du chirurgien ;
- La découpe du drain, qui pourrait ne pas aboutir à une taille adéquate ou un bord acéré ;
- Choix du diamètre du drain, qui pourrait ne pas aboutir à une taille idéale ou ne pas couvrir la mensuration nécessaire du patient.

1.13.5. Analyse du risque : cas le plus défavorable

Les scénarii d'utilisations les plus défavorables raisonnablement prévisibles sont les suivants :

Profil « Chirurgien » défavorable :

- Chirurgien peu expérimenté ;
- Non formé à l'utilisation des produits avant de les utiliser ;
- Fatigue physique et mentale ;
- Bloc opératoire bruyant et encombré.

Profil « IBODE » défavorable :

- Peu expérimenté ;
- Non formé à l'utilisation des produits ;
- Fatigue physique et mentale ;
- Bloc opératoire encombré et bruyant.

Intervention en utilisation normale défavorable :

- Utilisation d'un RIBS de diamètre trop élevé ;
- Intervention sur un conduit biliaire fragile ;
- Transplantation hépatique difficile avec complication ;
- Infection dû à une perte éventuelle de la stérilité.

1.13.6. Exigences d'interfaces utilisateur pour les fonctions principales de service

Fonctions principales	Exigences de l'interface
Proposer une notice d'instruction	Lecture aisée dans des conditions normales de visibilité. Utilisation de logos normalisés. Conception de la notice selon les normes.
Étiqueter	Lecture aisée dans des conditions normales de visibilité. Utilisation de logos normalisés.
Informers de la technique opératoire	Lecture aisée dans des conditions normales de visibilité. Rédaction détaillée et claire de la technique opératoire. Utilisation de logos normalisés. Conception selon les normes.
Stocker les implants stériles au sein du centre hospitalier	Stockage et identification aisés des emballages. L'étiquette du packaging doit être facilement lisible (visibilité de la gamme, la référence et les dimensions).
Transporter les implants stériles du lieu de stockage jusqu'au bloc opératoire	Transport aisé du drain conditionné (poids, forme...).
Ouvrir l'emballage & accéder à implant	L'ouverture du conditionnement de stérilité doit être rapide et simple. L'utilisateur ne doit pas se blesser en ouvrant la boîte ni trouer ses gants.

Toutes les actions nécessaires seront prises pour satisfaire les exigences.

1.13.7. Validation de l'aptitude à l'utilisation

Les méthodes de validation de l'aptitude à l'utilisation peuvent être quantitatives ou qualitatives. La validation de l'aptitude à l'utilisation peut être réalisée dans une installation de laboratoire, dans un environnement d'utilisation simulé ou dans l'environnement d'utilisation réel.

Un test dans un environnement clinique simulé est réalisé par des volontaires non membres de l'équipe de conception et non formé à la technique opératoire. Ce test permet d'observer les interactions entre l'utilisateur et le dispositif dans des conditions proches des conditions normales d'utilisation. Il peut également permettre d'identifier des risques d'erreur d'utilisation non précédemment identifiés. Au cours de ce test, les actions effectuées par les testeurs, ainsi que leurs potentielles erreurs d'utilisation et leurs ressentis sont enregistrés par des observateurs, et permettent notamment d'alimenter le dossier de gestion des risques.

Le test d'aptitude à l'utilisation doit s'effectuer dans les pires des cas, c'est à dire faire réaliser les tests par des volontaires, non membres de l'équipe de conception, non formés à la technique opératoire et non habitués à manipuler le drain. Ils devront suivre un scénario d'utilisation défini au préalable afin de simuler la réalisation d'une technique opératoire impliquant le produit. Ces volontaires reproduisant un scénario du pire des cas valident l'aptitude à l'utilisation pour l'ensemble des profils.

Pour la validation, une mise en exercice d'un essai clinique simulé concernant le dispositif est réalisée. Le drain est implanté sur un cadavre par une équipe de bloc opératoire non formée et étrangère à la conception et à la manipulation du dispositif. Une attention doit être portée à tous les retours post simulation de l'équipe médicale ayant fait l'essai d'implantation du dispositif.

1.14. Synthèse du dossier de conception : que nous manque-t-il pour le RIBS ?

Cette première section du chapitre V, même si elle est centrée sur le dossier de conception du RIBS, reste très générale et réglementaire. Les évaluations pré-cliniques réalisées dans les chapitres II à IV n'ayant pas été réalisées selon le plan du dossier de conception, pour plus de lisibilité, voici un bilan sur les principaux essais pré-cliniques manquants afin de satisfaire aux exigences essentielles. Les 3 axes suivants n'ont pas pu être complètement investigués :

La fonction « *Ne pas perturber le fonctionnement normal du système biliaire* » du cahier des charges (§1.4) n'a pas été évaluée complètement. En effet, nous n'avons pas pu implanter le RIBS *in vivo* dans la voie biliaire. Une étude *in vivo* chez l'animal serait nécessaire pour évaluer le maintien du fonctionnement normal du système biliaire après implantation.

Concernant les tests de biocompatibilité (§1.11), nous n'avons réalisé que l'évaluation de la cytotoxicité. Tous les autres essais biologiques mentionnés dans le tableau V-4 sont à réaliser en respectant les exigences des normes correspondantes.

À propos de la stérilisation (§1.12), la dose stérilisante et la dose maximale acceptable doivent encore être déterminées. Concernant la dose stérilisante, une étude mesurant la charge biologique au sein du dispositif après stérilisation à différentes doses d'irradiation doit être réalisée, afin de déterminer la dose stérilisante permettant d'obtenir un niveau d'assurance de la stérilité du RIBS. Pour identifier la dose maximale acceptable, des tests sont normalement effectués sur les produits finis et emballés une fois le procédé de production validé. Ces tests doivent vérifier que les performances du produit restent conformes aux spécifications.

2. INDUSTRIALISATION

La transposition d'échelle de la conception en laboratoire à la fabrication industrielle présente des contraintes à anticiper avant un développement industriel du copolymère. Le procédé de fabrication doit être reproductible pour permettre son industrialisation, sans altération des propriétés du dispositif, tout en respectant les normes et textes réglementaires. Nous présentons dans cette partie les éléments importants pour l'industrialisation du produit de la conception au conditionnement final.

2.1. Réalisation du produit

En aval de la conception, il s'agit d'identifier et sélectionner les différents fournisseurs et prestataires présentant les compétences nécessaires pour contribuer à l'élaboration et au suivi du produit dans le respect des normes et réglementations applicables.

Les différentes étapes de réalisation sont : synthèse à partir des matières premières, mise en forme, emballage primaire, emballage secondaire, étiquetage, stérilisation, et contrôle final. Les différentes étapes peuvent être sous traitées. La société de fabrication devra être qualifiée dans le médical, certifiée ISO 13485 et posséder une salle blanche validée pour la production propre en sortie de chaîne. L'usine de production doit être certifiée GMP (*Good Manufacturing Practices*), qui permet de garantir la fabrication et la livraison selon les règles HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*). Il s'agit de règles de bonnes conduites qui reposent sur 7 principes et qui suivent un ordre précis de 12 étapes d'analyses. Ces principes et étapes se focalisent sur la réduction au maximum des risques (biologiques, chimiques et physiques, virus, bactéries, pesticides, additifs, emballage...). Concernant la stérilisation, les exigences réglementaires et certifications sont régies par les normes ISO 13485:2012, ISO 9001 et ISO 11137-1.

Chaque fournisseur/sous-traitant, quel qu'en soit sa nature (de service, de matières premières, etc.), doit être soumis à une évaluation par le service Qualité-fournisseurs de l'entreprise gérant la conception. Cette évaluation repose sur plusieurs critères valables en amont et en aval de leur sélection. Les critères d'évaluation dits « pré-sélectifs » permettent, sur la base du cahier des charges correspondant à l'appel d'offre en cours, d'évaluer les différents fournisseurs y ayant répondu. Les critères d'évaluation dits « post-sélectifs » sont régulièrement estimés dès lors qu'un fournisseur est sélectionné et qu'un contrat entre les deux parties est entré en vigueur.

2.2. Cahier des charges technique et dessins industriels du dispositif

Lors de la demande auprès du prestataire usineur les exigences de géométrie et matériau devront être formulées par un cahier des charges techniques sans ambiguïté, donnant les tolérances de fabrications acceptables, sur un dessin industriel du ou des pièces demandées. Le dispositif médical est un drain tubulaire de dimension 150 millimètres (mm) de longueur avec un diamètre dispensé en trois tailles exprimées en Charrière (CH) : CH8, CH10 et CH12. L'unité CH correspond au calibre extérieur, et équivaut à 1/3 mm. L'épaisseur du drain est fixée à 0,5 mm. Ces dimensions sont basées sur la taille habituelle des voies biliaires et sur les retours d'expérience des drains non résorbables déjà existants.

2.3. Synthèse industrielle

La transposition d'échelle d'une synthèse par polymérisation en masse présente des contraintes à anticiper avant un développement industriel du copolymère. Le procédé de polymérisation en masse à l'échelle industrielle est différent du procédé utilisé à l'échelle laboratoire.

A l'échelle industrielle, la synthèse est réalisée dans des cuves métalliques et non dans des ballons de polymérisation. La modification du procédé de synthèse peut donc avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques du copolymère synthétisé. De plus, il est nécessaire de travailler avec des matières premières de grade pharmaceutique, en respectant les limites autorisées par la pharmacopée européenne. Les catalyseurs métalliques sont autorisés par la pharmacopée européenne jusqu'à un seuil limite. Par exemple, selon la dose journalière administrée, seule une quantité inférieure à 200 ppm d'octanoate d'étain est autorisée par la pharmacopée européenne. Dans le cas d'une purification du copolymère, l'utilisation de solvants est également hautement réglementée. Le taux de conversion de la synthèse doit également être maximal. A grande échelle, un faible taux de conversion entraîne le recours à une distillation sous vide pour éliminer les monomères résiduels n'ayant pas réagi.

Le coût d'une synthèse par polymérisation par ouverture de cycle et la modification chimique de la PCL commerciale pour obtenir la PCL-TIB sont également à prendre en compte dans la mise au point des conditions d'extrapolation de la synthèse. Le temps de polymérisation, le recours à une étape de purification du copolymère et la modification chimique de la PCL sont trois facteurs entraînant une hausse des coûts de production.

2.4. Mise en forme industrielle, le moulage par injection

Sur le même principe que pour la synthèse du polymère, la technique de mise en forme doit être transposée de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle. Elle doit être reproductible et permettre une production en grand nombre. L'**Annexe I-5** détaille les différentes techniques de mises en forme des copolymères qui ont été envisagées pour notre dispositif. C'est finalement la technique de moulage par injection qui a été sélectionné pour l'industrialisation du dispositif. Ce procédé consiste à injecter un matériau thermoplastique dans un moule afin que celui-ci prenne la forme du moule après refroidissement. Les détails techniques de ce procédé sont également présentés dans l'**Annexe I-5**.

2.5. Conditionnement/étiquetage/emballage

2.5.1. Carte d'implant

Selon le **règlement (UE) 2017/745 article 18**, une carte d'implant est à fournir au patient, avec les informations suivantes :

- Les informations permettant l'identification du dispositif
- Les mises en garde, précautions ou mesures à prendre à l'égard des interférences réciproques avec des sources ou conditions d'environnement extérieures
- Toute information sur la durée de vie prévue du DM et le suivi nécessaire

2.5.2. Système d'emballage

Le système d'emballage doit être conçu de façon à réduire le plus possible les risques pour la santé vis-à-vis de l'utilisateur et du patient. Il doit assurer une protection physique et maintenir l'intégrité du système de barrière stérile, et ce même dans les conditions les plus défavorables.

2.5.3. Exigences sur le conditionnement et l'étiquetage

La société de production doit répondre à chaque exigence de la norme ISO 11607 sur le conditionnement et l'étiquetage, en mentionnant les rapports d'essais correspondants.

L'étiquette apposée sur le dispositif doit contenir les informations nécessaires pour que celui-ci puisse être identifié, utilisé correctement et en toute sécurité, en tenant compte de la formation et des connaissances des utilisateurs potentiels.

Selon le **règlement (UE) 2017/745 article 20** : Le marquage CE est apposé de façon visible, lisible et indélébile sur le dispositif ou sur le conditionnement qui en garantit la stérilité.

3. DOSSIER TECHNIQUE EN VUE DU MARQUAGE CE

Le dossier technique est constitué par le fabricant et permet de démontrer la conformité du DM aux exigences essentielles. Ce dossier n'est pas à la disposition du client mais peut l'être sur demande des autorités de contrôle. Il permettra ensuite le marquage CE.

Nous proposons dans cette section un plan complet de la documentation technique du DM, (*en reprenant volontairement certains éléments déjà cités auparavant*) :

- Informations relatives au fabricant et déclaration d'engagement
- *Check list* » des exigences essentielles
- Liste des normes applicables
- Notice d'utilisation et projet d'étiquetage
- Gestion des risques
- Dossier de fabrication
- Évaluation préclinique
- Evaluation clinique
- Suivi post-commercialisation

3.1. Informations relatives au fabricant et déclaration d'engagement

Le fabricant doit répondre aux exigences des normes internationales en termes de management de la qualité pour la conception, fabrication et commercialisation du dispositif médical. Ces certifications sont attribuées par l'organisme notifié français, le LNE/G-MED.

La documentation technique doit présenter en préambule le nom et l'adresse du responsable de la mise sur le marché, ainsi que les déclarations suivantes :

- Conformité aux exigences essentielles de la directive,
- Véracité du contenu du dossier et des certifications,
- Matéiovigilance,
- Mise à jour du dossier,
- Exclusivité de la demande (déclaration écrite).

3.2. « Check list » des exigences essentielles

Une fois la documentation technique complète et à la veille de la demande de marquage CE ou de l'auto-certification, le fabricant doit remplir la check-list des exigences essentielles correspondant à l'annexe I de la Directive 2006/42/CEE. En face de chaque exigence définie par la directive, le fabricant mentionne le ou les mode(s) de preuve qui y réponde(nt).

3.3. Liste des normes applicables

Au démarrage et tout au long du développement d'un nouveau DM, le fabricant doit tenir à jour la liste des normes applicables au projet (**Annexe V-2**)

3.4. Notice d'utilisation et projet d'étiquetage

Le dossier technique doit comporter un exemplaire du projet d'étiquetage, et la notice d'utilisation. (*cf* § 2.5).

3.5. Gestion des risques

Conformément au règlement (UE) 2017/745, une gestion de risques doit être conduite et mise à jour par le fabricant pour chaque produit. La maîtrise des risques constitue un élément incontournable tout au long du cycle de vie du DM. (*cf* § 1.5).

L'étude de l'aptitude à l'utilisation et avec l'analyse des risques qui en découlent (*cf* § 1.12) est aussi à spécifier dans le dossier technique.

3.6. Dossier de fabrication

Le dossier de fabrication comprend différentes rubriques :

- Description et composition du DM.
- Description des étapes de fabrication, validations associées (stérilisation, etc.).
- Spécifications et contrôles des matières premières, de l'emballage et du produit fini.
- Études de stabilité réalisée sur le DM permettant de conclure à une durée de péremption du produit.

Le dossier de fabrication doit être conforme aux instructions de fabrication, de contrôle, au dossier de lot, etc.

3.7. Évaluation pré-clinique

Les exigences essentielles imposent au fabricant une évaluation préclinique de conformité du DM (*cf § 1.9*), avec une caractérisation physico chimique (*cf chapitres II et IV*) et des tests biologiques de biocompatibilité (*cf § 1.10*). L'**Annexe V-3** est un récapitulatif de tous les tests pré-cliniques.

3.8. Evaluation clinique

3.8.1. Description

L'évaluation clinique du dispositif médical est réalisée après analyse des données des études précliniques ayant démontrés une totale biocompatibilité et une totale conformité aux exigences applicables. Conformément à l'article 61 et à l'annexe XIV du Règlement Européen 2017/745, le fabricant doit réaliser une évaluation clinique afin de déterminer dans les conditions normales d'utilisation :

- Le dispositif est conçu, fabriqué et conditionné comme spécifié ;
- Les performances cliniques du dispositif sont conformes à celles assignées ;
- Etablir et vérifier les bénéfices cliniques du dispositif tel que spécifiés ;
- La sécurité d'utilisation du dispositif ;
- Les éventuels effets secondaires indésirables, et déterminer s'ils constituent un risque au regard des performances assignées.

À noter que l'évaluation clinique doit être anticipée pour accéder au marché européen d'une part, et pour l'obtention du remboursement par l'Assurance maladie d'autre part.

Classiquement, deux types d'études sont envisageables (**Figure V-4**) :

- Études de faisabilité : réalisés immédiatement après la phase préclinique. Il s'agit d'essais prospectifs non comparatifs pour répondre aux questions portant sur la sélection des patients, la mise au point de la technique, l'efficacité clinique et mettre en évidence des risques éventuels.
- Études pour la démonstration du bénéfice clinique : le plus souvent sous la forme d'études randomisées et contrôlées, préférablement multicentriques (pour faciliter le recrutement). Le groupe témoin correspondra au traitement de référence selon les données de littérature.

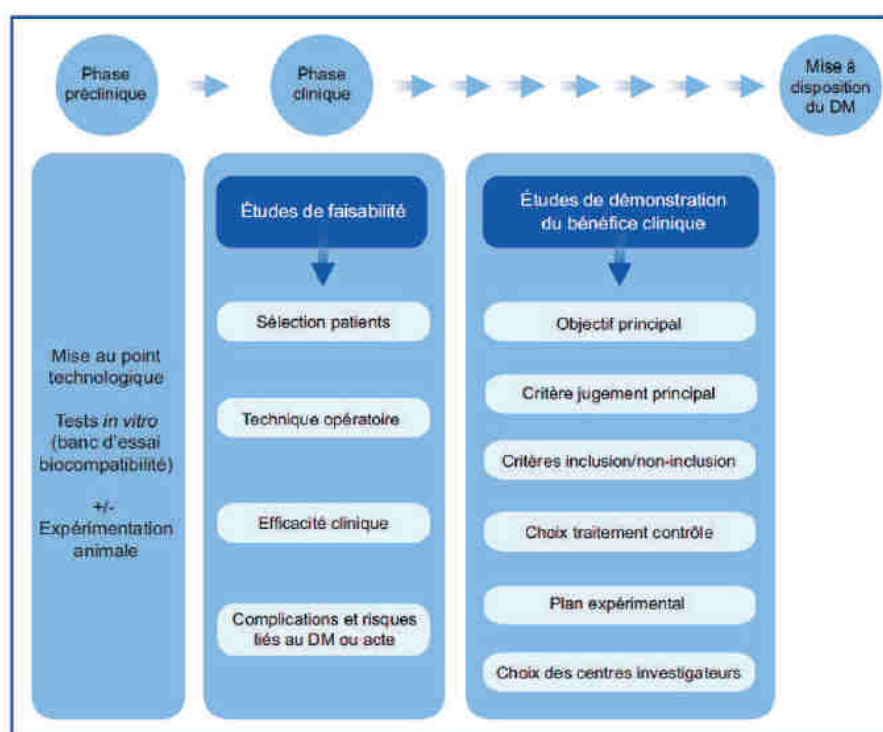


Figure V-4 : Etapes clés du développement clinique du dispositif médical selon la Haute Autorité de Santé

3.8.2. Voie bibliographique

La revue de la littérature est la 1^{ère} étape pour établir si la comparaison à un DM existant peut être justifiée ou si un essai clinique doit être envisagé. La revue de la littérature permet de justifier la décision de ne pas conduire un essai clinique. Dans notre cas, l'investigation clinique est obligatoire puisque qu'il s'agit d'un DM innovant qui n'a jamais été testé chez l'homme, et puisqu'il s'agit classe III.

3.8.3. Règlements

Le fabricant doit préciser et justifier le niveau de preuve clinique nécessaire pour démontrer la conformité aux exigences générales pertinentes en matière de sécurité et de performances du dispositif médical d'intérêt. A cet effet, il planifie, réalise et documente l'évaluation clinique réalisée. Cette dernière s'inscrit dans la démarche d'obtention du marquage CE du dispositif, en vue de sa mise sur le marché. Les investigations cliniques sont conçues et conduites de manière à garantir la protection des droits, la sécurité, la dignité et le bien-être des personnes y participant. Un examen éthique est réalisé conformément au droit national.

Le consentement éclairé doit être écrit, daté et signé par la personne qui effectue l'entretien et le participant à l'essai clinique. Le participant doit comprendre :

- La nature, l'objectif, les avantages et les risques de l'investigation clinique ;
- Ses droits concernant sa protection et son droit de refuser ou de se retirer à tout moment sans encourir de préjudice et sans devoir se justifier ;
- Les conditions dans lesquelles l'investigation clinique a lieu ainsi que sa durée ;
- Le rapport d'investigation clinique et un résumé seront mis à disposition dans le système électronique relatif aux investigations cliniques.

3.8.4. Démarches préalables au commencement de la recherche

Préalablement à la mise en place d'une recherche biomédicale portant sur un DM, le demandeur doit enregistrer l'essai clinique à l'ANSM par voie électronique. L'évaluation clinique du dispositif est inscrite dans le système électronique relatif aux investigations cliniques, selon l'article 73 du Règlement Européen 2017/745. Ce numéro d'identification permet d'échanger les informations relatives à l'étude clinique entre les Etats membres selon les articles 70 et 76. Ce numéro permet notamment la notification d'événements indésirables graves et de défauts du dispositif. Les informations accessibles dans le système électronique ne peuvent être consultées que par les Etats membres et la Commission s'il est justifié d'en préserver la confidentialité du grand public (protection des données à caractère personnel, protection d'informations confidentielles de nature commerciale...).

Le promoteur peut ensuite préparer son dossier de soumission aux différentes instances. Les obligations du promoteur avant de débiter une recherche biomédicale en France sont les suivantes :

- Autorisation de l'ANSM
- Avis favorable du Comité de protection des Personnes (CPP)
- Information des établissements dans lesquels se déroulent la recherche
- Déclaration auprès du conseil national ou départemental de l'ordre des médecins
- Conformité à la méthodologie de référence MR001 (CNIL)
- Obtention de l'assurance

3.8.5. Mise à jour des données

Conformément aux textes réglementaires, l'évaluation clinique est un processus actif dans le cycle de vie du dispositif médical. À ce titre, il est réalisé annuellement des suivis cliniques post marché afin de réunir les données cliniques basée sur l'utilisation du dispositif médical marqué CE. L'objectif étant de confirmer la performance clinique et la sécurité à travers la durée de vie attendue du dispositif médical, l'acceptabilité des risques identifiés et de détecter les risques émergents sur la base d'éléments factuels, grâce à la maîtrise de la matériovigilance.

3.8.6. Documents transmis au LNE/G-MED :

Les documents suivants sont transmis au LNE/G-MED pour évaluation :

- Plan d'évaluation clinique ;
- Rapport d'évaluation clinique ;
- Toutes les données utilisées pour démontrer l'évaluation clinique ;
- Statut réglementaire en cours de validité ;
- Les qualifications des évaluateurs.

3.9. Suivi post-commercialisation

L'évaluation clinique est un élément important des exigences essentielles et elle s'établit en phase de pré-lancement. La directive 2007/47/CE oblige également le fabricant à mettre en place un système de surveillance du marché après le lancement du DM. En effet, des événements peu fréquents ou des dommages peuvent apparaître lors de l'utilisation du DM à grande échelle, alors qu'une étude clinique est réalisée sur un petit nombre de malades.

Différents moyens sont à la disposition du fabricant afin de collecter des informations pour vérifier que son DM présente toujours un rapport bénéfice-risque favorable :

- Retour de matériovigilance,
- Retour des réclamations qualité,
- Sondages des clients,
- Enquête des patients et utilisateurs,
- Revue de la littérature,
- Suivi clinique de post-lancement au travers de la prolongation du suivi des patients inclus dans l'étude clinique ou d'une étude observationnelle après le lancement., etc.

L'organisme notifié est censé contrôler à l'occasion des audits de suivi du système de gestion de la qualité et de la conformité, l'établissement par le fabricant de procédures adéquates afin d'assurer cette exigence. Le suivi clinique post-commercialisation n'est pas obligatoire pour les dispositifs dont la performance clinique à long terme et la sécurité ont déjà été identifiés lors d'une utilisation précédente du dispositif. L'organisme notifié doit approuver la stratégie prise par le fabricant.

4. APRÈS LE MARQUAGE CE

Après le marquage CE, et avant la mise sur le marché, la mise en place d'un système de matériovigilance est obligatoire. Car même si le DM présente toutes les caractéristiques réglementaires ayant permis le marquage CE, son utilisation en pratique courante peut révéler des dysfonctionnements rares. Afin que les Autorités Compétentes puissent remplir leur rôle de contrôle du marché, une déclaration à l'ANSM est obligatoire avant la mise sur le marché.

4.1. Mise en place d'un système de Matériovigilance

4.1.1. Signalement d'un incident

Le fabricant se doit de traiter tout incident signalé au travers d'une réclamation ou autre formalisation par les utilisateurs, les autorités compétentes, les distributeurs ou les responsables commerciaux. Les incidents détectés par les fournisseurs ainsi que les non-conformités détectées en interne, qui peuvent avoir un impact sur les DM sont reportés au fabricant pour évaluation.

Le signalement est renseigné et communiqué à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), à l'autorité compétente du ou des pays de l'occurrence de l'incident, ainsi qu'à l'organisme notifié.

4.1.2. Incident à reporter

Un incident doit remplir simultanément les trois critères ci-dessous pour être reporté :

- A. Un événement anormal est relevé (dégradation de la performance...);
- B. Le fabricant du dispositif médical peut être mis en cause ;
- C. Un incident ou un risque d'incident grave mettant en cause un dispositif, ayant entraîné ou susceptible d'entraîner la mort ou la dégradation grave de l'état de santé d'un patient, d'un utilisateur ou d'un tiers.

4.1.3. Les délais

Les délais applicables pour la déclaration initiale d'un incident pour tous les cas sont :

- IMMEDIATEMENT (sans retard injustifié) mais au plus tard 2 jours calendaire après la prise de conscience de la menace, si menace sérieuse pour la santé publique.
- IMMEDIATEMENT (sans retard injustifié) après que le fabricant ait établi un lien entre le dispositif et l'évènement, mais au plus tard 10 jours calendaires écoulés après la date de prise de conscience de l'évènement, pour les incidents ayant causés un décès ou une détérioration sérieuse imprévue de l'état de santé.
- IMMEDIATEMENT (sans retard injustifié) après que le fabricant ait établi un lien entre le dispositif et l'évènement, mais au plus tard 30 jours calendaire écoulés après la date de prise de conscience de l'évènement pour les autres cas.

4.1.4. Gestion du risque produit

Une évaluation de l'impact de l'incident détecté doit être fait pour déterminer si des mises à jour doivent être faites sur l'analyse de risque du dispositif médical. Tout évènement faisant suite à une utilisation potentiellement incorrecte du dispositif médical doit être évaluée par le fabricant par une analyse du risque menant à des actions préventives et correctives.

4.2. Déclaration préalable de mise sur le marché

Afin que les Autorités Compétentes puissent remplir leur rôle de contrôle du marché, il est demandé aux fabricants de DM de les informer de la mise sur le marché sur le territoire français médicaux concernés. Pour un DM implantable classe III, il est nécessaire de faire une déclaration du DM concerné à l'ANSM lors de la 1^{ère} mise en service sur le marché français. Le déclarant peut être le fabricant, le mandataire ou le distributeur responsable.

CONCLUSION DU CHAPITRE V

Nous avons développé dans ce chapitre tous les éléments requis en vue d'une valorisation industrielle de notre dispositif, pour *in fine* l'utilisation chez l'homme.

Le dossier de conception permet de faire la synthèse de tous les éléments démontrant la conformité des résultats de la conception et du développement par rapport aux exigences initiales et réglementaires. Certains essais pré-cliniques n'ont pas pu être accomplis dans cette thèse, et seront à réaliser ultérieurement. Une étude *in vivo* chez l'animal avec implantation du RIBS dans les voies biliaires sera nécessaire pour évaluer le maintien du fonctionnement normal du système biliaire après implantation. Hormis les essais de cytotoxicité, les essais biologiques permettant de tester la biocompatibilité restent à réaliser. Enfin la dose stérilisante et la dose maximale acceptable d'irradiation est à évaluer.

L'étape de valorisation industrielle impose ensuite toujours dans un cadre réglementaire de transposer la fabrication de l'échelle du laboratoire de recherche à l'échelle industrielle.

Le dossier technique du DM pourra être ensuite constitué à partir de tous ces éléments, en vue du marquage CE, prérequis essentiel pour la mise sur le marché du dispositif. Ces 2 derniers aspects nécessitent soit le soutien d'un industriel, soit la création d'une entreprise *startup* afin de pouvoir fabriquer le RIBS et envisager des essais cliniques chez l'homme avec un dispositif non marqué CE. L'objectif étant de constituer le dossier technique afin de demander le marquage CE.

Nous n'avons pas développé les aspects marketing de notre dispositif. Le dossier marketing doit être réalisé par l'entreprise en charge du développement du dispositif, en parallèle au dossier de conception, puisqu'il va lui permettre de valider une « stratégie marketing » avec stratégie d'implantation sur le marché du dispositif médical dans le domaine de la transplantation hépatique. Le dossier marketing comprend une étude de marché avec une analyse de faisabilité. Le diagnostic ainsi établi permet de vérifier la cohérence du projet avec les moyens de l'industriel notamment d'un point de vue technologique, économique, juridique, organisationnelle et commercial. Une budgétisation (conception, production, marketing) est ensuite réalisée afin de déterminer la viabilité économique et organisationnelle du projet. La dernière étape du dossier marketing est la constitution du dossier de remboursement, étape essentielle pour la stratégie de vente vis à vis des centres hospitaliers acheteurs. En cas de demande de prise en charge par l'assurance maladie, les DM sont soumis à des évaluations complémentaires à celles relatives au marquage CE, prérequis indispensable, qui dépendent de procédures d'inscription et de tarification variées.

CONCLUSION GÉNÉRALE

PERSPÉCTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Les complications biliaires sont considérées comme le véritable « talon d'Achille » de la TH. Elles exposent le patient à une morbi-mortalité importante. Le bénéfice de l'implantation d'un drain biliaire interne (IBS) lors de la réalisation de l'anastomose biliaire a été récemment démontré afin de réduire les complications après TH. Le drain IBS en silicone utilisé en pratique clinique nécessite une procédure d'ablation endoscopique, intervention qui n'est pas dénuée de complications. L'implantation peropératoire d'un IBS biorésorbable (RIBS) permettrait d'éviter ces inconvénients tout en sécurisant l'anastomose biliaire au même rôle que l'IBS. De plus, chez des patients transplantés avec des délais de cicatrisation retardés, la bioprothèse polymère pourrait également favoriser la régénération tissulaire en servant de support et en interagissant avec l'épithélium biliaire.

L'objectif de notre travail de thèse était de développer un prototype de prothèse biliaire résorbable (RIBS) répondant aux objectifs très strictes liés à l'implantation et au suivi en TH. Pour parvenir à ce résultat, il y avait toutefois de nombreux paramètres à contrôler et un cahier des charges à respecter.

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés mécaniques et physico-chimiques du RIBS PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ au cours de la dégradation *in vitro* pour l'application biliaire. Aucune influence du pH en termes de cinétique de dégradation n'a été mise en évidence. Les éléments suivants du cahier des charges ont été validés par cette étude : une dégradation complète en 6 mois sans macro-particules, une imperméabilité pendant minimum 4 semaines, une conservation des caractéristiques mécaniques pendant 8 semaines.

Dans un deuxième temps, à partir d'une étude histomorphologique, nous avons décrit les propriétés mécaniques de la voie biliaire principale chez l'homme, avec la mise en évidence de propriétés d'anisotropie ainsi qu'un comportement viscoélastique. Cela nous permettra à l'avenir de reproduire le comportement mécanique à l'aide d'une modélisation numérique. Nous avons également mis en évidence l'impact de la congélation et de la formolisation sur les

propriétés mécaniques, avec une perte des propriétés liée aux procédés de conservation serait due à une altération de la microarchitecture tissulaire.

Dans un troisième temps, nous avons évalué la faisabilité de l'implantation du RIBS chez l'homme. L'étude de la dégradation *in vitro* et *in vivo* a permis de caractériser le comportement mécanique, radiologique et histologique du biomatériau sélectionné pour l'étude (PCL-TIB₁₁/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀). Le PCL-TIB₁₁ comme additif radio-opaque n'impacte pas les propriétés du matériau. Il reste stable au cours du temps, ce qui permet une excellente visualisation scannographique tout au long de la dégradation. Les analyses histologiques confirment une dégradation compatible avec l'implantation humaine, sans inflammation ni fibrose trop importante. Les tests mécaniques prouvent le maintien des propriétés mécaniques pendant au moins 8 semaines, ce qui coïncide avec la durée requise par l'application. Et pour finir, l'évaluation *ex vivo* de l'implantabilité chez l'homme et l'imagerie post implantation ont démontré la faisabilité de l'utilisation du RIBS chez l'homme pour la transplantation hépatique.

Enfin, en vue d'une valorisation industrielle, nous avons étudié la réglementation applicable au développement du RIBS comme dispositif médical implantable, le dossier de conception et le dossier technique nécessaire pour le marquage CE. Pour finaliser le dossier de conception avant d'envisager les essais cliniques, 3 éléments de l'évaluation préclinique sont manquants. Une étude *in vivo* chez l'animal avec implantation du RIBS dans les voies biliaires sera nécessaire pour évaluer le maintien du fonctionnement normal du système biliaire après implantation. Hormis les essais de cytotoxicité, les essais biologiques permettant de tester la biocompatibilité restent à réaliser. Enfin la dose stérilisante et la dose maximale acceptable d'irradiation est à évaluer.

PERSPECTIVES

À ce stade, la poursuite du développement du RIBS nécessite le soutien d'un industriel ou la création d'une entreprise *startup* afin de pouvoir fabriquer le RIBS et envisager des essais cliniques chez l'homme avec un dispositif non marqué CE. Le nombre de transplantations hépatiques peut paraître faible pour pousser un industriel à miser sur le marché du RIBS, en particulier dans le contexte actuel. En effet, l'entreprise Abbott Vascular qui fabriquait des stents vasculaires résorbables pour usage clinique a annoncé en septembre 2017 qu'elle mettait fin aux ventes commerciales de ces dispositifs à cause de faibles ventes. Le domaine endovasculaire était pourtant en avance dans le domaine avec l'utilisation de ce genre de DM en pratique clinique depuis quelques années, avec un marché théorique assez conséquent en termes d'indications. Même si la recherche dans ce domaine pour les applications digestives n'est pas aussi avancée, elle ne doit pas s'arrêter à ce stade pour autant. Les indications d'utilisation de ce genre de dispositifs peuvent et doivent être élargies. Pour le système biliaire, les stents biliaires résorbables auto-expansibles peuvent être utilisés pour traiter en endoscopie les sténoses biliaires bénignes. Avec le développement de l'ingénierie tissulaire, le RIBS pourrait être utilisé comme matrice pour réparer les voies biliaires dans certaines indications, les plaies ou les nécroses de la voie biliaire, les sténoses ischémiques, ou même les atrésies des voies biliaires chez les enfants. En chirurgie pancréatique également un dispositif semblable au RIBS pourrait être utile. En effet après certaines chirurgies nécessitant une résection pancréatique avec reconstruction pancréatico-digestive, la fistule pancréatique post-opératoire est redoutée car responsable de morbi-mortalité. Un drain résorbable pourrait être implanté en peropératoire pour sécuriser l'anastomose pancréatique. Il existe d'ailleurs des recherches dans le domaine [287,303]. Après avoir évoqué toutes ces indications potentielles, on peut espérer que le RIBS (ou dispositif équivalent) a un avenir dans l'arsenal thérapeutique des pathologies biliaires ou digestives.

RÉFÉRENCES

- [1] Haute Autorité de Santé. Conférence de consensus, Indications de la transplantation hépatique. Lyon: 2005.
- [2] Starzl TE, Putnam CW, Hansbrough JF, Porter KA, Reid HA. Biliary complications after liver transplantation: with special reference to the biliary cast syndrome and techniques of secondary duct repair. *Surgery* 1977;81:212–21.
- [3] Williams R, Smith M, Shilkin KB, Herbertson B, Joysey V, Calne RY. Liver transplantation in man: the frequency of rejection, biliary tract complications, and recurrence of malignancy based on an analysis of 26 cases. *Gastroenterology* 1973;64:1026–48.
- [4] Calne RY, McMaster P, Portmann B, Wall WJ, Williams R. Observations on preservation, bile drainage and rejection in 64 human orthotopic liver allografts. *Ann Surg* 1977;186:282–90.
- [5] Vallera RA, Cotton PB, Clavien P-A. Biliary Reconstruction for liver Transplantation and Management of Biliary n.d.
- [6] Ayoub WS, Esquivel CO, Martin P. Biliary complications following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2010;55:1540–6. doi:10.1007/s10620-010-1217-2.
- [7] Axelrod DA, Dzebisashvili N, Lentine KL, Xiao H, Schnitzler M, Tuttle-Newhall JE, et al. National Assessment of Early Biliary Complications After Liver Transplantation: Economic Implications. *Transplantation* 2014;98:1126–235. doi:10.1097/TP.000000000000197.
- [8] Mathur AK, Ranney DN, Patel SP, Lee DS, Bednar F, Lynch RJ, et al. The effect of smoking on biliary complications following liver transplantation: Smoking and postliver transplant biliary complications. *Transpl Int* 2011;24:58–66. doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01146.x.
- [9] Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, Haagsma EB. Biliary complications after liver transplantation: A review. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:89–101. doi:10.1080/00365520600664375.
- [10] Gastaca M. Biliary complications after orthotopic liver transplantation: a review of incidence and risk factors. *Transplant Proc* 2012;44:1545–9. doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.008.
- [11] Wojcicki M, Lubikowski J, Klek R, Post M, Jarosz K, Bialek A, et al. Reduction of Biliary Complication Rate Using Continuous Suture and No Biliary Drainage for Duct-to-Duct Anastomosis in Whole-Organ Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:3126–30. doi:10.1016/j.transproceed.2009.07.091.
- [12] Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D. Biliary reconstruction, its complications and management of biliary complications after adult liver transplantation: a systematic review of the incidence, risk factors and outcome. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2011;24:379–92. doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01202.x.
- [13] Welling TH, Heidt DG, Englesbe MJ, Magee JC, Sung RS, Campbell DA, et al. Biliary complications following liver transplantation in the model for end-stage liver disease era: Effect of donor, recipient, and technical factors. *Liver Transpl* 2008;14:73–80. doi:10.1002/lt.21354.
- [14] Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, van der Jagt EJ, Limburg AJ, van den Berg AP, et al. Anastomotic biliary strictures after liver transplantation: Causes and consequences. *Liver Transpl* 2006;12:726–35. doi:10.1002/lt.20714.
- [15] Balderramo D, Navasa M, Cardenas A. Current management of biliary complications after liver

transplantation: emphasis on endoscopic therapy. *Gastroenterol Hepatol* 2011;34:107–15. doi:10.1016/j.gastrohep.2010.05.008.

[16] Sundaram V, Jones DT, Shah NH, de Vera ME, Fontes P, Marsh JW, et al. Posttransplant biliary complications in the pre- and post-model for end-stage liver disease era. *Liver Transpl* 2011;17:428–35. doi:10.1002/lt.22251.

[17] Rabkin JM, Orloff SL, Reed MH, Wheeler LJ, Corless CL, Benner KG, et al. Biliary tract complications of side-to-side without T tube versus end-to-end with or without T tube choledochocholedochostomy in liver transplant recipients. *Transplantation* 1998;65:193–9.

[18] Sotiropoulos GC, Sgourakis G, Radtke A, Molmenti EP, Goumas K, Mylona S, et al. Orthotopic Liver Transplantation: T-Tube or Not T-Tube? Systematic Review and Meta-Analysis of Results. *Transplantation* 2009;87:1672–80. doi:10.1097/TP.0b013e3181a5cf3f.

[19] Riediger C, Müller MW, Michalski CW, Hüser N, Schuster T, Kleeff J, et al. T-tube or no T-tube in reconstruction of the biliary tract during orthotopic liver transplantation - systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl* 2010:NA-NA. doi:10.1002/lt.22070.

[20] Barkun JS, Tzimas GN, Cantarovich M, Metrakos PP, Deschênes M, Alpert E, et al. Do biliary endoprostheses decrease biliary complications after liver transplantation? *Transplant Proc* 2003;35:2435–7.

[21] Tranchart H, Zalinski S, Sepulveda A, Chirica M, Prat F, Soubrane O, et al. Removable intraductal stenting in duct-to-duct biliary reconstruction in liver transplantation. *Transpl Int* 2012;25:19–24. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01339.x.

[22] Girard E, Risse O, Abba J, Medici M, Leroy V, Chirica M, et al. Internal biliary stenting in liver transplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2018. doi:10.1007/s00423-018-1669-y.

[23] Cotton PB, Garrow DA, Gallagher J, Romagnuolo J. Risk factors for complications after ERCP: a multivariate analysis of 11,497 procedures over 12 years. *Gastrointest Endosc* 2009;70:80–8. doi:10.1016/j.gie.2008.10.039.

[24] Reed DN, Vitale GC, Wrightson WR, Edwards M, McMasters K. Decreasing mortality of bile leaks after elective hepatic surgery. *Am J Surg* 2003;185:316–8.

[25] Hastier P, Buckley JM, Peten EP, Dumas R, Delmont J. Long term treatment of biliary stricture due to chronic pancreatitis with a metallic stent. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1947–8. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01235.x.

[26] Zografakis JG, Jones BT, Ravichardran P, Evancho-Chapman MM, Schmidt SP, Arends D, et al. Endoluminal reconstruction of the canine common biliary duct. *Curr Surg* 2003;60:437–41. doi:10.1016/S0149-7944(02)00726-2.

[27] Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet* 1999;354:S32–4. doi:10.1016/S0140-6736(99)90247-7.

[28] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.

[29] Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med* 1981;305:266–9. doi:10.1056/NEJM198107303050507.

[30] Bismuth H, Gugenheim J. [Liver transplantation]. *Ann Med Interne (Paris)* 1987;138:207–14.

[31] HAS. Indications de la transplantation hépatique 2005.

[32] Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. *Surg Gynecol Obstet* 1987;165:343–8.

- [33] Merion RM, Burch GD, Ham JM, Turcotte JG, Campbell DA. The hepatic artery in liver transplantation. *Transplantation* 1989;48:438–43.
- [34] Launois B, Jamieson GG, Maddern G, Landen S, Champion JP, Coeurdacier P, et al. Venous allografts: a useful alternative to venous autografts in digestive surgery. *ANZ J Surg* 1995;65:579–81. doi:10.1111/j.1445-2197.1995.tb01699.x.
- [35] Sulpice L, Desfourneaux V, Rayar M, Meunier B, Lakehal M, Bentabak K, et al. Techniques de transplantation hépatique chez l'adulte. *EMC - Tech Chir - Appar Dig* 2013;8:1–27. doi:10.1016/S0246-0424(12)57364-4.
- [36] Paes-Barbosa FC, Massarollo PC, Bernardo WM, Ferreira FG, Barbosa FK, Raslan M, et al. Systematic review and meta-analysis of biliary reconstruction techniques in orthotopic deceased donor liver transplantation. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci* 2010;18:525–36. doi:10.1007/s00534-010-0346-5.
- [37] Hirano S, Tanaka E, Tsuchikawa T, Matsumoto J, Shichinohe T, Kato K. Techniques of biliary reconstruction following bile duct resection (with video). *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci* 2012;19:203–9. doi:10.1007/s00534-011-0475-5.
- [38] Castaldo ET, Pinson CW, Feurer ID, Wright JK, Gorden DL, Kelly BS, et al. Continuous versus interrupted suture for end-to-end biliary anastomosis during liver transplantation gives equal results. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2007;13:234–8. doi:10.1002/lt.20986.
- [39] Hwang S, Lee S-G, Sung K-B, Park K-M, Kim K-H, Ahn C-S, et al. Long-term incidence, risk factors, and management of biliary complications after adult living donor liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2006;12:831–8. doi:10.1002/lt.20693.
- [40] Kasahara M, Egawa H, Takada Y, Oike F, Sakamoto S, Kiuchi T, et al. Biliary reconstruction in right lobe living-donor liver transplantation: Comparison of different techniques in 321 recipients. *Ann Surg* 2006;243:559–66. doi:10.1097/01.sla.0000206419.65678.2e.
- [41] Conti F, Morelon E, Calmus Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol* 2003;39:664–78.
- [42] Bowers BA, Rotolo FS, Watters CR, Cucchiario G, Branum GD, Meyers WC. Regulation of biliary secretion following liver transplantation. *Transplant Proc* 1989;21:3554.
- [43] Couinaud C. Liver Anatomy: Portal (and Suprahepatic) or Biliary Segmentation. *Dig Surg* 1999;16:459–67. doi:10.1159/000018770.
- [44] Northover JM, Terblanche J. A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. *Br J Surg* 1979;66:379–84.
- [45] Wilkie D. The blood supply of the duodenum, with special reference to the supraduodenal artery. *Surg GynObst* 1911;13:399.
- [46] Henley FA. The blood-supply of the common bile-duct and its relationship to duodenum. *Br J Surg* 1955;43:75–80.
- [47] Parke WW, Michels NA, Ghosh GM. Blood supply of the common bile duct. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:47–55.
- [48] Holzbach RT, Marsh M, Olszewski M, Holan K. Cholesterol Solubility in Bile. Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* 1973;52:1467–79. doi:10.1172/JCI107321.
- [49] Kristiansen TZ, Maitra A, Pandey A. Proteomics of human bile. *Proteomics Hum. Body Fluids*, Springer; 2007, p. 399–414.

- [50] Klos C, Paumgartner G, Reichen J. Cation-anion gap and choleric properties of rat bile. *Am J Physiol* 1979;236:E434–E440.
- [51] Girard E. Evaluation de l'implantation peropératoire d'un Drain Biliaire Interne cholédochocholédocien en Transplantation Hépatique Orthotopique: étude comparative rétrospective à propos de 294 patients. HAL n.d. doi:<https://hal.archives-ouvertes.fr/>.
- [52] Muller X, Marcon F, Sapisochin G, Marquez M, Dondero F, Rayar M, et al. Defining Benchmarks in Liver Transplantation: A Multicenter Outcome Analysis Determining Best Achievable Results. *Ann Surg* 2017;1. doi:10.1097/SLA.0000000000002477.
- [53] Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240:205–13.
- [54] Koch M, Garden OJ, Padbury R, Rahbari NN, Adam R, Capussotti L, et al. Bile leakage after hepatobiliary and pancreatic surgery: a definition and grading of severity by the International Study Group of Liver Surgery. *Surgery* 2011;149:680–8. doi:10.1016/j.surg.2010.12.002.
- [55] Girard E, Messenger M, Sauvanet A, Benoist S, Piessen G, Mabrut J-Y, et al. Anastomotic leakage after gastrointestinal surgery: Diagnosis and management. *J Visc Surg* 2014;151:441–50. doi:10.1016/j.jviscsurg.2014.10.004.
- [56] de Castro SMM, Kuhlmann KFD, Busch ORC, van Delden OM, Laméris JS, van Gulik TM, et al. Incidence and management of biliary leakage after hepaticojejunostomy. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 2005;9:1163–71; discussion 1171-1173. doi:10.1016/j.gassur.2005.08.010.
- [57] Hawn MT, Bian J, Leeth RR, Ritchie G, Allen N, Bland KI, et al. Impact of Obesity on Resource Utilization for General Surgical Procedures. *Ann Surg* 2005;241:821–8. doi:10.1097/01.sla.0000161044.20857.24.
- [58] Dindo D, Muller MK, Weber M, Clavien P-A. Obesity in general elective surgery. *Lancet* 2003;361:2032–5. doi:10.1016/S0140-6736(03)13640-9.
- [59] Thomas EJ, Goldman L, Mangione CM, Marcantonio ER, Cook EF, Ludwig L, et al. Body mass index as a correlate of postoperative complications and resource utilization. *Am J Med* 1997;102:277–83. doi:10.1016/S0002-9343(96)00451-2.
- [60] Bozzetti F, Gianotti L, Braga M, Di Carlo V, Mariani L. Postoperative complications in gastrointestinal cancer patients: the joint role of the nutritional status and the nutritional support. *Clin Nutr Edinb Scotl* 2007;26:698–709. doi:10.1016/j.clnu.2007.06.009.
- [61] Liu C-L, Lo C-M, Chan S-C, Fan S-T. Safety of duct-to-duct biliary reconstruction in right-lobe live-donor liver transplantation without biliary drainage. *Transplantation* 2004;77:726–32.
- [62] Marcos A, Olzinski AT, Ham JM, Fisher RA, Posner MP. The interrelationship between portal and arterial blood flow after adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;70:1697–703.
- [63] Troisi R, Cammu G, Militerno G, De Baerdemaeker L, Decruyenaere J, Hoste E, et al. Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-donor liver transplantation? *Ann Surg* 2003;237:429–36. doi:10.1097/01.SLA.0000055277.78876.B7.
- [64] Brooks BK, Levy MF, Jennings LW, Abbasoglu O, Vodapally M, Goldstein RM, et al. Influence of donor and recipient gender on the outcome of liver transplantation. *Transplantation* 1996;62:1784–7.
- [65] Candinas D, Gunson BK, Nightingale P, Hubscher S, McMaster P, Neuberger JM. Sex mismatch as a risk factor for chronic rejection of liver allografts. *Lancet* 1995;346:1117–21.
- [66] Qian YB, Liu CL, Lo CM, Fan ST. Risk factors for biliary complications after liver transplantation. *Arch Surg Chic Ill* 1960 2004;139:1101–5. doi:10.1001/archsurg.139.10.1101.

- [67] Vougas V, Rela M, Gane E, Muiesan P, Melendez HV, Williams R, et al. A prospective randomised trial of bile duct reconstruction at liver transplantation: T tube or no T tube? *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 1996;9:392–5.
- [68] Shackleton CR, Goss JA, Swenson K, Colquhoun SD, Seu P, Kinkhabwala MM, et al. The impact of microsurgical hepatic arterial reconstruction on the outcome of liver transplantation for congenital biliary atresia. *Am J Surg* 1997;173:431–5. doi:10.1016/S0002-9610(97)00066-4.
- [69] Taube M, Elliot P, Ellis H. Toxicity of bilirubin and bilirubin diglucuronide to rat tissue culture fibroblasts. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 1988;20:190–4.
- [70] Baccarani U, Isola M, Adani GL, Avellini C, Lorenzin D, Rossetto A, et al. Steatosis of the hepatic graft as a risk factor for post-transplant biliary complications. *Clin Transplant* 2010;24:631–635.
- [71] Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. *Microcirc N Y N* 1994 2003;10:447–56. doi:10.1038/sj.mn.7800206.
- [72] Seifalian AM, Chidambaram V, Rolles K, Davidson BR. In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. *Liver Transplant Surg Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 1998;4:71–7.
- [73] Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res* 2005;70:129–36. doi:10.1016/j.mvr.2005.08.001.
- [74] Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN, Grant DR, Wall WJ. Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases. *Liver Transpl Surg* 1997;3:365–373.
- [75] Chaib E, Friend PJ, Jamieson NV, Calne RY. Biliary tract reconstruction: comparison of different techniques after 187 paediatric liver transplantations. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 1994;7:39–42.
- [76] Scotté M, Dousset B, Calmus Y, Conti F, Houssin D, Chapuis Y. The influence of cold ischemia time on biliary complications following liver transplantation. *J Hepatol* 1994;21:340–6.
- [77] Seo JK, Ryu JK, Lee SH, Park JK, Yang KY, Kim Y-T, et al. Endoscopic treatment for biliary stricture after adult living donor liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2009;15:369–80. doi:10.1002/lt.21700.
- [78] Bhattacharjya S, Puleston J, Davidson BR, Dooley JS. Outcome of early endoscopic biliary drainage in the management of bile leaks after hepatic resection. *Gastrointest Endosc* 2003;57:526–30. doi:10.1067/mge.2003.148.
- [79] Zhao D-B, Shan H, Jiang Z-B, Huang M-S, Zhu K-S, Chen G-H, et al. Role of interventional therapy in hepatic artery stenosis and non-anastomosis bile duct stricture after orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol WJG* 2007;13:3128–32.
- [80] Bourgeois N, Devière J, Yeaton P, Bourgeois F, Adler M, Van De Stadt J, et al. Diagnostic and therapeutic endoscopic retrograde cholangiography after liver transplantation. *Gastrointest Endosc* 1995;42:527–34.
- [81] Ostroff JW. Post-transplant biliary problems. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:163–83.
- [82] Shah SA, Grant DR, McGilvray ID, Greig PD, Selzner M, Lilly LB, et al. Biliary strictures in 130 consecutive right lobe living donor liver transplant recipients: results of a Western center. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2007;7:161–7. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01601.x.
- [83] Olthoff KM, Merion RM, Ghobrial RM, Abecassis MM, Fair JH, Fisher RA, et al. Outcomes of 385 adult-to-adult living donor liver transplant recipients: a report from the A2ALL Consortium. *Ann Surg*

2005;242:314–23, discussion 323-325.

[84] Park JB, Kwon CHD, Choi G-S, Chun JM, Jung GO, Kim S-J, et al. Prolonged cold ischemic time is a risk factor for biliary strictures in duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation. *Transplantation* 2008;86:1536–42. doi:10.1097/TP.0b013e31818b2316.

[85] Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB, et al. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992;16:49–53.

[86] Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Fujita S, et al. Biliary anastomotic complications in 400 living related liver transplantations. *World J Surg* 2001;25:1300–7.

[87] Madalosso C, de Souza NF, Ilstrup DM, Wiesner RH, Krom RA. Cytomegalovirus and its association with hepatic artery thrombosis after liver transplantation. *Transplantation* 1998;66:294–7.

[88] Halme L, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Cytomegalovirus infection and development of biliary complications after liver transplantation. *Transplantation* 2003;75:1853–8. doi:10.1097/01.TP.0000064620.08328.E5.

[89] Vankemmel M. [A Kehr drain unlike the others. Silicone T drain coated with rubber]. *J Chir (Paris)* 1983;120:403–5.

[90] Navez J, Mohkam K, Darnis B, Cazauran J-B, Ducerf C, Mabrut J-Y. Biliary Duct-to-Duct Reconstruction with a Tunneled Retroperitoneal T-Tube During Liver Transplantation: a Novel Approach to Decrease Biliary Leaks After T-Tube Removal. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 2017;21:723–30. doi:10.1007/s11605-016-3313-x.

[91] Kusano T, Randall HB, Roberts JP, Ascher NL. The use of stents for duct-to-duct anastomoses of biliary reconstruction in orthotopic liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2005;52:695–9.

[92] Rolles K, Dawson K, Novell R, Hayter B, Davidson B, Burroughs A. Biliary anastomosis after liver transplantation does not benefit from T tube splintage. *Transplantation* 1994;57:402–4.

[93] Rouch DA, Emond JC, Thistlethwaite JR Jr, Mayes JT, Broelsch CE. Choledochocholedochostomy without a T tube or internal stent in transplantation of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:239–44.

[94] Randall HB, Wachs ME, Somberg KA, Lake JR, Emond JC, Ascher NL, et al. The use of the T tube after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:258–61.

[95] Li T, Chen Z-S, Zeng F-J, Ming C-S, Zhang W-J, Liu D-G, et al. Impact of early biliary complications in liver transplantation in the presence or absence of a T-tube: a Chinese transplant centre experience. *Postgrad Med J* 2007;83:120–3. doi:10.1136/pgmj.2006.049171.

[96] Shimoda M, Saab S, Morrissey M, Ghobrial RM, Farmer DG, Chen P, et al. A cost-effectiveness analysis of biliary anastomosis with or without T-tube after orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2001;1:157–161.

[97] Thethy S, Thomson Bn, Pleass H, Wigmore SJ, Madhavan K, Akyol M, et al. Management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Clin Transpl* 2004;18:647–53. doi:10.1111/j.1399-0012.2004.00254.x.

[98] Ben-Ari Z, Neville L, Davidson B, Rolles K, Burroughs AK. Infection rates with and without T-tube splintage of common bile duct anastomosis in liver transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 1998;11:123–6.

[99] Scatton O, Meunier B, Cherqui D, Boillot O, Sauvanet A, Boudjema K, et al. Randomized trial of choledochocholedochostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 2001;233:432–7.

[100] Amador A, Charco R, Martí J, Navasa M, Rimola A, Calatayud D, et al. Clinical trial on the cost-

effectiveness of T-tube use in an established deceased donor liver transplantation program. *Clin Transplant* 2007;21:548–53. doi:10.1111/j.1399-0012.2007.00688.x.

[101] López-Andújar R, Orón EM, Carregnato AF, Suárez FV, Herraiz AM, Rodríguez FSJ, et al. T-tube or no T-tube in cadaveric orthotopic liver transplantation: the eternal dilemma: results of a prospective and randomized clinical trial. *Ann Surg* 2013;258:21–9. doi:10.1097/SLA.0b013e318286e0a0.

[102] Nuño J, Vicente E, Turrión VS, Pereira F, Ardaiz J, Cuervas V, et al. Biliary tract reconstruction after liver transplantation: with or without T-tube? *Transplant Proc* 1997;29:564–5.

[103] Weiss S, Schmidt S-C, Ulrich F, Pascher A, Schumacher G, Stockmann M, et al. Biliary Reconstruction Using a Side-to-Side Choledochocolocholestomy With or Without T-Tube in Deceased Donor Liver Transplantation. *Ann Surg* 2009;250:766–71. doi:10.1097/SLA.0b013e3181bd920a.

[104] Bawa SM, Mathew A, Krishnan H, Minford E, Talbot D, Mirza DF, et al. Biliary reconstruction with or without an internal biliary stent in orthotopic liver transplantation: a prospective randomised trial. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 1998;11 Suppl 1:S245-247.

[105] Johnson MW, Thompson P, Meehan A, Odell P, Salm MJ, Gerber DA, et al. Internal biliary stenting in orthotopic liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2000;6:356–61. doi:10.1053/lv.2000.5303.

[106] Vandenbroucke F, Plasse M, Dagenais M, Lapointe R, Létourneau R, Roy A. Treatment of post liver transplantation bile duct stricture with self-expandable metallic stent. *HPB* 2006;8:202–5. doi:10.1080/13651820500501800.

[107] Mathur AK, Nadig SN, Kingman S, Lee D, Kinkade K, Sonnenday CJ, et al. Internal biliary stenting during orthotopic liver transplantation: anastomotic complications, post-transplant biliary interventions, and survival. *Clin Transplant* 2015;29:327–35. doi:10.1111/ctr.12518.

[108] Arain MA, Attam R, Freeman ML. Advances in endoscopic management of biliary tract complications after liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2013;19:482–98. doi:10.1002/lt.23624.

[109] Pérez G, Escalona A, Jarufe N, Ibáñez L, Viviani P, García C, et al. Prospective randomized study of T-tube versus biliary stent for common bile duct decompression after open choledocotomy. *World J Surg* 2005;29:869–72. doi:10.1007/s00268-005-7698-z.

[110] Ferraz-Neto B, Mirza DF, Gunson BK, Ismail T, Mayer AD, Buckels JA, et al. Bile duct splintage in liver transplantation: is it necessary? *Transpl Int* 1996;9:185–7.

[111] Lee S, Ahn JY, Jung H-Y, Lee JH, Choi K-S, Kim DH, et al. Clinical outcomes of endoscopic and surgical management for postoperative upper gastrointestinal leakage. *Surg Endosc* 2013;27:4232–40. doi:10.1007/s00464-013-3028-y.

[112] Karsten TM, Coene PP, van Gulik TM, Bosma A, van Marle J, James J, et al. Morphologic changes of extrahepatic bile ducts during obstruction and subsequent decompression by endoprosthesis. *Surgery* 1992;111:562–8.

[113] Karsten TM, Davids PH, van Gulik TM, Bosma A, Tytgat GN, Klopper PJ, et al. Effects of biliary endoprostheses on the extrahepatic bile ducts in relation to subsequent operation of the biliary tract. *J Am Coll Surg* 1994;178:343–52.

[114] Panaro F, Glaise A, Miggino M, Bouyabrine H, Carabalona JP, Gallix B, et al. Rubber transcystic drainage reduces the post-removal biliary complications in liver transplantation: a matched case-control study. *Langenbecks Arch Surg* 2012;398:169–76. doi:10.1007/s00423-012-0970-4.

[115] Innocenti F, Hepp J, Humeres R, Rios H, Suárez L, Zapata R, et al. Transcystic cholangiogram access via rubber band with early withdrawal after liver transplantation: a safe technique. *Transplant Proc*

2004;36:1681–2. doi:10.1016/j.transproceed.2004.06.062.

[116] Escat J, Fourtanier G, Lacroix A, Anduze-Acher Y. [External drainage of the common bile duct. A new transecystic drain (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 1978;7:1643–4.

[117] Wang SF, Huang ZY, Chen XP. Biliary complications after living donor liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc* 2011;17:1127–36. doi:10.1002/lt.22381.

[118] Cougard P, Barrat C, Gayral F, Cadière GB, Meyer C, Fagniez L, et al. [Laparoscopic treatment of perforated duodenal ulcers. Results of a retrospective multicentric study. French Society of Laparoscopic Surgery]. *Ann Chir* 2000;125:726–31.

[119] Pasquer A, Pelascini E, Poncet G, Robert M. Laparoscopic Treatment of Gastro-Gastric Fistula After RYGB: Technical Points. *Obes Surg* 2018;28:1452–3. doi:10.1007/s11695-018-3164-5.

[120] Paquet J-C, Dziri C, Hay J-M, Fingerhut A, Zeitoun G, Suc B, et al. Prevention of deep abdominal complications with omentoplasty on the raw surface after hepatic resection. *Am J Surg* 2000;179:103–9. doi:10.1016/S0002-9610(00)00277-4.

[121] Altinli E, Saribeyoglu K, Pekmezci S, Uras C, Tasçi H, Akçal T. An Effective Omentoplasty Technique in Laparoscopic Surgery for Hydatid Disease of the Liver 2002:4.

[122] Igami T, Nishio H, Ebata T, Yokoyama Y, Sugawara G, Nagino M. Using the greater omental flap to cover the cut surface of the liver for prevention of delayed gastric emptying after left-sided hepatobiliary resection: a prospective randomized controlled trial. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci* 2011;18:176–83. doi:10.1007/s00534-010-0323-z.

[123] Ng JJ, Kow AWC. Pedicled omental patch as a bridging procedure for iatrogenic bile duct injury. *World J Gastroenterol* 2017;23:6741–6. doi:10.3748/wjg.v23.i36.6741.

[124] Liang Y-L, Yu Y-C, Liu K, Wang W-J, Ying J-B, Wang Y-F, et al. Repair of bile duct defect with degradable stent and autologous tissue in a porcine model. *World J Gastroenterol WJG* 2012;18:5205–10. doi:10.3748/wjg.v18.i37.5205.

[125] Ye Q-F, Niu Y, She X-G, Ming Y-Z, Cheng K, Ma Y, et al. Pedicled greater omentum flap for preventing bile leak in liver transplantation patients with poor biliary tract conditions n.d.:4.

[126] Panaro F, Bouyabrine H, Carabalona J-P, Nougaret S, Jung B, Pageaux GP, et al. Omental Flap for Hepatic Artery Coverage During Liver Transplantation. *J Gastrointest Surg* 2014;18:1518–22. doi:10.1007/s11605-014-2484-6.

[127] Kram HB, Garces MA, Klein SR, Shoemaker WC. Common bile duct anastomosis using fibrin glue. *Arch Surg Chic Ill* 1960 1985;120:1250–6.

[128] Zhang X, Zhang L, Yu Y, Sun S, Sun T, Sun Y. Human fibrin sealant reduces post-operative bile leakage of primary closure after laparoscopic common bile duct exploration in patients with choledocholithiasis. *J Minimal Access Surg* 2018;0:0. doi:10.4103/jmas.JMAS_129_18.

[129] Fonouni H, Kashfi A, Stahlheber O, Konstantinidis L, Kraus TW, Mehrabi A, et al. Analysis of the biliostatic potential of two sealants in a standardized porcine model of liver resection. *Am J Surg* 2017;214:945–55. doi:10.1016/j.amjsurg.2017.06.038.

[130] Topaloğlu S, Çalık A, Kalaycı O, Sağlam K, Yazıcı A, Aydın C. Fibrin glue and biliary anastomotic leak after liver transplant. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant* 2014;12 Suppl 1:76–80.

[131] Toti L, Attia M, Manzia TM, Lenci I, Gunson B, Buckels JAC, et al. Reduction in bile leaks following adult split liver transplant using a fibrin-collagen sponge: A pilot study. *Dig Liver Dis*

2010;42:205–9. doi:10.1016/j.dld.2009.06.010.

[132] Figueras J, Llado L, Miro M, Ramos E, Torras J, Fabregat J, et al. Application of Fibrin Glue Sealant After Hepatectomy Does Not Seem Justified: Results of a Randomized Study in 300 Patients. *Ann Surg* 2007;245:536–42. doi:10.1097/01.sla.0000245846.37046.57.

[133] de Boer MT, Boonstra EA, Lisman T, Porte RJ. Role of Fibrin Sealants in Liver Surgery. *Dig Surg* 2012;29:54–61. doi:10.1159/000335735.

[134] Martin I, Au K. Does fibrin glue sealant decrease the rate of anastomotic leak after a pancreaticoduodenectomy? Results of a prospective randomized trial. *HPB* 2013;15:561–6. doi:10.1111/hpb.12018.

[135] Vert M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything †. *Biomacromolecules* 2005;6:538–46. doi:10.1021/bm0494702.

[136] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007;32:762–98. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

[137] Chen Q, Liang S, Thouas GA. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2013;38:584–671. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003.

[138] Albertsson A-C, Varma IK. Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications. *Degradable Aliphatic Polyest.*, vol. 157, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2002, p. 1–40. doi:10.1007/3-540-45734-8_1.

[139] Ponsart S, Coudane J, Vert M. A Novel Route To Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* 2000;1:275–81. doi:10.1021/bm005521t.

[140] Perego G, Cella GD, Bastioli C. Effect of molecular weight and crystallinity on poly(lactic acid) mechanical properties. *J Appl Polym Sci* 1996;59:37–43. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19960103)59:1<37::AID-APP6>3.0.CO;2-N.

[141] Saeidlou S, Huneault MA, Li H, Park CB. Poly(lactic acid) crystallization. *Prog Polym Sci* 2012;37:1657–77. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.07.005.

[142] Dumitriu S, editor. *Polymeric biomaterials*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc; 2002.

[143] Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21:2335–46.

[144] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.

[145] Li S, Girard A, Garreau H, Vert M. Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant d-lactyl contents. *Polym Degrad Stab* 2000;71:61–7. doi:10.1016/S0141-3910(00)00152-X.

[146] Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(dl-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995;16:305–11. doi:10.1016/0142-9612(95)93258-F.

[147] Mauduit J, Pérouse E, Vert M. Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly(DL-lactic acid)s. *J Biomed Mater Res* 1996;30:201–7. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199602)30:2<201::AID-JBM10>3.0.CO;2-P.

[148] Breche Q, Chagnon G, Machado G, Girard E, Nottelet B, Garric X, et al. Mechanical behaviour's evolution of a PLA-b-PEG-b-PLA triblock copolymer during hydrolytic degradation. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;60:288–300. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.02.015.

- [149] Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17:103–14. doi:10.1016/0142-9612(96)85755-3.
- [150] Burkersroda F von, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 2002;23:4221–31. doi:10.1016/S0142-9612(02)00170-9.
- [151] Liu Q, Jiang L, Shi R, Zhang L. Synthesis, preparation, in vitro degradation, and application of novel degradable bioelastomers—A review. *Prog Polym Sci* 2012;37:715–65. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.11.001.
- [152] Carrasco F, Pagès P, Gámez-Pérez J, Santana OO, MasPOCH ML. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polym Degrad Stab* 2010;95:116–25. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.045.
- [153] Tsuji H, Ogiwara M, Saha SK, Sakaki T. Enzymatic, Alkaline, and Autocatalytic Degradation of Poly(L-lactic acid): Effects of Biaxial Orientation. *Biomacromolecules* 2006;7:380–7. doi:10.1021/bm0507453.
- [154] Oda Y, Yonetsu A, Urakami T, Tonomura K. Degradation of Polylactide by Commercial Proteases n.d.:2.
- [155] Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:169–90.
- [156] Brun P, Ghezzi F, Roso M, Danesin R, Palù G, Bagno A, et al. Electrospun scaffolds of self-assembling peptides with poly(ethylene oxide) for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7:2526–32. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.025.
- [157] Haryanto, Kim S, Kim JH, Kim JO, Ku S, Cho H, et al. Fabrication of poly(ethylene oxide) hydrogels for wound dressing application using E-beam. *Macromol Res* 2014;22:131–8. doi:10.1007/s13233-014-2023-z.
- [158] Haryanto, Singh D, Han SS, Son JH, Kim SC. Poly(ethylene glycol) dicarboxylate/poly(ethylene oxide) hydrogel film co-crosslinked by electron beam irradiation as an anti-adhesion barrier. *Mater Sci Eng C* 2015;46:195–201. doi:10.1016/j.msec.2014.10.028.
- [159] Fruijtier-Pölloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology* 2005;214:1–38. doi:10.1016/j.tox.2005.06.001.
- [160] Chandrasekhar S, Narsihmulu C, Sultana SS, Reddy NR. Poly(ethylene glycol) (PEG) as a Reusable Solvent Medium for Organic Synthesis. Application in the Heck Reaction †. *Org Lett* 2002;4:4399–401. doi:10.1021/ol0266976.
- [161] Yang D-J, Chen F, Xiong Z-C, Xiong C-D, Wang Y-Z. Tissue anti-adhesion potential of biodegradable PELA electrospun membranes. *Acta Biomater* 2009;5:2467–74. doi:10.1016/j.actbio.2009.03.034.
- [162] Lee null, Lee null, Khang null, Lee null. The Effect of Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Adhesiveness to Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *J Colloid Interface Sci* 2000;230:84–90. doi:10.1006/jcis.2000.7080.
- [163] Leroy A, Nottelet B, Bony C, Pinese C, Charlot B, Garric X, et al. PLA-ploxamer/ploxamine copolymers for ligament tissue engineering: sound macromolecular design for degradable scaffolds and MSC differentiation. *Biomater Sci* 2015;3:617–26. doi:10.1039/C4BM00433G.
- [164] Pinese C, Gagnieu C, Nottelet B, Rondot-Couzin C, Hunger S, Coudane J, et al. *In vivo* evaluation of hybrid patches composed of PLA based copolymers and collagen/chondroitin sulfate for ligament tissue regeneration: Hybrid Patches for Ligament Reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017;105:1778–88. doi:10.1002/jbm.b.33712.

- [165] Pinese C, Gagnieu C, Nottelet B, Rondot-Couzin C, Hunger S, Coudane J, et al. *In vivo* evaluation of hybrid patches composed of PLA based copolymers and collagen/chondroitin sulfate for ligament tissue regeneration: Hybrid Patches for Ligament Reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017;105:1778–88. doi:10.1002/jbm.b.33712.
- [166] Washington KE, Kularatne RN, Karmegam V, Biewer MC, Stefan MC. Recent advances in aliphatic polyesters for drug delivery applications: Aliphatic polyesters for drug delivery applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9:e1446. doi:10.1002/wnan.1446.
- [167] Basu A, Kunduru KR, Doppalapudi S, Domb AJ, Khan W. Poly(lactic acid) based hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;107:192–205. doi:10.1016/j.addr.2016.07.004.
- [168] James R, Manoukian OS, Kumbar SG. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;107:277–88. doi:10.1016/j.addr.2016.06.009.
- [169] Eslahi N, Abdorahim M, Simchi A. Smart Polymeric Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering: A Review on the Chemistry and Biological Functions. *Biomacromolecules* 2016;17:3441–63. doi:10.1021/acs.biomac.6b01235.
- [170] Raeisdasteh Hokmabad V, Davaran S, Ramazani A, Salehi R. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017;28:1797–825. doi:10.1080/09205063.2017.1354674.
- [171] Rogacka R, Chieffo A, Latib A, Colombo A. Bioabsorbable and biocompatible stents. Is a new revolution coming? *Minerva Cardioangiol* 2008;56:483–491.
- [172] Brown DA, Lee EW, Loh CT, Kee ST. A New Wave in Treatment of Vascular Occlusive Disease: Biodegradable Stents—Clinical Experience and Scientific Principles. *J Vasc Interv Radiol* 2009;20:315–24. doi:10.1016/j.jvir.2008.11.007.
- [173] Ginsberg G, Cope C, Shah J, Martin T, Carty A, Habecker P, et al. *In vivo* evaluation of a new bioabsorbable self-expanding biliary stent. *Gastrointest Endosc* 2003;58:777–784.
- [174] Laukkarinen J, Nordback I, Mikkonen J, Kärkkäinen P, Sand J. A novel biodegradable biliary stent in the endoscopic treatment of cystic-duct leakage after cholecystectomy. *Gastrointest Endosc* 2007;65:1063–8. doi:10.1016/j.gie.2006.11.059.
- [175] Yamamoto K, Yoshioka T, Furuichi K, Sakaguchi H, Anai H, Tanaka T, et al. Experimental Study of Poly-L-Lactic Acid Biodegradable Stents in Normal Canine Bile Ducts. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2011;34:601–8. doi:10.1007/s00270-010-0045-2.
- [176] Meng B, Wang J, Zhu N, Meng Q-Y, Cui F-Z, Xu Y-X. Study of biodegradable and self-expandable PLLA helical biliary stent in vivo and in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:611–7. doi:10.1007/s10856-006-9223-9.
- [177] Xu X, Liu T, Liu S, Zhang K, Shen Z, Li Y, et al. Feasibility of biodegradable PLGA common bile duct stents: an in vitro and in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:1167–73. doi:10.1007/s10856-008-3672-2.
- [178] Grolich T, Crha M, Novotný L, Kala Z, Hep A, Nečas A, et al. Self-expandable biodegradable biliary stents in porcine model. *J Surg Res* 2015;193:606–12. doi:10.1016/j.jss.2014.08.006.
- [179] Jones L, Moir J, Brown C, Williams R, French J. The novel use of a biodegradable stent placed by percutaneous transhepatic cholangiography for the treatment of a hepaticojejunostomy biliary leak following an extended left hepatectomy and pancreaticoduodenectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 2014;96:e1–3. doi:10.1308/003588414X13946184901326.
- [180] Mauri G, Michelozzi C, Melchiorre F, Poretti D, Tramarin M, Pedicini V, et al. Biodegradable biliary stent implantation in the treatment of benign bilioplastic-refractory biliary strictures: preliminary experience.

Eur Radiol 2013;23:3304–10. doi:10.1007/s00330-013-2947-2.

[181] Siiki A, Rinta-Kiikka I, Sand J, Laukkarinen J. Biodegradable biliary stent in the endoscopic treatment of cystic duct leak after cholecystectomy: the first case report and review of literature. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2015;25:419–22. doi:10.1089/lap.2015.0068.

[182] Petrtýl J, Brůha R, Horák L, Zádorová Z, Doseděl J, Laasch H-U. Management of benign intrahepatic bile duct strictures: initial experience with polydioxanone biodegradable stents. *Endoscopy* 2010;42:E89–90. doi:10.1055/s-0029-1243880.

[183] Vondrys D, Elliott MJ, McLaren CA, Noctor C, Roebuck DJ. First Experience With Biodegradable Airway Stents in Children. *Ann Thorac Surg* 2011;92:1870–4. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.07.042.

[184] Janík V, Horák L, Hnaníček J, Málek J, Laasch H-U. Biodegradable polydioxanone stents: a new option for therapy-resistant anastomotic strictures of the colon. *Eur Radiol* 2011;21:1956–61.

[185] Stivaros SM, Williams LR, Senger C, Wilbraham L, Laasch H-U. Woven polydioxanone biodegradable stents: a new treatment option for benign and malignant oesophageal strictures. *Eur Radiol* 2010;20:1069–72. doi:10.1007/s00330-009-1662-5.

[186] Leong NL, Petrigliano FA, McAllister DR. Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction: ACL Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:1614–24.

[187] Buma P, Kok HJ, Blankevoort L, Kuijpers W, Huiskes R, van Kampen A. Augmentation in anterior cruciate ligament reconstruction—a histological and biomechanical study on goats. *Int Orthop* 2004;28:91–6. doi:10.1007/s00264-003-0515-0.

[188] Zheng Q. Technique for the safe placement of a biodegradable stent into the common bile duct of rabbits. *Exp Ther Med* 2013. doi:10.3892/etm.2013.1276.

[189] Laukkarinen J, Nordback I, Mikkonen J, Kärkkäinen P, Sand J. A novel biodegradable biliary stent in the endoscopic treatment of cystic-duct leakage after cholecystectomy. *Gastrointest Endosc* 2007;65:1063–8. doi:10.1016/j.gie.2006.11.059.

[190] Pariente JL, Bordenave L, Bareille R, Ohayon-Courtes C, Baquey C, Le Guillou M. In vitro cytocompatibility of radio-opacifiers used in ureteral endoprosthesis. *Biomaterials* 1999;20:523–7.

[191] Wang Y, van den Akker NMS, Molin DGM, Gagliardi M, van der Marel C, Lutz M, et al. A Nontoxic Additive to Introduce X-Ray Contrast into Poly(Lactic Acid). Implications for Transient Medical Implants Such as Bioresorbable Coronary Vascular Scaffolds. *Adv Healthc Mater* 2014;3:290–9.

[192] Samuel R, Girard E, Chagnon G, Dejean S, Favier D, Coudane J, et al. Radiopaque poly(ϵ -caprolactone) as additive for X-ray imaging of temporary implantable medical devices. *RSC Adv* 2015;5:84125–33. doi:10.1039/C5RA19488A.

[193] Montalvo-Javé EE, Mendoza Barrera GE, Valderrama Treviño AI, Piña Barba MC, Montalvo-Arenas C, Rojas Mendoza F, et al. Absorbable bioprosthesis for the treatment of bile duct injury in an experimental model. *Int J Surg* 2015;20:163–9. doi:10.1016/j.ijssu.2015.06.074.

[194] Xu X, Liu T, Liu S, Zhang K, Shen Z, Li Y, et al. Feasibility of biodegradable PLGA common bile duct stents: an in vitro and in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:1167–1173.

[195] Tashiro H, Ogawa T, Itamoto T, Ushitora Y, Tanimoto Y, Oshita A, et al. Synthetic bioabsorbable stent material for duct-to-duct biliary reconstruction. *J Surg Res* 2009;151:85–8.

[196] Meng B, Wang J, Zhu N, Meng Q-Y, Cui F-Z, Xu Y-X. Study of biodegradable and self-expandable PLLA helical biliary stent in vivo and in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:611–617.

[197] Chen WJ, Ying DJ, Liu ZJ, He ZP. Analysis of the arterial supply of the extrahepatic bile ducts and its clinical significance. *Clin Anat N Y N* 1999;12:245–9. doi:10.1002/(SICI)1098-

2353(1999)12:4<245::AID-CA2>3.0.CO;2-W.

- [198] Tashiro H, Ogawa T, Itamoto T, Ushitora Y, Tanimoto Y, Oshita A, et al. Synthetic bioabsorbable stent material for duct-to-duct biliary reconstruction. *J Surg Res* 2009;151:85–8.
- [199] Laukkarinen JM, Sand JA, Chow P, Juuti H, Kellomäki M, Kärkkäinen P, et al. A novel biodegradable biliary stent in the normal duct hepaticojejunal anastomosis: an 18-month follow-up in a large animal model. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 2007;11:750–7. doi:10.1007/s11605-007-0141-z.
- [200] Fan S-T, Lo C-M, Liu C-L, Tso W-K, Wong J. Biliary reconstruction and complications of right lobe live donor liver transplantation. *Ann Surg* 2002;236:676–83.
- [201] Xu X, Liu T, Zhang K, Liu S, Shen Z, Li Y, et al. Biodegradation of poly(l-lactide-co-glycolide) tube stents in bile. *Polym Degrad Stab* 2008;93:811–7. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.01.022.
- [202] Xu X, Liu T, Jiang W, Shen Z, Zhang K, Li Y, et al. Repair and reconstruction of common bile duct by poly (lactide) stent. *Rev CENIC Cienc Quím* 2010;41:1–11.
- [203] Heistermann H-P, Palmes D, Stratmann U, Hohlbach G, Hierlemann H, Langer M, et al. A New Technique for Reconstruction of the Common Bile Duct by an Autologous Vein Graft and a Biodegradable Endoluminal Stent. *J Invest Surg* 2006;19:57–60. doi:10.1080/08941930500444560.
- [204] Aikawa M, Miyazawa M, Okada K, Toshimitsu Y, Torii T, Otani Y, et al. Regeneration of extrahepatic bile duct-possibility to clinical application by recognition of the regenerative process. *J Smooth Muscle Res* 2007;43:211–218.
- [205] Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Okada K, Koyama I, Ikada Y. A Tissue-Engineered Artificial Bile Duct Grown to Resemble The Native Bile Duct. *Am J Transplant* 2005;5:1541–7.
- [206] Palmes D, Wolters H, Spiegel H-U, Müller E, Minin E, Heistermann HP. Morphological Changes during Creation of a Neo-Bile Duct Using a Vein and a Biodegradable Endoluminal Stent. *J Invest Surg* 2009;22:435–44. doi:10.3109/08941930903410791.
- [207] Sampaziotis F, Justin AW, Tysoe OC, Sawiak S, Godfrey EM, Upponi SS, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids. *Nat Med* 2017. doi:10.1038/nm.4360.
- [208] Tozzi P. Sutureless anastomoses secrets for success. Darmstadt: Steinkopff Verlag Darmstadt; 2007.
- [209] Vokrii L, Krasniqi X, Qavdarbasha A, Hyseni N, Cinquin P, Porcu P, et al. The vascular connector, design of a new device for sutureless vascular anastomosis. *Ann Surg Innov Res* 2014;8.
- [210] Cui X, Lei P, Liu S, Liu X, Wu Z, Lv Y. A sutureless method for digestive tract reconstruction during pancreaticoduodenectomy in a dog model n.d.:8.
- [211] Liu X-M, Yan X-P, Zhang H-K, Ma F, Guo Y-G, Fan C, et al. Magnetic Anastomosis for Biliojejunostomy: First Prospective Clinical Trial. *World J Surg* 2018. doi:10.1007/s00268-018-4710-y.
- [212] Cai X, Lin H, Yu H, Liang X, Zhu L, Wang Z, et al. Novel sutureless cholangiojejunostomy: initial experience with 11 cases. *Am J Surg* 2008;195:273–6. doi:10.1016/j.amjsurg.2007.02.021.
- [213] Seehofer D, Eurich D, Veltzke-Schlieker W, Neuhaus P. Biliary Complications After Liver Transplantation: Old Problems and New Challenges. *Am J Transplant* 2013;13:253–65.
- [214] Goumard C, Cachanado M, Herrero A, Rousseau G, Dondero F, Compagnon P, et al. Biliary reconstruction with or without an intraductal removable stent in liver transplantation: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16:598. doi:10.1186/s13063-015-1139-6.
- [215] Grande L, Pérez-Castilla A, Matus D, Rodriguez-Montalvo C, Rimola A, Navasa M, et al. Routine

use of the T tube in the biliary reconstruction of liver transplantation: is it worthwhile? *Transplant Proc* 1999;31:2396–7.

[216] Wojcicki M, Milkiewicz P, Silva M. Biliary tract complications after liver transplantation: a review. *Dig Surg* 2008;25:245–57. doi:10.1159/000144653.

[217] Saab S. Endoscopic Management of Biliary Leaks After T-Tube Removal in Liver Transplant Recipients: Nasobiliary Drainage Versus Biliary Stenting. *Liver Transpl* 2000;6:627–32.

[218] Kochhar G, Parungao JM, Hanouneh IA, Parsi MA. Biliary complications following liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2013;19:2841–6. doi:10.3748/wjg.v19.i19.2841.

[219] Gursimran Kochhar JMP Ibrahim A Hanouneh, Mansour A Parsi. Biliary complications following liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2013;19:6. doi:10.3748/wjg.v19.i19.2841.

[220] Nemes B, Gámán G, Doros A. Biliary complications after liver transplantation. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;9:447–66. doi:10.1586/17474124.2015.967761.

[221] Tokar JL, Banerjee S, Barth BA, Desilets DJ, Kaul V, Kethi SR, et al. Drug-eluting/biodegradable stents. *Gastrointest Endosc* 2011;74:954–8. doi:10.1016/j.gie.2011.07.028.

[222] Li J, Zhu J, He T, Li W, Zhao Y, Chen Z, et al. Prevention of intra-abdominal adhesion using electrospun PEG/PLGA nanofibrous membranes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017;78:988–97.

[223] Rogacka R, Chieffo A, Latib A, Colombo A. Bioabsorbable and biocompatible stents. Is a new revolution coming? *Minerva Cardioangiol* 2008;56:483–91.

[224] Yaszemski M. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 1996;17:175–85. doi:10.1016/0142-9612(96)85762-0.

[225] Brown DA, Lee EW, Loh CT, Kee ST. A New Wave in Treatment of Vascular Occlusive Disease: Biodegradable Stents—Clinical Experience and Scientific Principles. *J Vasc Interv Radiol* 2009;20:315–24.

[226] Tessmar JK, Göpferich AM. Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications. *Macromol Biosci* 2007;7:23–39. doi:10.1002/mabi.200600096.

[227] Tara S, Kurobe H, Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Yi T, et al. Well-organized neointima of large-pore poly(L-lactic acid) vascular graft coated with poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) prevents calcific deposition compared to small-pore electrospun poly(L-lactic acid) graft in a mouse aortic implantation model. *Atherosclerosis* 2014;237:684–91. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.030.

[228] Wissing TB, Bonito V, Bouten CVC, Smits AIPM. Biomaterial-driven in situ cardiovascular tissue engineering—a multi-disciplinary perspective. *NPJ Regen Med* 2017;2:18. doi:10.1038/s41536-017-0023-2.

[229] Lins LC, Wianny F, Livi S, Hidalgo IA, Dehay C, Duchet-Rumeau J, et al. Development of Bioresorbable Hydrophilic-Hydrophobic Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 2016;17:3172–87. doi:10.1021/acs.biomac.6b00820.

[230] Du J, Chen H, Qing L, Yang X, Jia X. Biomimetic neural scaffolds: a crucial step towards optimal peripheral nerve regeneration. *Biomater Sci* 2018;6:1299–311. doi:10.1039/c8bm00260f.

[231] Bhaskar B, Owen R, Bahmaee H, Wally Z, Sreenivasa Rao P, Reilly GC. Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:1334–40. doi:10.1002/jbm.a.36336.

[232] Leroy A, Pinese C, Bony C, Garric X, Noël D, Nottelet B, et al. Investigation on the properties of linear PLA-poloxamer and star PLA-poloxamine copolymers for temporary biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33:4133–9. doi:10.1016/j.msec.2013.06.001.

[233] Pinese C, Leroy A, Nottelet B, Gagnieu C, Coudane J, Garric X. Rolled knitted scaffolds based on

PLA-pluronic copolymers for anterior cruciate ligament reinforcement: A step by step conception: ROLLED KNITTED SCAFFOLDS. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017;105:735–43.

[234] Breche Q, Chagnon G, Machado G, Nottelet B, Garric X, Girard E, et al. A non-linear viscoelastic model to describe the mechanical behavior's evolution of biodegradable polymers during hydrolytic degradation. *Polym Degrad Stab* 2016;131:145–56. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.07.014.

[235] Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* 2008;14:5641.

[236] Tew GN, Bhatia SR. PLA–PEO–PLA Hydrogels and Their Mechanical Properties. *Eng. Biomater. Regen. Med.* 2012th ed., Springer, New York, NY; n.d.

[237] Kowalski A, Duda A, Penczek S. Polymerization of L-Lactide Initiated by Aluminum Isopropoxide Trimer or Tetramer. *Macromolecules* 1998;31:2114–22. doi:10.1021/ma971737k.

[238] Huang M-H, Li S, Vert M. Synthesis and degradation of PLA–PCL–PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and dl-lactide. *Polymer* 2004;45:8675–81.

[239] Jiang B, Tsavalas JG, Sundberg DC. Water whitening of polymer films: Mechanistic studies and comparisons between water and solvent borne films. *Prog Org Coat* 2017;105:56–66.

[240] Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media. *J Mater Sci Mater Med* 1990;1:123–130.

[241] Wang Y, Pan J, Han X, Sinka C, Ding L. A phenomenological model for the degradation of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2008;29:3393–401. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.042.

[242] Chu CC. The effect of pH on the in vitro degradation of poly(glycolide lactide) copolymer absorbable sutures. *J Biomed Mater Res* 1982;16:117–24. doi:10.1002/jbm.820160204.

[243] Tsuji H, Ikada Y. Properties and morphology of poly(L-lactide). II. hydrolysis in alkaline solution. *J Polym Sci Part Polym Chem* 1998;36:59–66. doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19980115)36:1<59::AID-POLA9>3.0.CO;2-X.

[244] Kissel T, Li Y, Unger F. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:99–134. doi:10.1016/S0169-409X(01)00244-7.

[245] Lu DD, Yuan JC, Li H, Lei Z-Q. Synthesis and characterization of a series of biodegradable and biocompatible PEG-supported poly(lactic-ran-glycolic acid) amphiphilic barbell-like copolymers. *J Polym Sci Part Polym Chem* 2008;46:3802–12. doi:10.1002/pola.22729.

[246] Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging* 1991;13:111–34. doi:10.1177/016173469101300201.

[247] Samur E, Sedef M, Basdogan C, Avtan L, Duzgun O. A robotic indenter for minimally invasive measurement and characterization of soft tissue response. *Med Image Anal* 2007;11:361–73.

[248] Nava A, Mazza E, Kleinermann F, Avis N, McClure J, Bajka M. Evaluation of the mechanical properties of human liver and kidney through aspiration experiments. *Technol Health Care* 2004;12:269–80.

[249] Duch BU, Andersen HL, Smith J, Kassab GS, Gregersen H. Structural and mechanical remodelling of the common bile duct after obstruction. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:111–22.

[250] Coleman R, Kogan I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat* 1998;192:443–6. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19230443.x.

[251] Cartner JL, Hartsell ZM, Ricci WM, Tornetta III P. Can we trust ex vivo mechanical testing of fresh–frozen cadaveric specimens? The effect of postfreezing delays. *J Orthop Trauma* 2011;25:459–461.

[252] Verstraete MA, Van Der Straeten C, De Lepeleere B, Opsomer G-J, Van Hoof T, Victor J. Impact

of drying and thiel embalming on mechanical properties of achilles tendons: Embalming and Drying of Tendons. *Clin Anat* 2015;28:994–1001. doi:10.1002/ca.22624.

[253] Al-Atabi M, Ooi RC, Luo XY, Chin SB, Bird NC. Computational analysis of the flow of bile in human cystic duct. *Med Eng Phys* 2012;34:1177–83. doi:10.1016/j.medengphy.2011.12.006.

[254] Li WC, Zhang HM, Li J, Dong RK, Yao BC, He XJ, et al. Comparison of Biomechanical Properties of Bile Duct Between Pigs and Humans for Liver Xenotransplant. *Transplant Proc* 2013;45:741–7.

[255] Cha JM, Kim M-H, Jang SJ. Early bile duct cancer. *World J Gastroenterol WJG* 2007;13:3409.

[256] Takahashi Y, Takahashi T, Takahashi W, Sato T. Morphometrical evaluation of extrahepatic bile ducts in reference to their structural changes with aging. *Tohoku J Exp Med* 1985;147:301–9.

[257] Hong S-M, Kang GH, Lee HY, Ro JY. Smooth Muscle Distribution in the Extrahepatic Bile Duct: Histologic and Immunohistochemical Studies of 122 Cases. *Am J Surg Pathol* 2000;24:660–7.

[258] Walsh TH, Akoglu T. The muscle content and contractile capability of the common bile duct n.d.:4.

[259] Abé H, Hayashi K, Sato M, editors. *Data Book on Mechanical Properties of Living Cells, Tissues, and Organs*. Tokyo: Springer Japan; 1996. doi:10.1007/978-4-431-65862-7.

[260] Li WG, Luo XY, Johnson AG, Hill NA, Bird N, Chin SB. One-dimensional models of the human biliary system. *J Biomech Eng* 2007;129:164–73. doi:10.1115/1.2472379.

[261] Luo X, Li W, Bird N, Chin SB, Hill NA, Johnson AG. On the mechanical behavior of the human biliary system. *World J Gastroenterol WJG* 2007;13:1384–1392.

[262] Li WG, Hill NA, Ogden RW, Smythe A, Majeed AW, Bird N, et al. Anisotropic behaviour of human gallbladder walls. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013;20:363–75. doi:10.1016/j.jmbbm.2013.02.015.

[263] Jian C, Wang G. Biomechanical study of the bile duct system outside the liver. *Biomed Mater Eng* 1991;1:105–13.

[264] Duch BU, Andersen H, Gregersen H. Mechanical properties of the porcine bile duct wall. *Biomed Eng Online* 2004;3:23.

[265] Canene-Adams K. Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue for Immunohistochemistry. *Methods Enzymol.*, vol. 533, Elsevier; 2013, p. 225–33. doi:10.1016/B978-0-12-420067-8.00015-5.

[266] Charlton DJ, Yang J, Teh KK. A Review of Methods to Characterize Rubber Elastic Behavior for Use in Finite Element Analysis. *Rubber Chem Technol* 1994;67:481–503. doi:10.5254/1.3538686.

[267] Holzapfel GA, Gasser TC, Ogden RW. A new Constitutive Framework for Arterial Wall Mechanics and a Comparative Study of Material Models. In: Cowin SC, Humphrey JD, editors. *Cardiovasc. Soft Tissue Mech.*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2004, p. 1–48. doi:10.1007/0-306-48389-0_1.

[268] Muiznieks LD, Keeley FW. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 2013;1832:866–75.

[269] Kong J. Choledochoscope manometry about different drugs on the Sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2008;14:5907. doi:10.3748/wjg.14.5907.

[270] Fessel G, Frey K, Schweizer A, Calcagni M, Ullrich O, Snedeker JG. Suitability of Thiel embalmed tendons for biomechanical investigation. *Ann Anat - Anat Anz* 2011;193:237–41.

[271] Benkhadra M, Bouchot A, Gérard J, Genelot D, Trouilloud P, Martin L, et al. Flexibility of Thiel's embalmed cadavers: the explanation is probably in the muscles. *Surg Radiol Anat* 2011;33:365–8.

[272] Stefan U, Michael B, Werner S. Effects of three different preservation methods on the mechanical

- properties of human and bovine cortical bone. *Bone* 2010;47:1048–53. doi:10.1016/j.bone.2010.08.012.
- [273] Wilke HJ, Krischak S, Claes LE. Formalin fixation strongly influences biomechanical properties of the spine. *J Biomech* 1996;29:1629–31.
- [274] Giannini S, Buda R, Di Caprio F, Agati P, Bigi A, De Pasquale V, et al. Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons. *Int Orthop* 2008;32:145–51.
- [275] Nazarian A, Hermansson BJ, Muller J, Zurakowski D, Snyder BD. Effects of tissue preservation on murine bone mechanical properties. *J Biomech* 2009;42:82–6. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.09.037.
- [276] Bourgouin S, Bège T, Masson C, Arnoux P-J, Mancini J, Garcia S, et al. Biomechanical characterisation of fresh and cadaverous human small intestine: applications for abdominal trauma. *Med Biol Eng Comput* 2012;50:1279–88. doi:10.1007/s11517-012-0964-y.
- [277] Clavert P, Kempf JF, Bonnomet F, Boutemy P, Marcelin L, Kahn JL. Effects of freezing/thawing on the biomechanical properties of human tendons. *Surg Radiol Anat SRA* 2001;23:259–62.
- [278] Moon DK, Woo SL-Y, Takakura Y, Gabriel MT, Abramowitch SD. The effects of refreezing on the viscoelastic and tensile properties of ligaments. *J Biomech* 2006;39:1153–7.
- [279] COLEMAN R, KOGAN I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat* 1998;192:443–6. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19230443.x.
- [280] Hayashi S, Homma H, Naito M, Oda J, Nishiyama T, Kawamoto A, et al. Saturated Salt Solution Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. *Medicine (Baltimore)* 2014;93.
- [281] Cartner JL, Hartsell ZM, Ricci WM, Tornetta P. Can we trust ex vivo mechanical testing of fresh--frozen cadaveric specimens? The effect of postfreezing delays. *J Orthop Trauma* 2011;25:459–61.
- [282] Verstraete MA, Van Der Straeten C, De Lepeleere B, Opsomer G-J, Van Hoof T, Victor J. Impact of drying and thiel embalming on mechanical properties of achilles tendons. *Clin Anat N Y N* 2015;28:994–1001. doi:10.1002/ca.22624.
- [283] Trabelsi O, del Palomar AP, López-villalobos JL, Ginel A, Doblaré M. Experimental characterization and constitutive modeling of the mechanical behavior of the human trachea. *Med Eng Phys* 2010;32:76–82. doi:10.1016/j.medengphy.2009.10.010.
- [284] Thanoo BC, Sunny MC, Jayakrishnan A. Tantalum-loaded polyurethane microspheres for particulate embolization: preparation and properties. *Biomaterials* 1991;12:525–8.
- [285] Thanoo BC, Jayakrishnan A. Barium sulphate-loaded p(HEMA) microspheres as artificial emboli: preparation and properties. *Biomaterials* 1990;11:477–81.
- [286] Luderer F, Begerow I, Schmidt W, Martin H, Grabow N, Bünger CM, et al. Enhanced visualization of biodegradable polymeric vascular scaffolds by incorporation of gold, silver and magnetite nanoparticles. *J Biomater Appl* 2013;28:219–31. doi:10.1177/0885328212443393.
- [287] Lämsä T, Jin H, Mikkonen J, Laukkarinen J, Sand J, Nordback I. Biocompatibility of a new bioabsorbable radiopaque stent material (BaSO₄ containing poly-L,D-lactide) in the rat pancreas. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI* 2006;6:301–5. doi:10.1159/000092772.
- [288] Nordback I, Rätty S, Laukkarinen J, Järvinen S, Piironen A, Leppiniemi J, et al. A novel radiopaque biodegradable stent for pancreatobiliary applications--the first human phase I trial in the pancreas. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI* 2012;12:264–71. doi:10.1016/j.pan.2012.02.016.
- [289] Vázquez B, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, López Bravo A, San Román J. Radiopaque acrylic cements prepared with a new acrylic derivative of iodo-quinoline. *Biomaterials* 1999;20:2047–53.
- [290] Mawad D, Mouaziz H, Penciu A, Méhier H, Fenet B, Fessi H, et al. Elaboration of radiopaque

- iodinated nanoparticles for in situ control of local drug delivery. *Biomaterials* 2009;30:5667–74.
- [291] James NR, Philip J, Jayakrishnan A. Polyurethanes with radiopaque properties. *Biomaterials* 2006;27:160–6. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.099.
- [292] Nottelet B, Coudane J, Vert M. Synthesis of an X-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly (epsilon-caprolactone). *Biomaterials* 2006;27:4948–54.
- [293] Rode C, Schmidt A, Wyrwa R, Weisser J, Schmidt K, Moszner N, et al. Synthesis and processability into textile structures of radiopaque, biodegradable polyesters and poly(ester-urethanes): Radiopaque, biodegradable polyesters and poly(ester-urethanes). *Polym Int* 2014;63:1732–40. doi:10.1002/pi.4707.
- [294] Lei K, Chen Y, Wang J, Peng X, Yu L, Ding J. Non-invasive monitoring of in vivo degradation of a radiopaque thermoreversible hydrogel and its efficacy in preventing post-operative adhesions. *Acta Biomater* 2017;55:396–409. doi:10.1016/j.actbio.2017.03.042.
- [295] El Ichi S, Zebda A, Alcaraz J-P, Laaroussi A, Boucher F, Boutonnat J, et al. Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body. *Energy Environ Sci* 2015;8:1017–26.
- [296] Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. *Animal Research: Reporting in vivo Experiments—The ARRIVE Guidelines* n.d.:3.
- [297] Hirano S, Tanaka E, Shichinohe T, Suzuki O, Hazama K, Kitagami H, et al. Treatment strategy for hilar cholangiocarcinoma, with special reference to the limits of ductal resection in right-sided hepatectomies. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007;14:429–33. doi:10.1007/s00534-006-1190-5.
- [298] RÈGLEMENT (UE) 2017/ 745 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL - du 5 avril 2017 - relatif aux dispositifs médicaux, modifiant la directive 2001/ 83/ CE, le règlement (CE) no 178/ 2002 et le règlement (CE) no 1223/ 2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/ 385/ CEE et 93/ 42/ CEE n.d.:175.
- [299] PARIENTE J-L, BORDENAVE L, CONORT P. *Biomatériaux, Biomatiériels et Biocompatibilité* n.d.:4.
- [300] Walo M, Przybytniak G, Nowicki A, Świeszkowski W. Radiation-induced effects in gamma-irradiated PLLA and PCL at ambient and dry ice temperatures. *J Appl Polym Sci* 2011;122:375–83.
- [301] Loo JSC, Ooi CP, Boey FYC. Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(l-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials* 2005;26:1359–67. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.05.001.
- [302] Milicevic D, Trifunovic S, Dojcilovic J, Ignjatovic N, Suljovrujic E. The influence of gamma radiation on the molecular weight and glass transition of PLLA and HAp/PLLA nanocomposite. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater At* 2010;268:2744–9.
- [303] Laukkarinen J, Lämsä T, Nordback I, Mikkonen J, Sand J. A novel biodegradable pancreatic stent for human pancreatic applications: a preclinical safety study in a large animal model. *Gastrointest Endosc* 2008;67:1106–12. doi:10.1016/j.gie.2007.10.013.
- [304] Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, Ohdan H, Fudaba Y, Amano H, et al. Biliary complications after duct-to-duct biliary reconstruction in living-donor liver transplantation: causes and treatment. *World J Surg* 2007;31:2222–2229.
- [305] Melcher ML, Pomposelli JJ, Verbese JE, McTaggart RA, Freise CE, Ascher NL, et al. Comparison of biliary complications in adult living-donor liver transplants performed at two busy transplant centers. *Clin Transplant* 2010;24:E137-144. doi:10.1111/j.1399-0012.2009.01189.x.
- [306] Serra T, Ortiz-Hernandez M, Engel E, Planell JA, Navarro M. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2014;38:55–62.

ANNEXES

Annexe I-1 : Internal biliary stenting in liver transplantation

Langenbeck's Archives of Surgery
<https://doi.org/10.1007/s00423-018-1669-y>

ORIGINAL ARTICLE



Internal biliary stenting in liver transplantation

Edouard Girard^{1,2} · Olivier Risse¹ · Julio Abba¹ · Maud Medici^{2,3} · Vincent Leroy⁴ · Mircea Chirica¹ · Christian Letoublon¹

Received: 23 January 2018 / Accepted: 19 March 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Internal biliary stenting (IBS) was reported to decrease biliary complications after liver transplantation (LT) but data in literature is scarce. The aim of the present study was to evaluate our experience with end-to-end choledoco-choledocostomy during liver transplantation with special focus on the influence of IBS on patient and biliary outcomes.

Methods Between 2009 and 2013, 175 patients underwent deceased donor LT with end-to-end choledoco-choledocostomy and were included in the study. Supra-papillary silastic stent was inserted in 67 patients (38%) with small-size (<5 mm) bile ducts (recipient or donor). Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) was scheduled for IBS removal, 6 months after LT. Operative outcomes and survival of patients who received internal stenting (IBS group) were compared with those of patients who did not (no-IBS group). Risk factors for biliary anastomotic complications were identified.

Results Ten patients died (6%) and 104 (59%) experienced postoperative complications. Five-year patient and graft survival rates were 77 and 74%, respectively. Biliary complications were recorded in 61 patients (35%) and were significantly decreased by IBS insertion ($p = 0.0003$). Anastomotic fistulas occurred in 23 patients (13%) and stenoses in 44 patients (25%). On multivariate analysis, high preoperative MELD scores ($p = 0.02$) and hepatic artery thrombosis ($p < 0.0001$) were predictors of fistula; absence of IBS was associated with both fistula ($p = 0.014$) and stricture ($p = 0.003$) formation.

Conclusions IBS insertion during LT decreases anastomotic complication.

Keywords Internal biliary stenting · Anastomotic leak · Biliary stricture

Introduction

Biliary reconstruction during liver transplantation (LT) is usually performed by a duct to duct anastomosis and may be viewed improperly as the easy step of a difficult operation [1]. Complications arising from the biliary anastomosis (leakage, stricture) are usually considered as the technical Achilles

heel of LT; such complications are a significant source of postoperative morbidity and mortality, induce a severe financial burden, and may eventually compromise outcomes [2–4]. Despite significant advances in surgical technique and recipient and donor selection, the incidence of anastomotic biliary complications remains high, ranging from 10 to 50% in the literature [5].

Stenting of the biliary anastomosis has been proposed to preclude biliary complications after LT with contradictory results [1, 6–9]. Intraoperative T-tube placement has been advocated to lower pressure in the biliary system, provide easy postoperative radiological access to the biliary tree, and decrease anastomotic complications [3, 10–12]. Although the debate is still open, a growing number of centers have abandoned T-tube placement along with accumulating evidence pointing out at specific T-tube-induced morbidity and showing safe, efficient, and cost-effective outcomes without T-tube placement [13–18]. The use of internal biliary stenting (IBS) has been reported as a safe alternative to T-tube placement in LT [1, 6, 7]. The main advantage of IBS is the absence of choledochotomy which is a major source of biliary leakage

✉ Edouard Girard
 egirard1@chu-grenoble.fr

¹ Service de Chirurgie Digestive et Générale, Hôpital Michallon, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble-Alpes, Boulevard de la Chantourne, 38700 La Tronche, France

² Laboratory TIMC, CNRS, Grenoble-Alpes University, Grenoble, France

³ Clinical Investigation Center for Innovative Technologies, Grenoble-Alpes University, Grenoble, France

⁴ Department of Gastroenterology, Grenoble-Alpes University, Grenoble, France

after T-tube placement [10, 19]. Although IBS is an interesting option, several technical issues such as the nature of the material (silastic, rubber), optimal stent positioning in the biliary system (supra-papillary vs. trans-papillary), and delays in stent removal require further refinement.

Since January 2009, an IBS insertion program was started in our center in patients who underwent duct to duct biliary anastomosis during LT. The aim of the present study was to evaluate our experience with end-to-end choledoco-choledocostomy during liver transplantation with special focus on the influence of IBS on patient and biliary outcomes.

Material and methods

Study population

From January 2009 to December 2013, 200 patients underwent deceased donor LT in the department of Hepatobiliary Surgery of the Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, France. Of them, 175 patients (88%), aged \geq 18 years, received a whole graft LT with duct-to duct biliary reconstruction and were the subject of the present study.

Technical considerations

Grafts were recovered with the standard classic technique described by Starlz et al. [20], and IGL-1 solution (Waters Medical Systems) was used for organ preservation. A total hepatectomy with caval preservation was performed in all patients. The graft was flushed with 500 mL of 37 °C Albumin solution immediately before portal reperfusion. After the assessment of donor and recipient bile duct diameters, biliary reconstruction was performed using a standardized technique; duct-to-duct biliary reconstruction was performed through an end-to-end choledoco-choledocostomy in all patients. The connective tissue around the donor and recipient bile ducts was thoroughly preserved to avoid periductal devascularization. The posterior face of the biliary anastomosis was made with a 6/0 polydioxanone running suture, and the anterior face with 6/0 polydioxanone interrupted sutures. As a general rule, internal biliary stents (IBS) were positioned if at least one bile duct (graft or recipient) was measured $<$ 5 mm; the decision of stent insertion remained at the discretion of the operative surgeon. The home-made stent was constructed from a silastic tube (8 to 12 French) and was inserted after construction of the posterior anastomotic suture. The stent diameter was chosen as to mold the bile duct walls and the length was tailored to bridge the whole common bile duct from the papilla to the hilar bifurcation. Care was taken to avoid transpapillary stent passage in order to prevent untimely stent migration. Two small (2 mm) lateral holes were

performed at each end and the stent was positioned freely into the bile duct with no suture fixation.

All patients underwent daily liver function tests during the first week after surgery. Doppler ultrasonography was performed immediately after LT, daily during the first 3 postoperative days (POD) and repeated on postoperative days 7 to 10. In the absence of bile leakage, the abdominal drain was progressively mobilized starting POD 7 and was removed on POD 10. Adverse events occurring during the postoperative course that were thought to be stent related prompted immediate stent removal. In the absence of spontaneous migration, an ERCP procedure for stent removal was scheduled 6 months after LT; during the procedure, the stent was removed with an endoscopic staple extractor. Sphincterotomy was systematically performed for stent removal in all patients.

Outpatient follow-up monitoring of liver function tests and Doppler ultrasound was conducted monthly during the first 6 months, at 9 months, 1 year, and annually thereafter.

Definition and management of biliary complications

Biliary fistulas were defined according to the ISGLS classification [21] as bilirubin concentration in the drain fluid at least 3 times the serum bilirubin concentration on or after postoperative day 3, or as the need for radiologic or operative intervention resulting from biliary collections or bile peritonitis. Grade A biliary fistulas caused no change in patient's clinical management; in these situations, prolongation of external drainage was enough to assure cessation of the bile leakage. Grade B fistulas required active therapeutic interventions without laparotomy; radiological drainage and endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) manoeuvres were performed to obtain leakage control and speed up fistula closure. Grade C leakages required reoperation: at the beginning of the study period, an open approach was the rule but the use of an initial laparoscopy approach increased recently. During reoperation for biliary leakage, efforts were made to preserve the biliary anastomosis: lavage and drainage, T tube drainage, anastomosis reconstruction, etc. Dismantling of the anastomosis with intubation and external drainage of the graft bile duct were performed as a last resort in difficult situations.

Biliary stenosis was defined as narrowing of the biliary anastomosis detected on specific imaging exams (MRI cholangiography, ERCP). If other causes (rejection, viral reactivation, etc.) could be overruled, persistent clinical and/or biological cholestasis (increase $>$ 2N of gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase levels) was considered as anastomotic stenosis and managed accordingly. ERCP dilation and stenting were the first-line treatment of anastomotic biliary strictures. Surgery including re-laparotomy and construction of a biliary enteric anastomosis was considered secondarily in case of failure.

Anastomotic biliary complications were defined as biliary fistula and stricture formation involving the site of biliary anastomosis.

Postoperative medication

The induction of immunosuppression protocol was standardized and included the combination of corticosteroids started just before declamping and continued up to the 30th POD, gradually decreasing doses of calcineurin inhibitors (tacrolimus) started 8–12 h post-transplantation then adapted to plasma levels, and mycophenolate mofetil that was added on POD 3 for at least 6 months.

Antibiotic prophylaxis using piperacillin + tazobactam was administered to all patients on a systematic basis; antibiotics were started during LT and were pursued 48 h. In patients who developed infectious complications, administration was extended for at least 10 days relying on perioperative bile culture results and/or bacterial identification and antibiotic susceptibility testing.

Ursodeoxycholic acid was not used for the prevention of biliary complications.

Statistical analysis

Operative mortality and morbidity were defined as death or complications occurring within 90 days after LT. Postoperative complications were classified according to the Clavien-Dindo's classification [22]. Results are expressed as median and first and third quartiles or counts and percent. Survival curves were made using Kaplan-Meier's method and compared with the log-rank test. Survival was defined as the time between LT and death. Patients lost to follow-up for more than 1 year were contacted up to January 2016; when

patients could not be reached directly, family members or general practitioners were contacted. Living patients were censored at the date of the last available information (visit or phone call). Marginal association between single variables and functional outcome was assessed by a Wilcoxon rank-sum test for quantitative variables and Fisher exact test for categorical variables. Univariate and multivariate analyses were performed to identify independent predictors of anastomotic biliary complications. All variables achieving statistical significance at a 0.1 level in the univariate analysis were considered in a multiple logistic model. A backward variable selection procedure with *P* value cut-off at 0.05 was used to identify the set of independent predictors of each considered variable.

Results

Patients

Among 175 patients included in the study, 144 (82%) were men and median age was 57 years [51; 61]. Sixty seven patients (38%) received an IBS while biliary reconstruction without stenting was performed in 108 patients. There was a significantly lower incidence of hepatocellular carcinoma in the IBS group ($n = 18$; 27% vs. $n = 47$; 44%, $p = 0.036$), Table 1.

Intraoperative management

The median operative and cold ischemia times were 400 [335; 450] min and 397 [324; 480] min, respectively; there was no significant difference between the IBS and no-IBS groups (Table 2). The median IBS size was 10 French (range 8F–

Table 1 Characteristics of 175 patients who underwent liver transplantation (LT) across the study period with ($n = 67$) or without ($n = 108$) IBS placement

	LT ($n = 175$) <i>N</i> (%)	IBS ($n = 67$) <i>N</i> (%)	No IBS ($n = 108$) <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Men	144 (82)	58 (87)	86 (80)	0.31
Age	57[20;61]	56 [49;60]	57[50;62]	0.17
Body mass index (kg/m ²) (mean ± SD)	24[22;27]	24[22;27]	24[22;27]	0.60
Indication for LT				
HCC	65 (37)	18 (27)	47 (44)	0.036
Hepatitis C	20 (11)	8 (12)	12 (11)	0.97
Hepatitis B	2 (1)	1 (1)	1 (1)	0.43
Alcohol	91 (52)	38 (57)	53 (49)	0.38
Cirrhosis	159 (91)	60 (87)	99 (92)	0.79
MELD score	17[11;23]	19[12;27]	16[10;22]	0.14
Donor age	57[43;68]	57[41;67]	58[45;71]	0.45
Donor gender (men)	106 (61)	44 (66)	62 (57)	0.31

IBS internal biliary stent

Table 2 Operative characteristics and outcomes of 175 patients who underwent liver transplantation (LT) across the study period with ($n = 67$) or without ($n = 108$) IBS placement

	LT ($n = 175$) <i>N</i> (%)	IBS ($n = 67$) <i>N</i> (%)	No IBS ($n = 108$) <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Operative time (min)	400[335;450]	395[335;440]	405[340;460]	0.53
Cold ischemia time (min)	397[324;480]	410[326;476]	390[324;482]	0.73
Recipient bile duct size (mm)	6[4;7.25]	5[4;7]	6[5;8]	0.0008
Donor bile duct size (mm)	6[5;8]	6[4;7.25]	6[5;8]	0.045
Back table artery reconstruction	28 (16)	11 (16)	17 (16)	1
Right donor artery	28 (16)	12 (18)	16 (15)	0.74
Left donor artery	20 (11)	4 (6)	16 (15)	0.12
Mortality	10 (6)	3 (4)	7 (6)	0.74
Morbidity	104 (59)	36 (54)	68 (63)	0.27
Severe morbidity	83 (47)	29 (43)	54 (50)	0.48
Hepatic artery thrombosis	11 (6)	3 (4)	8 (7)	0.53
Blood transfusion	125 (71)	49 (73)	76 (70)	0.28
Biliary complications	61 (35)	12 (18)	49 (45)	0.0003
Anastomotic biliary fistula	23 (13)	4 (6)	19 (18)	0.036
Anastomotic biliary stricture	44 (25)	8 (12)	36 (33)	0.002
Rejection	27 (15)	8 (12)	19 (17)	0.39
CMV infection	59 (34)	28 (42)	31 (29)	0.11
Reoperation	14 (8)	3 (5)	11 (10)	0.25
ICU stay (days)	7[5;11]	7[5;17]	7[5;10]	0.30
Hospital stay	16[12;24]	15[11;23]	18[12;26]	0.3

IBS internal biliary stent

12F). The median diameter of the recipient bile duct was 5[4; 7] mm in the IBS group and 6[5; 8] mm in patients who did not receive stenting ($p = 0.0008$). Similarly, the median diameter of the donor bile duct was smaller in the IBS group (6[4; 7.25] vs. 6[5; 8] mm, $p = 0.045$) Table 2. Overlap between bile duct size may induce bias in result interpretation and can be explained by IBS insertion if only one bile duct (donor, recipient) was < 5 mm and by non-respect of this rule by the attending surgeon in 9 patients (5%).

Postoperative course

Ten patients died (6%) in the postoperative period. Death occurred 15 days (range 1–86 days) after LT as a result of arterial rupture ($n = 3$), severe sepsis ($n = 5$), mesenteric ischemia ($n = 1$), and stroke ($n = 1$). Operative complications were recorded in 104 patients (59%) and were severe (Dindo-Clavien ≥ 3) in 83 patients (47%). There were no significant differences in operative mortality and overall and severe morbidity between patients with and without IBS Table 2.

Biliary complications

Overall biliary complications occurred in 65 patients (37%). Biliary anastomotic complications occurred in 61 patients

(35%). Non-anastomotic biliary complications occurred in 10 patients (4 IBS, 6 no-IBS) and included bile cast syndrome in 3 patients and ischemic cholangitis in 7 patients; the small number did not allow statistical analysis.

The rate of anastomotic biliary complications was significantly lower in patients who underwent internal biliary stenting ($n = 12$; 18% vs. $n = 49$; 45%, $p = 0.0003$) Table 2. Back table hepatic artery reconstruction was performed in 28 (16%) patients (11 patients IBS, 17 patients no-IBS) because of the presence of replaced right ($n = 28$) and/or left ($n = 20$) donor arteries. Back table artery reconstruction did not influence the rate of anastomotic biliary complications ($p = 0.24$), of biliary fistula ($p = 0.22$), and of anastomotic stenosis ($p = 0.49$).

Anastomotic biliary fistulas occurred in 23 patients (13%). According to the ISGLS classification, there were 1 grade A, 6 grade B, and 16 grade C bile leaks. Median delay in diagnosis of biliary fistulas was 20 days [12; 35]. On univariate analysis, factors predictive of biliary fistula included older age ($p = 0.01$), the absence of IBS ($p = 0.037$), hepatic artery thrombosis ($p = 0.007$), increased preoperative MELD scores ($p = 0.028$), and donor bile duct size ($p = 0.038$) Table 3. There was a trend for increased recipient bile duct size which did not reach statistical significance ($p = 0.07$). In the multivariate model including all these factors, the absence of IBS ($p = 0.014$), hepatic artery thrombosis ($p = 0.0001$), and high

Table 3 Univariate prognostic factor analysis for anastomotic biliary fistula in 175 patients who underwent liver transplantation with duct to duct biliary reconstruction

	Fistula (<i>n</i> = 23) <i>N</i> (%)	No bile leakage (<i>n</i> = 152) <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Age	61[56;64]	56[50;61]	0.01
Operative time (min)	388[330;450]	400[340;453]	0.62
Cold ischemia time (min)	407[335;478]	395[324;480]	0.85
MELD	22[15;31]	16[10;23]	0.03
Recipient bile duct size (mm)	6.5[4.5;10.5]	6[4;7]	0.07
Donor bile duct size (mm)	7[5.5;10.5]	6[4;8]	0.038
IBS	4 (17)	63(41)	0.04
Gender (men)	17 (74)	127(84)	0.25
Hepatic artery thrombosis	5 (22)	6(4)	0.007

IBS internal biliary stent

preoperative MELD scores ($p = 0.02$) were associated with biliary fistula. Management of bile leaks required reoperation in 12 patients. Reoperation included peritoneal lavage and drainage ($n = 7$), T-tube biliary drainage ($n = 2$), external bile-duct intubation ($n = 3$), redo choledoco-choledocal reconstruction ($n = 1$), and biliary digestive reconstruction ($n = 1$). Overall, management of biliary fistulas required 31 ERCP procedures and insertion of 12 biliary stents.

Anastomotic biliary strictures occurred in 44 patients (25%) after a median delay of 3.5 [1.85; 5.7] months. On univariate analysis, the only predictive factor of biliary stricture was the absence of IBS ($p = 0.002$), Table 4. There was a trend for hepatic artery stenosis ($p = 0.08$) and perioperative transfusion (0.076) but figures did not reach statistical significance. In the multivariate model including all these factors, only the absence of IBS ($p = 0.003$) was associated with biliary stricture. Overall, stricture management required 127 ERCP procedures and insertion of 94 biliary stents.

Failure to treat anastomotic biliary complications was directly related to death in 4 patients (2%) and led to graft loss in 7 patients (4%).

IBS management and IBS-related complications

Spontaneous IBS migration occurred in 10 patients (15%). In 4 of them, the IBS migrated into the duodenum with no significant consequences. Intrahepatic IBS migration required stent retrieval in 6 patients. Specific IBS-related complications occurred in 2 (3%) patients (hemobilia $n = 1$, obstructive cholangitis $n = 1$) and required emergency IBS ablation. Eventually, ERCP IBS removal was undertaken in 60 (90%) of the 67 patients after a median delay of 6 [5; 7] months.

A total of 103 patients (58%) underwent at least 1 ERCP procedure after LT including 61 patients (91%) in the IBS group and 42 patients (39%) in the no-IBS group

Table 4 Univariate prognostic factor analysis for anastomotic biliary stenosis in 175 patients who underwent liver transplantation with duct to duct biliary reconstruction

	Stenosis (<i>n</i> = 44) <i>N</i> (%)	No stenosis (<i>n</i> = 131) <i>N</i> (%)	<i>p</i>
Age	55[49;61]	57[51;61]	0.16
Operative time (min)	418[340;465]	393[335;450]	0.29
Cold ischemia time (min)	383[330;471]	402[323;480]	0.59
MELD	17[10;23]	17[11;23]	0.81
Recipient bile duct size (mm)	6[5;7]	6[4;8]	0.85
Donor bile duct size (mm)	6[4;9]	6[5;8]	0.94
Hospital stay after LT (days)	19.5[13;23]	16[11;26]	0.25
IBS	8 (18)	59(45)	0.002
Gender (men)	33(75)	111(85)	0.17
Hepatic artery thrombosis	4 (9)	7 (5)	0.47
Rejection	7 (16)	20(15)	1
Hepatic artery stenosis	13 (30)	22(17)	0.08
Operative morbidity after LT	25(57)	79(60)	0.72
Transfusion	28 (64)	97 (74)	0.076
Anastomotic biliary fistula	6(14)	17(13)	1

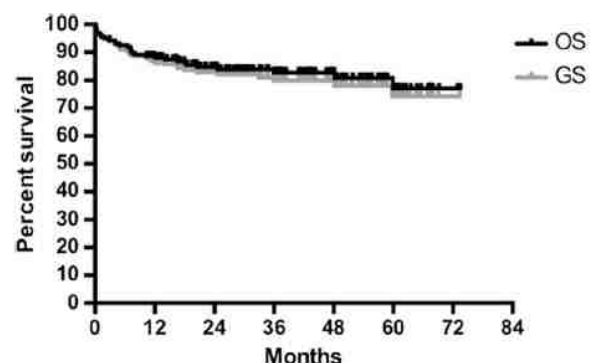
IBS internal biliary stent

($p < 0.0001$). However, the median number of post-LT ERCP procedures/patient was significantly lower in the IBS group when compared to the no-IBS group (median 1 [1; 3] vs. 3.5 [2; 5]; $p < 0.0001$).

Survival

Median patient follow-up was 30 months [17; 47]. Kaplan-Meier patient survival rates at 1, 3, and 5 years were 88, 82, and 77%, respectively (Fig. 1). Patient survival was similar in patients with and without IBS ($p = 0.74$) (Fig. 2).

Graft survival rates at 1, 3, and 5 years were 86, 80, and 74%, respectively (Fig. 1). Seven patients (4%) underwent re-transplantation for VHC recurrence ($n = 3$), arterial

**Fig. 1** Kaplan-Meier overall (OS) and graft (GS) survival of 175 patients who underwent liver transplantation (LT)

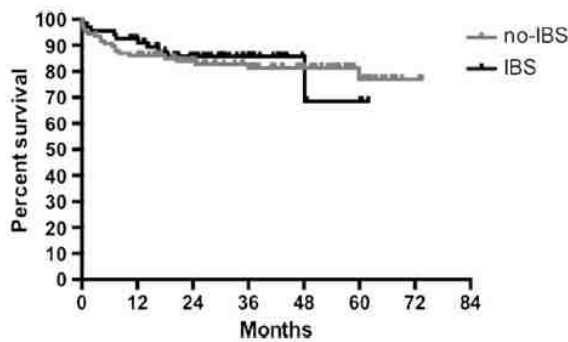


Fig. 2 Kaplan-Meier overall survival curves of patients who underwent liver transplantation (LT) with ($n=67$) or without ($n=108$) IBS placement

thrombosis and ischemic cholangitis ($n=3$), and chronic rejection ($n=1$). IBS had no significant influence on graft survival ($p=0.91$) (Fig. 3).

Discussion

The present study compared outcomes of patients who underwent end-to-end bile duct anastomosis during LT, with ($n=67$) or without ($n=108$) IBS placement over a 7-year period. IBS were inserted preferentially in patients with small-size (donor and/or recipient) bile ducts (<5 mm) who are at higher risk of developing biliary complications, at the discretion of the operating surgeon; this selection criterion is mirrored by the significant smaller size of both donor and recipient bile ducts in the IBS group. The main study finding was a significant decrease in anastomotic biliary complication rates in patients who received IBS. Actually, multivariate analysis revealed that the absence of IBS was an independent predictor of both anastomotic biliary fistula ($p=0.014$) and anastomotic stricture formation ($p=0.003$). On the other hand, IBS had no significant influence on operative morbidity and mortality rates, long-term survival, and graft loss. This

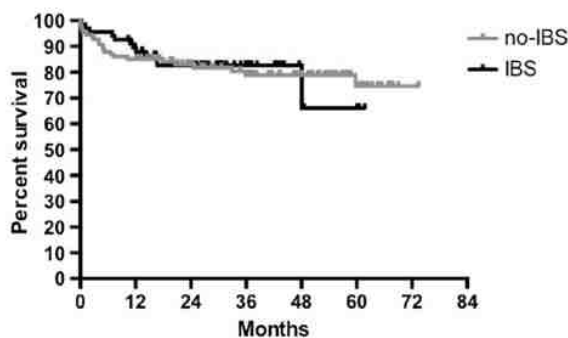


Fig. 3 Kaplan-Meier graft survival curves of patients who underwent liver transplantation (LT) with ($n=67$) or without ($n=108$) IBS placement

can be explained by the fact that biliary complications although time- and resource-consuming cause seldom patient death or graft loss; in accordance with other publications [4, 9], failure to treat biliary complications was directly related to death in 2% and graft loss in 4% of patients in the present study.

Decreasing the incidence and severity of biliary complications is a major goal in liver transplantation. Studies focusing on the topic have identified several risk factors of biliary complications which can be related to the recipient (age [23], high MELD score [2]), to the graft (donor gender [24] and age [2], living vs. deceased [4], degree of steatosis [25]), to operative factors (warm [2] and cold [26] ischemia times, bile duct size [27], transfusion requirements [28], re-transplantation [29]), and to postoperative factors (rejection [29], hepatic artery thrombosis [30], CMV status [31] and the type of immunosuppression [32]). Of them, biliary stent placement targets mainly patients in whom the biliary anastomosis is rendered technically difficult by the small caliber of bile ducts [5]. Studies evaluating the influence of IBS on biliary outcomes after LT are scarce in the literature and the results controversial [1, 2, 6–9]. In accordance with the present findings, Barkun [7] reported a significant decrease of biliary complication by inserting an IBS in a group of 21 patients (4.8% biliary complications) when compared to 30 recent controls (30% biliary complications) and to a historical 224 patients control group (32.6% biliary complications). Similarly, Johnson et al. [6] compared 77 IBS patients with 18 T-tube controls and reported lower biliary complications rates (18 vs. 38%, $p=0.05$) and shorter in-hospital stay (18.3 ± 1.9 vs. 30.1 ± 6 days, $p=0.017$) in the IBS group. In a recent study, Tranchart et al. [1] reported 100% feasibility and good results of IBS insertion in 20 patients with small-size (<5 mm) graft bile ducts. The promising results of this study motivated us to choose a 5-mm bile duct diameter as cut-off for IBS insertion. In contrast, the largest series to date comparing 221 IBS patients to 292 no-IBS patients failed to prove that IBS protects against anastomotic biliary complications although there was a statistical trend ($p=0.06$) [9]. However, the inclusion in this study [9] of patients with Roux-en-Y hepaticojejunostomy and of patients who received split grafts as well as the absence of a multivariate analysis may be confounding when analyzing the results.

Concerns raised by IBS placement during LT include specific drain-related complications and the necessity to perform systematic ERCP for drain removal [1]. In the literature, spontaneous IBS migration was reported in 5–43% of patients and usually had no significant consequences [1, 6]. Severe IBS-related complications were seldom described which is in contrast to the high drain-related morbidity rates recorded after T-tube placement [4]. In the present study, IBS migration occurred in 15% of patients while specific IBS complications (bleeding, cholangitis) occurred in 3% of patients and were

successfully managed by ERCP drain removal. One major shortcoming of IBS placement is the need to perform ERCP for stent removal [1, 9]; this was confirmed in the present study as the number of patients who underwent at least one post-LT ERCP procedure was significantly higher in the IBS group. However, the number of post-LT ERCP procedures/patient was significantly lower after IBS insertion. This is an important finding as reducing the need for (potentially complex) ERCP to treat anastomotic biliary complications may balance the inconvenience of systematic (usually simple) ERCP for drain removal. Recent development of resorbable IBS may be a promising lead to alleviate such drawbacks in the future [33].

The present study has several limitations. First, the study is a retrospective analysis which reflects a single-center experience and the clinical biases therein. Nevertheless, the results provide basic data for the planning and designing of a multi-center randomized controlled trial (RCT) for the analysis of the usefulness of IBS in liver transplantation. Actually, such a RCT is currently ongoing in France [5]. Second, biliary complication rates in the present study were quite high; the use of extended criteria to define biliary complications resulted in the inclusion of subclinical manifestations of fistula and strictures which are usually underreported in the literature.

Conclusion

The placement of internal biliary removable stents in end-to-end ductal anastomosis during liver transplantation is a simple and safe way to decrease biliary anastomotic complications. Specific IBS-related adverse events are seldom recorded and when complications occur they are usually mild. IBS insertion may decrease the number of complex endoscopic procedures/patient after LT. Internal stenting of end-to-end choledococholedocostomy should be considered systematically during liver transplantation.

Authors' contributions Seven authors make substantial contributions to the development of this manuscript. Girard, O. Risse, V. Leroy, and C. Letoublon design the study; E. Girard, O. Risse, and J. Abba performed acquisition of data; M. Medici and M. Chirica made data analysis. E. Girard and M. Chirica wrote the paper; O. Risse, J. Abba, M. Medici, V. Leroy, and C. Letoublon reviewed the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Tranchart H, Zalinski S, Sepulveda A, Chirica M, Prat F, Soubrane O, Scatton O (2012) Removable intraductal stenting in duct-to-duct biliary reconstruction in liver transplantation. *Transpl Int* 25:19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01339.x>
- Welling TH, Heidt DG, Englesbe MJ, Magee JC, Sung RS, Campbell DA, Punch JD, Pelletier SJ (2008) Biliary complications following liver transplantation in the model for end-stage liver disease era: effect of donor, recipient, and technical factors. *Liver Transpl* 14:73–80. <https://doi.org/10.1002/lt.21354>
- Seehofer D, Eurich D, Veltzke-Schlieker W, Neuhaus P (2013) Biliary complications after liver transplantation: old problems and new challenges. *Am J Transplant* 13:253–265. <https://doi.org/10.1111/ajt.12034>
- Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D (2011) Biliary reconstruction, its complications and management of biliary complications after adult liver transplantation: a systematic review of the incidence, risk factors and outcome. *Transpl Int* 24:379–392. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01202.x>
- Goumard C, Cachanado M, Herrero A, Rousseau G, Dondero F, Compagnon P, Boleslawski E, Mabrut JY, Salamé E, Soubrane O, Simon T, Scatton O (2015) Biliary reconstruction with or without an intraductal removable stent in liver transplantation: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 16:598. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-1139-6>
- Johnson MW, Thompson P, Meehan A, Odell P, Salm MJ, Gerber DA, Zacks SL, Fried MW, Shrestha R, Fair JH (2000) Internal biliary stenting in orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 6:356–361. <https://doi.org/10.1053/lt.2000.5303>
- Barkun JS, Tzimas GN, Cantarovich M, Metrakos PP, Deschênes M, Alpert E, Paraskevas S, Tchervenkov JI (2003) Do biliary endoprosthesis decrease biliary complications after liver transplantation? *Transplant Proc* 35:2435–2437
- Bawa SM, Mathew A, Krishnan H, Minford E, Talbot D, Mirza DF, Thick MG, Gibbs P, Manas D (1998) Biliary reconstruction with or without an internal biliary stent in orthotopic liver transplantation: a prospective randomised trial. *Transpl Int* 11(Suppl 1):S245–S247
- Mathur AK, Nadig SN, Kingman S, Lee D, Kinkade K, Sonnenday CJ, Welling TH (2015) Internal biliary stenting during orthotopic liver transplantation: anastomotic complications, post-transplant biliary interventions, and survival. *Clin Transpl* 29:327–335. <https://doi.org/10.1111/ctr.12518>
- Grande L, Pérez-Castilla A, Matus D, Rodríguez-Montalvo C, Rimola A, Navasa M, García-Valdecasas JC, Visa J (1999) Routine use of the T tube in the biliary reconstruction of liver transplantation: is it worthwhile? *Transplant Proc* 31:2396–2397
- Weiss S, Schmidt S-C, Ulrich F, Pascher A, Schumacher G, Stockmann M, Puhl G, Guckelberger O, Neumann UP, Pratschke J, Neuhaus P (2009) Biliary reconstruction using a side-to-side choledococholedocostomy with or without T-tube in deceased donor liver transplantation. *Ann Surg* 250:766–771. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181bd920a>
- Wojcicki M, Milkiewicz P, Silva M (2008) Biliary tract complications after liver transplantation: a review. *Dig Surg* 25:245–257. <https://doi.org/10.1159/000144653>
- Riediger C, Müller MW, Michalski CW, Hüser N, Schuster T, Kleeff J, Friess H (2010) T-tube or no T-tube in reconstruction of the biliary tract during orthotopic liver transplantation—systematic

- review and meta-analysis. *Liver Transpl* NA:NA:NA. <https://doi.org/10.1002/lt.22070>
14. Shimoda M, Saab S, Morrisey M et al (2001) A cost-effectiveness analysis of biliary anastomosis with or without T-tube after orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 1:157–161
 15. Scatton O, Meunier B, Cherqui D, Boillot O, Sauvanet A, Boudjema K, Lanois B, Fagniez PL, Belghiti J, Wolff P, Houssin D, Soubrane O (2001) Randomized trial of choledochocholedochostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 233:432–437
 16. Sotiropoulos GC, Sgourakis G, Radtke A, Molmenti EP, Goumas K, Mylona S, Fouzas I, Karaliotas C, Lang H (2009) Orthotopic liver transplantation: T-tube or not T-tube? Systematic review and meta-analysis of results. *Transplantation* 87:1672–1680. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a5c3f>
 17. Paes-Barbosa FC, Massarollo PC, Bernardo WM, Ferreira FG, Barbosa FK, Raslan M, Szutan LA (2010) Systematic review and meta-analysis of biliary reconstruction techniques in orthotopic deceased donor liver transplantation. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci* 18:525–536. <https://doi.org/10.1007/s00534-010-0346-5>
 18. Amador A, Charco R, Martí J, Navasa M, Rimola A, Calatayud D, Rodriguez-Laiz G, Ferrer J, Romero J, Ginesta C, Fondevila C, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC (2007) Clinical trial on the cost-effectiveness of T-tube use in an established deceased donor liver transplantation program. *Clin Transpl* 21:548–553. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00688.x>
 19. Saab S (2000) Endoscopic management of biliary leaks after t-tube removal in liver transplant recipients: nasobiliary drainage versus biliary stenting. *Liver Transpl* 6:627–632. <https://doi.org/10.1053/jlts.2000.8200>
 20. Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L (1987) An improved technique for multiple organ harvesting. *Surg Gynecol Obstet* 165: 343–348
 21. Koch M, Garden OJ, Padbury R et al (2011) Bile leakage after hepatobiliary and pancreatic surgery: a definition and grading of severity by the International Study Group of Liver Surgery. *Surgery* 149:680–688. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.12.002>
 22. Dindo D, Demartines N, Clavien P-A (2004) Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 240:205–213
 23. Sawyer RG, Punch JD (1998) Incidence and management of biliary complications after 291 liver transplants following the introduction of transcystic stenting. *Transplantation* 66:1201–1207
 24. Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, van der Jagt EJ, Limburg AJ, van den Berg AP, Slooff MJH, Peeters PMJG, de Jong KP, Kleibeuker JH, Haagsma EB (2006) Anastomotic biliary strictures after liver transplantation: causes and consequences. *Liver Transpl* 12:726–735. <https://doi.org/10.1002/lt.20714>
 25. Baccarani U, Isola M, Adani GL, Avellini C, Lorenzin D, Rossetto A, Currò G, Comuzzi C, Toniutto P, Risaliti A, Soldano F, Bresadola V, de Anna D, Bresadola F (2010) Steatosis of the hepatic graft as a risk factor for post-transplant biliary complications. *Clin Transpl* 24:631–635
 26. Park JB, Kwon CHD, Choi G-S, Chun JM, Jung GO, Kim SJ, Joh JW, Lee SK (2008) Prolonged cold ischemic time is a risk factor for biliary strictures in duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation. *Transplantation* 86:1536–1542. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31818b2316>
 27. Marubashi S, Dono K, Nagano H, Kobayashi S, Takeda Y, Umeshita K, Monden M, Doki Y, Mori M (2009) Biliary reconstruction in living donor liver transplantation: technical invention and risk factor analysis for anastomotic stricture. *Transplantation* 88:1123–1130. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ba184a>
 28. Qian YB, Liu CL, Lo CM (1960) Fan ST (2004) risk factors for biliary complications after liver transplantation. *Arch Surg Chic Ill* 139:1101–1105. <https://doi.org/10.1001/archsurg.139.10.1101>
 29. Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN, Grant DR, Wall WJ (1997) Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases. *Liver Transpl Surg* 3:365–373
 30. Seo JK, Ryu JK, Lee SH, Park JK, Yang KY, Kim YT, Yoon YB, Lee HW, Yi NJ, Suh KS (2009) Endoscopic treatment for biliary stricture after adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 15:369–380. <https://doi.org/10.1002/lt.21700>
 31. Kasahara M, Egawa H, Takada Y, Oike F, Sakamoto S, Kiuchi T, Yazumi S, Shibata T, Tanaka K (2006) Biliary reconstruction in right lobe living-donor liver transplantation: comparison of different techniques in 321 recipients. *Ann Surg* 243:559–566. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000206419.65678.2e>
 32. Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, Ohdan H, Fudaba Y, Amano H, Fukuda S, Nakahara H, Ishiyama K, Ohshita A, Kohashi T, Mitsuta H, Chayama K, Asahara T (2007) Biliary complications after duct-to-duct biliary reconstruction in living-donor liver transplantation: causes and treatment. *World J Surg* 31:2222–2229
 33. Sánchez-Cabús S, Calatayud D, Ferrer J, Molina V, Pavel MC, Sampson J, Saavedra D, Fondevila C, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC (2016) Beneficial effect of a resorbable biliary stent in living donor liver transplantation. *Eur Surg Res* 56:123–131. <https://doi.org/10.1159/000443271>

Annexe I-2 : Facteurs de risque des complications biliaires

Facteurs de risque documentés de complications biliaires en transplantation hépatique, basé sur des séries individuelles.

Facteur de risque	Versus	Analysé pour	Nombre de cas (n)	Analyse univariée (P-value)	Analyse multivariée (P-value)	Ref.
Facteur receveur						
Bilirubinémie préop, 19,3 mg/dl (0,94-72,5)	6,2 (0,23-56,8)	les deux	241	0,003	<0,05	[66]
Score de MELD élevé, >35	<35	les deux	41	0,004	0,032	[61]
Facteur greffon						
Donneur femme	Donneur homme	sténose	531	0,02	0,01	[14]
Stéatose >25%	stéatose < 25%	les deux	117		0,002	[70]
Age du greffon >50	<50	sténose	130	0,003	0,003	[82]
Diamètre du choledoque <5mm	>5mm	sténose	283	0,003	0,002	[84]
Facteur chirurgical						
anastomose CC	anastomose CJ	les deux	502	0,008	0,008	[74]
Attelle sur anastomose ; Avec	sans	les deux	241	0,02	<0,05	[66]
Attelle sur anastomose ; Sans	avec	Sténose	256	0,03	0,04	[13]
Durée d'ischémie froide		Sténose	283	<0,001	0,001	[84]
Facteur post-opératoire						
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	256	0,0001	0,001	[13]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	531	0,006	0,001	[14]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	80	0,0001	0,001	[304]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	156	0,006	0,01	[305]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	239		0,002	[82]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	130	0,002	0,002	[77]
Atcd de fistule ; Oui	Non	Sténose	283	<0,001	0,001	[82]
Rejet chronique	sans rejet	les deux	502	0,0006	0,001	[74]
Thrombose artère hépatique ; Oui	Non	sténose	239		0,002	[77]
Thrombose artère hépatique ; Oui	Non	les deux	321	<0,01		[40]
Infection CMV, Oui	Non	les deux	321	<0,01		[40]

Annexe I-3 : Études comparatives avec et sans drain en T

Études comparant les complications biliaires en transplantation hépatique après reconstruction cholédochocholédocienne avec et sans drain en T.

	Sténose biliaire			Fistule biliaire			Complications biliaires / Total		
	Avec	Sans	p	Avec	Sans	p	Avec	Sans	p
Contre									
Scatton*[99]	3/90 (3%)	6/90 (7%)	ns	9/90 (10%)	2/90 (10%)	ns	30/90 (33%)	14/90 (15%)	<0.01
Amador*[100]	1/53 (2%)	3/54 (6%)	ns	20/53 (38%)	3/54 (6%)	ns	32/53 (60%)	6/54 (11%)	<0.01
Randall [94]	8/59 (14%)	7/51 (14%)	ns	5/59 (8%)	0	<0.01	13/59 (22%)	7/51 (14%)	0.01
Wojcicki [11]	3/35 (9%)	2/49 (2%)	ns	6/35 (17%)	2/49 (4%)	ns	11/35 (31%)	4/49 (8%)	0.01
Li [95]	5/33 (15%)	4/51 (8%)	ns	4/33 (12%)	1/51 (2%)	ns	10/33 (30%)	6/51 (12%)	0.04
Shimoda [96]	5/76 (7%)	6/71 (8%)	ns	4/76 (5%)	5/71 (7%)	ns	25/76 (33%)	11/71 (15%)	0.01
Rouch [93]	1/22 (5%)	1/35 (3%)	ns	1/22 (5%)	4/35 (11%)	ns	6/22 (27%)	2/35 (6%)	
Résultats équivoques									
Vougas* [67]	2/30 (7%)	6/30 (20%)	ns	1/30 (3%)	0	ns	5/30 (10%)	6/30 (20%)	ns
Kusano [91]	16/63 (25%)	7/52 (13%)	ns	8/63 (14%)	4/52 (8%)	ns	24/63 (38%)	11/52 (21%)	ns
En faveur									
Lopez* [101]	2/95 (2%)	13 (14%)	<0.01	4/95 (4%)	3/92 (3%)	ns	24/95 (26%)	18/92 (19,6%)	ns
Nuno* [102]	1/50 (2%)	6/48 (13%)	ns	3/50 (6%)	8/48 (17%)	ns	5/50 (10%)	16/48 (33%)	0.01
Weiss* [103]	7/99 (7%)	8/95 (8%)	ns	5/99 (5%)	9/95 (9%)	ns	27/99 (27%)	50/95 (53%)	<0.01
Rabkin [17]	7/124 (6%)	10/44 (23%)	<0.05	36/124 (29%)	1/44 (2%)	ns	43/124 (35%)	11/44 (25%)	ns
Rolles [92]	0	10/90 (11%)		4/16 (25%)	10/90 (11%)	ns	4/16 (25%)	20/90 (22%)	ns
Girard [51]	5/53 (9%)	67/174 (39%)	0.05	1/53 (2%)	52/174 (30%)	<0.01	-	-	-

* Étude prospective randomisée

En grisé : les résultats statistiquement significatifs ($p < 0,05$)

Annexe I-4 : Études comparatives IBS

Études comparant les complications biliaires en transplantation hépatique après reconstruction cholédochocholédocienne avec drain biliaire interne (IBS) et sans drain biliaire interne (sans IBS).

	Sténose biliaire			Fistule biliaire			Complications biliaires / Total		
	IBS	Sans IBS	p	IBS	Sans drain	p	IBS	Sans IBS	p
Contre									
Bawa* [104]	1/18 (6%)	0	ns	2/18 (11%)	0	ns	9/18 (50%)	1/19 (5%)	0.01
Mathur [107]	46/221 (21%)	44/292 (15%)	ns	40/221 (18%)	70/292 (24%)	ns	102/221 (46%)	128/292 (44%)	ns
En faveur									
Barkun [20]	-	-	-	-	-	-	1/21 (5%)	9/30 (30%)	0.02
Girard [22]	8/67 (12%)	38/108 (33%)	0.02	4/67 (6%)	19/108 (18%)	0.04	12/67 (18%)	49/108 (45%)	<0.01

* Étude prospective randomisée

En grisé : les résultats statistiquement significatifs

Étude comparant les complications biliaires en transplantation hépatique après reconstruction cholédochocholédocienne avec drain biliaire interne (IBS) ou drain en T.

	Sténose biliaire			Fistule biliaire			Complications biliaires / Total		
	IBS	Drain en T	en p	IBS	Drain en T	en p	IBS	Drain en T	p
En faveur									
Johnson [62]	5/66 (8%)	2/18 (11%)	ns	6/66 (9%)	4/18 (22%)	ns	12/66 (18%)	9/18 (50%)	0.01

En grisé : les résultats statistiquement significatifs

Annexe I-5 : Techniques de mises en forme applicables aux stents biliaires

Plusieurs mises en forme des copolymères PLA-*b*-PEG-*b*-PLA ont été envisagées au cours de cette étude selon l'utilisation désirée. Ce paragraphe annexe a pour objectif de décrire succinctement les techniques de mises en forme employées ou utilisables dans le cadre de la création d'un RIBS, i.e. une structure tubulaire et ce de manière industrialisable.

1. FILMS PAR EVAPORATION DE SOLVANT, PUIS COLLAGE

Il s'agit de la première méthode qui nous a permis de réaliser un prototype du RIBS (**Figure Ann-1**). Les films de copolymères ont tout d'abord été préparés par évaporation de solvant. Pour cela, ils sont dissouts dans du solvant (1 g de polymère pour 10 mL de solvant) puis les solutions obtenues sont disposées dans des moules métalliques (aluminium) à fond plat et recouverts d'entonnoirs afin de ralentir l'évaporation du solvant et ainsi éviter l'apparition de bulles dans le matériau. Après une nuit d'évaporation, les films obtenus sont décollés et séchés sous vide (**1**). Une plaque rectangulaire de 45 x 1,5 mm² était découpée à partir du film (**2**), puis enroulée autour d'une tige en Nickel-Titane de 4,6 mm de diamètre (**3**). Le collage s'effectuait avec de l'acétone appliqué sur la tranche de section, et maintien en contact des deux tranches pendant 30 secondes. La prothèse était ensuite retirée de la tige métallique après immersion dans de l'azote liquide (**4**). La prothèse (**5**) présentait les caractéristiques suivantes : diamètre externe de 5,6 mm, diamètre interne de 4,6 mm, et longueur de 45 mm.

Cette technique, idéale pour réaliser les prototypes n'est pas reproductible à grande échelle, et donc impossible à industrialiser. Les autres techniques de mises en forme testées ensuite sont censées palier ce problème.

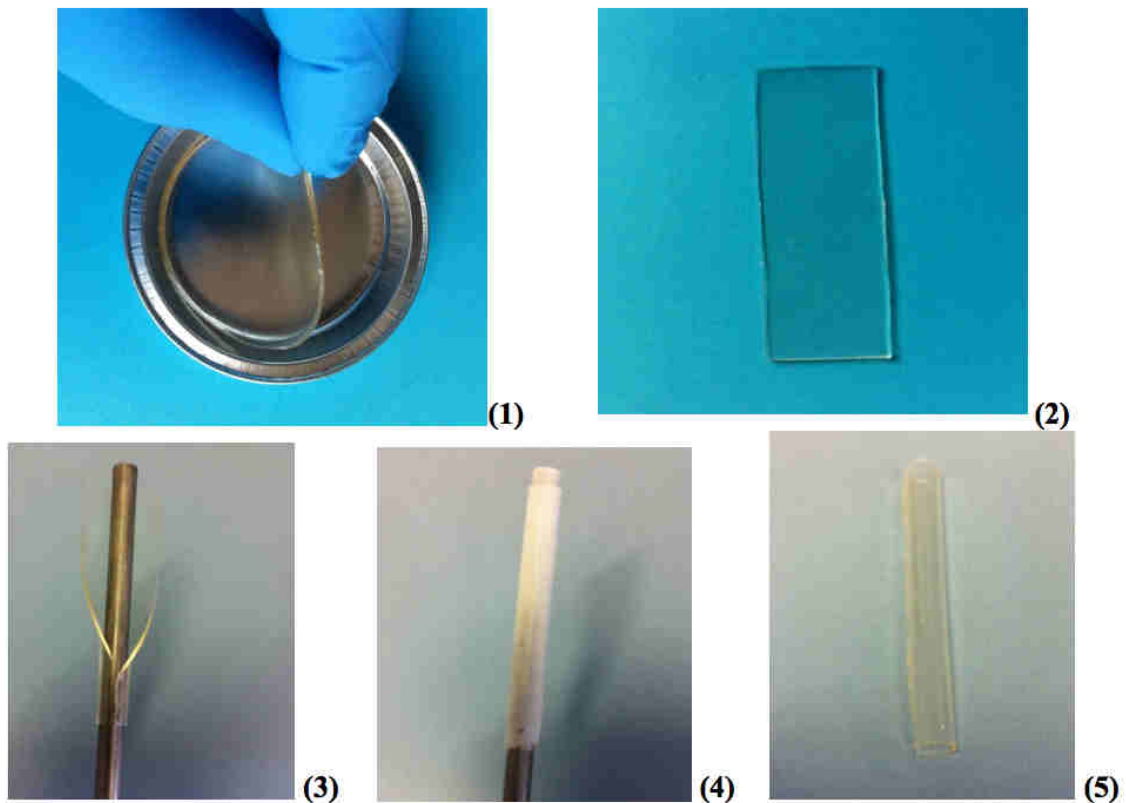


Figure Ann-1 : Étapes de la mise en forme de la prothèse en réalisant des films par évaporation de solvant puis collage

2. ÉLECTROSPINNING

L'électrospinning ou électrofilage est une technique de mise en forme devenue très populaire dans les domaines des biomatériaux et de l'ingénierie tissulaire, qui permet de produire des fibres de diamètres micrométriques voire nanométriques (typiquement d'une échelle de l'ordre de 50 nm à 1 μm), grâce à l'application d'un champ électrique. Le procédé de fabrication est représenté sur la **Figure Ann-2**. Le polymère solubilisé est diffusé en continu à partir d'une seringue chargée positivement, un collecteur métallique cylindrique en rotation est chargé négativement. Lorsque la solution de polymère chargée sort de la seringue, le champ électrique entraîne une attraction de cette dernière vers le collecteur négativement chargé. Ce phénomène induit l'évaporation du solvant et la formation de nano-fils, qui viennent se déposer sur le collecteur métallique en rotation, afin de former progressivement un tube. Ce procédé à l'avantage de permettre la fabrication de tubes très légers et très souples. Les tubes sont également poreux, ce qui facilite la colonisation cellulaire. Les polymères ne sont pas tous compatibles avec ce procédé de mise en forme, l'électrospinning avec de la PCL permet la formation de tubes solides (**Figure Ann-3A**). En revanche, l'électrospinning du PLA₅₀-b-PEG-

b-PLA₅₀ aboutissait à la formation d'une structure extrêmement souple qui ne gardait pas sa forme tubulaire spontanément, le PLA₉₄ était quant à lui friable très difficilement détachable du collecteur métallique (**Figure Ann-3B**).

Les conditions de réalisation étaient les suivantes : dilution dans un solvant mixte éthanol/chloroforme (30/70) avec 10% de matière de polymère, vitesse de diffusion de 10 ml/h, distance aiguille-collecteur 15cm, courant de 11 kVolt.

Ce procédé n'a pas été sélectionné pour 2 raisons : les polymères sélectionnés dans l'étude préliminaire (PLA₉₄ ou PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀) ne permettaient pas de réaliser des tubes par électrospinning, et les tubes formés en PCL présentait des caractéristiques mécaniques qui ne correspondaient pas au cahier des charges (trop souples, se collabant à la moindre contrainte radiale).

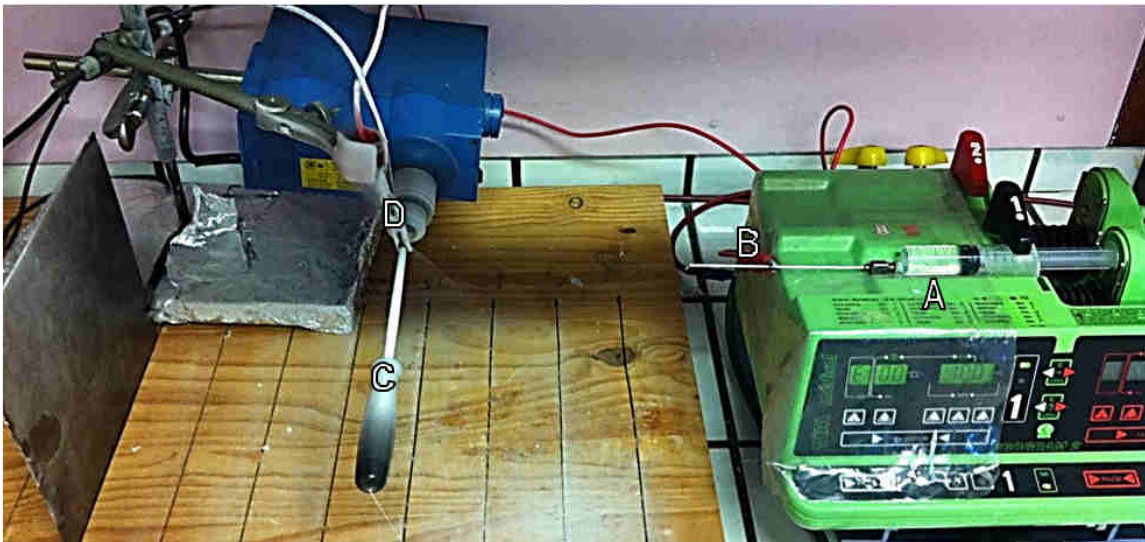


Figure Ann-2 : Technique d'électrospinning. (A) Diffusion continue de la solution de polymère. (B) aiguille connectée à la borne positive du générateur. (C, D) Collecteur métallique en rotation connecté à la borne négative du générateur.

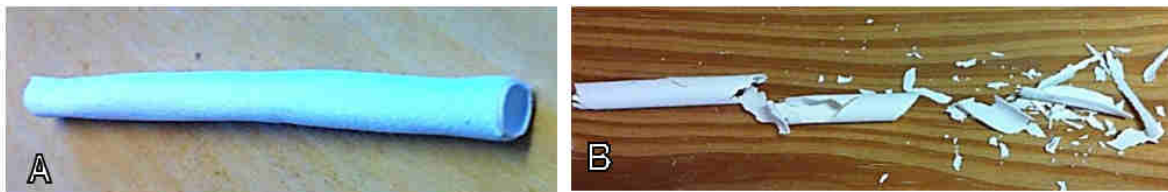


Figure Ann-3 : (A) Prothèse en polycaprolactone (PCL) réalisée par électrospinning. (B) Tentative de réalisation d'une prothèse en PLA₉₄ par électrospinning.

3. LE PROTOTYPAGE 3D

3.1. Généralités sur le prototypage 3D

Le prototypage rapide (ou impression 3D) est une technologie de fabrication additive qui repose sur l'impression d'un objet couche par couche. La 1^{ère} étape consiste à modéliser l'objet via un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) puis le fichier est exporté vers le logiciel d'imprimante 3D (slicer) qui va trancher l'objet couche par couche (**Figure Ann-5e**). L'objet est ensuite imprimé selon les coordonnées X, Y et Z transmises par le fichier 3D.

Plusieurs types de prototypages rapides sont apparus : la *stéréolithographie*, permet d'imprimer des objets par la photo-polymérisation de résines via un rayonnement ultraviolet ; le *polyjet*, projection de microgouttelettes de matière photopolymérisable par ultraviolet ; le *frittage laser*, permet l'impression par la fusion et la solidification d'une poudre via la température générée par un faisceau laser de CO₂ ; la *fusion par faisceau d'électrons* est un procédé similaire au frittage laser, la poudre est fondue via un faisceau d'électrons sous vide.

La technologie de *dépôt de matière en fusion* (Fused Deposition Modeling FDM), qui permet le prototypage et la production en petite série d'objets, nous semblait être la plus appropriée pour notre application. La technologie FDM (**Figure Ann-4**) consiste à extruder un filament thermoplastique à travers une buse, et à déposer couche par couche la matière en fusion sur un plateau jusqu'à l'impression complète de l'objet. L'utilisation de PLA est aujourd'hui répandue pour le prototypage 3D. Serra et al. [306] décrivent le prototypage de *scaffolds* à partir d'une solution de PLA et de PEG, avec l'utilisation de PEG de faible masse moléculaire comme plastifiant pour faciliter le prototypage. Nous avons réalisé un prototype de RIBS par la technologie FDM. Le PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ étant synthétisé au laboratoire, il n'existe pas de monofilament commercial pouvant être directement utilisé en impression 3D de type FDM. Il a donc dans un premier temps fallu extruder nos propres filaments de diamètre réguliers 1,65 mm ± 0,1. Ceci a été réalisé sur une extrudeuse Noztek Pro. Le filament visqueux récupéré en sortie de buse était refroidi par air pour former un filament solide homogène. La température d'extrusion (160°C) et le refroidissement en sortie de buse sont des paramètres à mettre au point pour pouvoir contrôler l'homogénéité du diamètre du filament. Une fois le filament formé, il peut être introduit dans l'imprimante 3D via la roue d'entraînement. Celui-ci est ensuite extrudé, et déposé en fusion couche par couche sur le plateau d'impression.

2016)

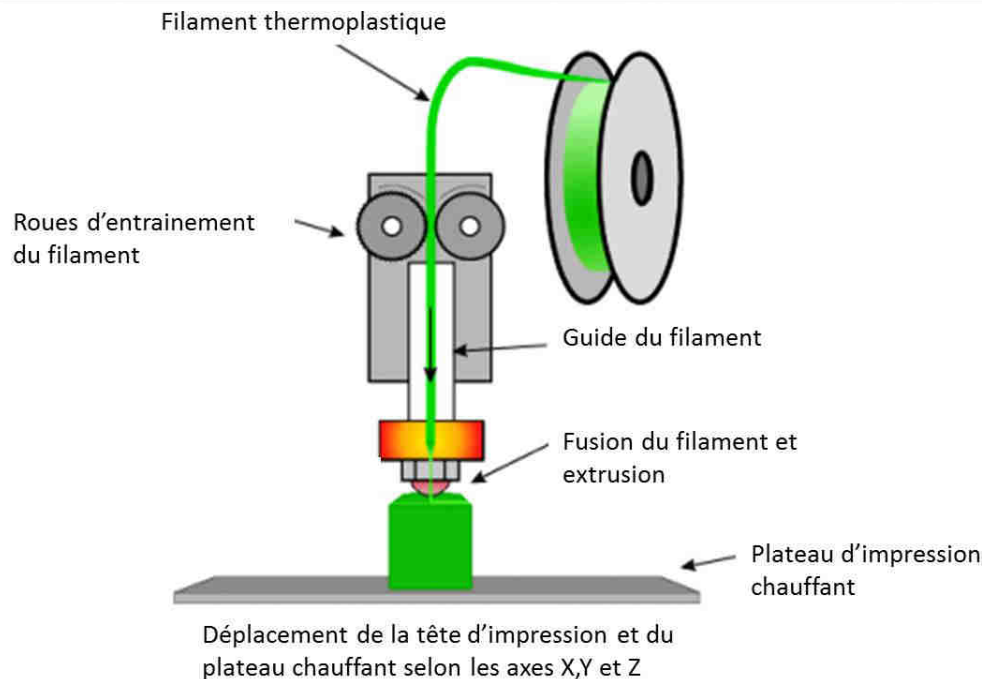


Figure Ann-4 : Technologie d'impression 3D par FDM (d'après la thèse de S. LEPRINCE)

3.2. Les limites de l'impression 3D par le dépôt de matière en fusion

Plusieurs paramètres d'impression 3D doivent être modulés afin d'obtenir un prototype correspondant au cahier des charges, notamment en termes de résolution d'impression. La *vitesse d'extrusion* puisqu'une vitesse trop faible ou trop importante peut entraîner des défauts d'impression. La *température de la buse*, qui si elle est trop élevée peut entraîner une surchauffe à l'origine de défauts d'impression (pièce déformée, bords irréguliers...), notamment sur les pièces de petites dimensions. La *température du plateau chauffant*, qui en fonction du matériau utilisé, permet une meilleure adhérence de l'objet sur le plateau. Le *refroidissement du matériau en sortie de buse* est indispensable car sinon il peut y avoir un affaissement de la couche successive sur la précédente. Le *choix des épaisseurs de couches*, une première couche d'impression plus épaisse permet une meilleure adhérence de l'objet sur le plateau d'impression.

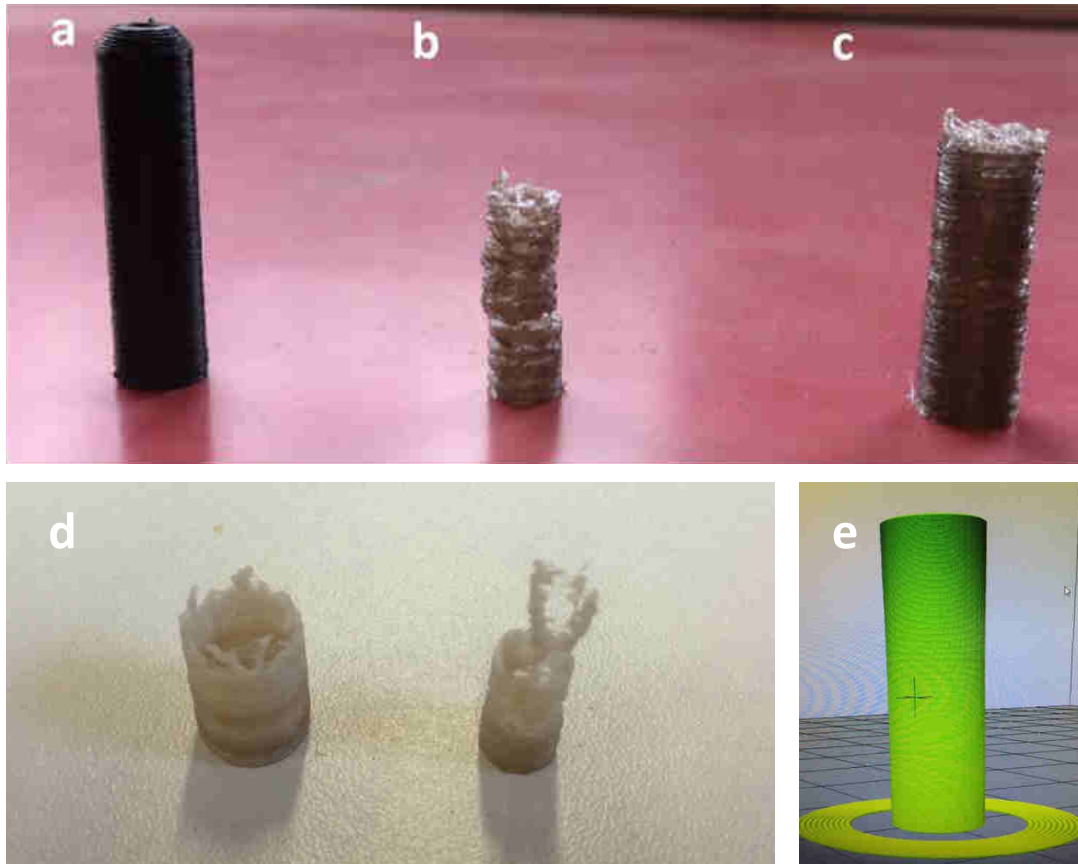


Figure Ann-5 : Prototypes et échecs de prototypes mis en forme par impression 3D : (a) tube en PLA₁₀₀ ; (b et c) tubes en PLA-*b*-PEG-*b*-PLA (*température de la buse trop élevée et mauvais refroidissement du matériau en sortie de buse*) ; (d) Tubes en PLA-*b*-PEG-*b*-PLA/PCL-TIB (*vitesse d'extrusion trop rapide et calibre du fil inconstant*) ; e. prototype modélisé par ordinateur.

Il faut également tenir compte du risque de dégradation du polymère utilisé lors du procédé d'impression 3D. En effet, les procédés de mise en forme par extrusion à chaud sont des procédés susceptibles de dégrader le polymère (*cf. CHAP. I §5.2.3*). Les propriétés du prototype *in fine* peuvent donc être altérées par le processus d'impression. De plus, le prototypage rapide est comme son nom l'indique destiné principalement pour la confection de prototypes. L'impression 3D n'est pas aujourd'hui destinée à la production de pièces en grandes séries.

3.3. Le moulage par injection

Le procédé de moulage par injection consiste à injecter un matériau thermoplastique dans un moule afin que celui-ci prenne la forme du moule après refroidissement. L'ensemble des étapes sont effectuées sous azote. La poudre de polymères est préchauffée jusqu'à 120-130° dans la chambre d'injection thermo-régulée grâce au fourreau de plastification. La matière

fondue est injectée sous pression dans le moule avec insert (l'épaisseur du tube est contrôlée avec les dimensions de l'insert). L'arrivée de matière reste constante dans le moule afin d'éviter un retrait de matière pendant la phase suivante de refroidissement du moule. La matière une fois refroidie a pris la forme du moule et le tube est alors démoulé. De la même manière que pour l'impression 3D, le procédé de moulage par injection est susceptible d'entraîner une dégradation des chaînes du copolymère et de modifier les propriétés du matériau (*cf. CHAP. I §5.2.3*).

Ce procédé permet une reproductibilité et la production en grande série des pièces, la réalisation d'un tube n'est pas évidente, avec un risque d'abimer la pièce au démoulage. C'est cependant cette technique qui a été utilisée pour la mise en forme des RIBS testés sur pièces anatomiques (*cf CHAP. IV §3.7*), avec les conditions décrites ci-dessus (**Figure Ann-6**).



Figure Ann-6 : Prototype de RIBS réalisé par moulage par injection.

Annexe I-6 : Radiopaque PCL as additive for X-ray imaging



RSC Advances

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 84125Radiopaque poly(ϵ -caprolactone) as additive for X-ray imaging of temporary implantable medical devices†Rémi Samuel,^a Edouard Girard,^{bcd} Grégory Chagnon,^{cd} Stéphane Dejean,^a Denis Favier,^{cd} Jean Coudane^a and Benjamin Nottelet^{*a}

Implantable polymeric medical devices suffer from a lack of visibility under current clinical imaging techniques. To circumvent this problem, poly(ϵ -caprolactone-co- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone)s (PCL-TIB) containing from 3.5% to 24% of triiodobenzoate- ϵ -caprolactone units were synthesized as new X-ray macromolecular contrast agents. Physico-chemical and thermal properties of PCL-TIBs were evaluated by ¹H NMR, SEC, DSC and TGA. Their potential as radio-opacifying additive for medical devices was evaluated by preparing polymeric blends of PCL-TIB with various (co)polyesters. At first, *in vitro* X-ray visibility of PCL/PCL-TIB blends was evaluated. A more in depth characterization was then carried out based on PCL/PLA₅₀-PEG-PLA₅₀ blends. The impact of PCL-TIB content on the mechanical properties of blends was evaluated by tensile tests. Stability of X-ray visibility was evaluated by *ex vivo* implantation of non-degraded blends and of blends degraded for 6 weeks *in vitro*. Finally, cytocompatibility was assessed by evaluating the proliferation of L929 fibroblasts on the blends.

Received 21st September 2015
Accepted 29th September 2015

DOI: 10.1039/c5ra19488a

www.rsc.org/advances

Introduction

Medical imaging has a strong impact on modern medicine practice and participates to the raise of advanced applications including *in vivo* cell marking, early diagnosis of diseases, image-guided therapy or post-surgical medical devices follow-up.^{1,2} This is in particular the case of X-ray imaging, a low cost imaging technique that has been used for over a century and provides good spatial resolution with no limit on tissue penetration depth. In the early 70's, X-ray computed tomography (CT) was developed to produce cross-sectional images of the body. The mechanism of CT imaging is based on the absorption of X-rays as they pass through tissues with distinct degrees of attenuation that depend on the atomic number and electron density of the tissues.³ The differences in absorption between bone, fat, water, and air yield high contrast images of anatomical structures. To achieve a signal that is sufficient for clinical

purposes, contrast agents (CAs) are however generally required. The principle of CAs is to increase the signal to noise ratio (SNR) relative to surrounding tissues to provide clear discrimination between normal and pathological regions in areas of interest.¹ CAs are therefore found in all molecular imaging modalities currently in use, including X-ray radiography/computed tomography (CT). Classical low molecular weight CT CAs or radio-opacifying agents include gold nanoparticles, heavy metal powders (tantalum), inorganic salts of heavy elements (barium sulfate, bismuth sulfide), or organic compounds containing a heavy atom (iodine).⁴⁻⁶ Small-molecular mass CAs are however characterized by rapid extravasation and clearance. They are also known to induce recurrent problems like acute renal toxicity or adverse allergic and pseudo-allergic reactions.^{4,7} These factors, in addition to the ionizing character of X-ray, explain that X-ray imaging still represents today only *ca.* 7% of the medical images.

A renewed and strong interest is however currently witnessed based on two approaches. The first one is the development of micro-computed tomography (μ CT) application to soft tissues, where specific X-ray CAs with a selective biodistribution have been designed.^{8,9} The second one is the development of macromolecular CAs.^{10,11} Indeed, polymeric biomaterials featuring radio-opacity attract considerable scientific attention since it is highly desirable to visualize medical devices such as cardiovascular implants, prostheses, orthopedic implants *via* routine X-rays computed tomography. In that frame, aliphatic polyesters are among the most common degradable polymers used in medical applications. Aliphatic polyesters include the

^aInstitute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247, Department of Artificial Biopolymers, CNRS, University of Montpellier, ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France. E-mail: benjamin.nottelet@umontpellier.fr

^bCHU de Grenoble, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France

^cUniversité Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France

^dCNRS, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: FT-IR spectra of TIBA and TIBC; ¹H NMR spectrum of TIBC; ¹H NMR spectrum of PCL-TIB_{3.5}; thermograms of PCL-I₅₀ and PCL-TIB_{3.5}; *in vitro* X-ray images of PCL-TIB/PCL films; dogbone-style tensile specimens used for tensile tests; binary X-ray images of PCL-TIB/PLA₅₀-b-PEG-b-PLA₅₀ blends. See DOI: 10.1039/c5ra19488a

well-known poly(lactide) (PLA), poly(glycolide) (PGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and their copolymers, like poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). This family of polymers has been a first choice for a variety of biomedical applications, ranging from surgical suture to implants or drug nanocarriers.^{12,13} This success story originated during the resorbable-polymer-boom of the 1970s and 1980s and is mostly due to their demonstrated biocompatibility and biodegradability that led to their validation by the regulatory agencies worldwide. Aliphatic polyesters and their copolymers are thermoplastics that present numerous advantages like tailorable degradation kinetics and mechanical properties, ease of shaping and manufacture. Their broad spectrum of properties can easily be tuned by the use for instance of lactic acid-based stereocopolymers, or copolymerization with the biocompatible hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG).^{14,15} This is therefore not surprising to find them as core materials in the innovation pipeline of medical imaging strategies.

However aliphatic polyesters, as most polymeric biomaterials, are transparent to X-rays. They are generally made radiopaque by addition of an X-ray absorbing additive such as metal powders, metal salt based on tantalum, barium, bismuth, gold *etc.*^{16–19} For example Lamsa *et al.* reported on a radiopaque stent composed of PLA96 with 25 wt% of BaSO₄ that was used as radiopaque bioabsorbable biliary stents.^{20,21} To avoid leaching of potentially metallic compounds, organic-inorganic hybrids were also prepared *via* the sol-gel process starting from a dihydroxy-terminated polyester poly(1,4-butylene-glutarate) (PBG), PLA or PCL and a titanium alkoxide (TIPT) as titanium precursors.²² It was demonstrated that a transesterification reaction of the polymer chain occurring *in situ* led to organo-titanium esters connecting organic and inorganic domains that demonstrated radio-opacity.²³

To circumvent the problem of potential toxicity encountered with metallic additives,²⁴ organic radio-opacifiers containing heavy atoms such as bromine or iodine were also proposed. However, the resulting polyester/radio-opacifier blends also suffer from leaching problems that result in the loss of imaging capabilities and potential toxicities. To avoid leaching, Koole *et al.* reported recently on biocompatible and PLA-miscible iodinated contrast agent, namely (*S*)-2-hydroxy-3-(4-iodobenzoyloxy) propanoic acid that has a plasticizing effect due to structural compatibility with PLA.²⁵ The blend obtained with 10 wt% contrast agent yielded about 25% attenuation compared to aluminum. However, although blend compatibility was improved, no covalent bond was still found between the PLA backbone and the organic opacifier.

To achieve this goal, two strategies are described. The first one relies on covalent grafting of radio-opacifiers to polymer backbone in a post-polymerization modification strategy. In a second approach, iodinated monomers are copolymerized to yield radiopaque copolymers. These methodologies have been applied to various polymeric materials including cellulose,^{26,27} poly(meth)acrylates,^{3,28–35} polyurethanes,^{6,36,37} polyphosphazenes³⁸ or polycarbonates.³⁹ However, only few studies report on aliphatic polyesters conjugates for X-ray modalities. To the best of our knowledge, the first radiopaque polyester bearing iodine was

described by our group.⁴⁰ Poly(ϵ -caprolactone-co- α -iodo- ϵ -caprolactone) (PCL-I) was synthesized by introducing iodine in the α position of the carbonyl group of PCL thanks to an anionic activation of PCL followed by substitution with iodine. Copolymers containing from 10% to 25% of iodized-units were thus obtained. In another strategy iodinated PCLs were prepared by copolymerization of α -iodo- ϵ -caprolactone with ϵ -caprolactone.^{41,42} The X-rays opacity was assessed, and appeared high enough to be of interest for biomedical applications although stability of aliphatic carbone-iodine bond could be improved. More recently, Olsen *et al.* reported on the copolymerization of ϵ -caprolactone and 1,4,8-trioxaspiro-[4,6]-9-undecanone to yield after oxime ligation a copolyester containing 13% of iodized-units.⁴³ However, limited thermal stability of oxime grafts was reported. Other radiopaque biodegradable polyesters have been prepared by ring-opening polymerization of lactide and ϵ -caprolactone using an iodinated initiator, namely 2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl bis(2,3,5-triiodobenzoate).⁴⁴ The resulting polyesters exhibited a radio-opacity of 60–124% relative to an aluminum sample of the same thickness and could be electrospun into nanofibers. Similarly, biodegradable radiopaque iodinated poly(ester-urethane) based on PCL oligomers and iodinated bisphenol containing up to 30 wt% iodine,⁴⁵ or salicylate-based poly(anhydride-ester),⁴⁶ have been reported. It should be noted that, whereas attenuation similar or even higher than aluminum and good cytocompatibility were shown with the poly(ester-urethane)s, cytotoxicity was observed towards L929 mouse fibroblasts with the iodinated salicylate-based poly(anhydride-ester)s.

Considering this limited number of radiopaque copolymers available, and keeping in mind temporary implantable medical device as a final application, we aim in this work at providing a new radiopaque PCL for X-ray imaging with improved stability with respect to poly(ϵ -caprolactone-co- α -iodo- ϵ -caprolactone) (PCL-I). The synthesis of poly(ϵ -caprolactone-co- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB) based on anionic activation and post-polymerization modification of PCL is first described. Thermal properties and stability compared to PCL-I are then discussed before evaluation of PCL-TIB cytocompatibility towards L929 fibroblasts. Finally, the potential of PCL-TIB as macromolecular radio-opacifier is assessed through the preparation of blends of PCL-TIB and PLA-PEG copolymers. Blends have been characterized in terms of mechanical and imaging properties with in particular evaluation of the X-ray visibility *ex vivo* over a 6 weeks degradation period.

Experimental part

Materials

PCL ($M_n \approx 32\,000\text{ g mol}^{-1}$), 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA, 98%), thionyl chloride (97%), lithium diisopropylamide (LDA, 2 M in THF/heptane/ethylbenzene), were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). NH₄Cl (>99%) was obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade MgSO₄ from Carlo Erba (Val de Reuil, France), methanol (MeOH, $\geq 99.8\%$), dichloromethane (DCM, $\geq 99.9\%$) and anhydrous tetrahydrofuran (THF, $\geq 99.9\%$) from Sigma-

Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). THF was distilled on benzophenone/sodium until a deep blue color was obtained. PrestoBlue™, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12), Phosphate Buffered Saline (PBS), sterile Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DBPS), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin, streptomycin, and glutamine were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). BD Falcon™ Tissue Culture Polystyrene (TCPS) 24-well plates were purchased from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) and Viton® O-rings from Radiospares (Beauvais, France).

Characterizations

The number average molecular weight (\overline{M}_n) and dispersity (D) of the polymers were determined by size exclusion chromatography (SEC) using a Waters 515 HPCL pump fitted with a PLGel 5 μm mixed C pre-column (50×7.5 mm) a PLGel 5 μm mixed C column (600×7.5 mm) and a Waters 410 refractive index detector. The mobile phase was CHCl_3 at 1 mL min^{-1} flow and 25°C . Typically, the polymer (5 mg) was dissolved in CHCl_3 (1 mL), and the resulting solution was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore filter before injection of $20 \mu\text{L}$ of filtered solution. M_n was expressed according to calibration using polystyrene standards.

For stability studies, polymers were analyzed by SEC using a Waters 515 HPCL pump fitted with a PLGel 5 μm Guard column (50×7.5 mm), a PLGel 10 μm 500 Å columns (600×7.5 mm), a PLGel 10 μm 50 Å columns (300×7.5 mm), Waters 2410 refractive index detector and Waters 2996 photodiode array detector. The mobile phase was THF at 1 mL min^{-1} flow and 25°C . Typically, the polymer (5 mg) was dissolved in THF (1 mL), and the resulting solution was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore filter before injection of $20 \mu\text{L}$ of filtered solution.

^1H NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform was used as solvent, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS).

The thermal properties of the polymers were characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). DSC measurements were carried out under nitrogen on a Perkin-Elmer Instrument DSC 6000 Thermal Analyzer. Samples were submitted to a first heating scan from 20°C to 110°C ($10^\circ\text{C min}^{-1}$) followed by a cooling ramp to -65°C (5°C min^{-1}) followed by an isotherm at -65°C (10 min) and a second heating ramp to 180°C (5°C min^{-1}). Melting temperature (T_m) and melting enthalpy (ΔH_m) were measured on the first heating ramp. Crystallization temperature (T_c) was measured on the cooling ramp. Melting temperature (T_{m2}), melting enthalpy (ΔH_{m2}) and glass transition temperature (T_g) were measured on the second heating ramp. TGA thermograms were obtained under normal atmosphere on a Perkin-Elmer Instrument TGA 6 at a scanning rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ from 30 to 400°C .

Synthesis of triiodobenzoyl chloride (TIBC)

2,3,5-Triiodobenzoyl chloride (TIBC) was obtained by reaction of 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) with thionyl chloride. In

a typical experiment, TIBA (5 g, 10 mmol) was dissolved in thionyl chloride (50 mL) and the solution was heated to reflux under stirring for 16 hours. Excess thionyl chloride was distilled off under reduced pressure. Brown solid was obtained and purified by crystallization from hot tetrachloromethane. The resulting white solid needles were filtered and dried under vacuum. TIBC (60% yield) was characterized by NMR and FT-IR analyses (ESI Fig. S1 and S2†). FT-IR: acyl chloride band at 1759 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm) = 7.9 and 8.3 (s, 2H).

Synthesis of poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB)

In a typical experiment (Table 1, sample PCL-TIB₈), PCL (17.5 mmol of CL unit, 2 g) was dissolved in anhydrous THF (300 mL) in a four-necked reactor equipped with a mechanical stirrer and kept at -40°C under argon atmosphere. A solution of LDA (0.25 eq./CL unit, 2.2 mL) was injected with a syringe through a septum and the mixture was kept at -50°C under stirring for 30 min. After this activation step, TIBC (0.25 eq./CL unit, 2.3 g) was added, the mixture was kept under stirring and maintained at -40°C . After 30 min, the reaction was stopped by addition of a saturated solution of NH_4Cl (100 mL) and pH was adjusted to 7 with 1 M HCl. The polymer was extracted with dichloromethane (3×150 mL). The combined organic phases were washed three times with distilled water (3×150 mL), dried on anhydrous MgSO_4 and filtered. After partial solvent evaporation under reduced pressure, the polymer was recovered by precipitation in cold methanol and dried overnight under vacuum. The polymer was obtained with an average yield of 85% and 8% substitution with respect to CL units (ESI Fig. S3†).

^1H NMR: (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm) = 8.3 and 7.6 (2H, CH), 4.0 (2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.3 (2H, C(O)CH_2), 1.6 (4H, $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 1.4 (2H, $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$).

Tensile tests

Sample plates were prepared by dissolution of the polymer blends in dichloromethane followed by solvent evaporation under atmospheric pressure and in dark. Mechanical properties of the polymers were determined by performing tensile mechanical tests on dogbone-style tensile specimens ($\approx 15 \times 2 \times 0.5 \text{ mm}^3$, section = $1 \times 10^{-6} \text{ m}^2$, ESI Fig. S6†) at 37°C with GABO Eplexor® 1500 N testing machine equipped with a 25 N cell force at a crosshead speed rate of 5 mm min^{-1} . Each sample was analyzed in triplicate and Young's modulus (E , MPa), and yield strain (Y , %) were expressed as the mean value of the three measurements. E was calculated using the initial linear portion of the stress/strain curves.

Polymer blends preparation

Two types of polymer blends were prepared and used to yield sample films with 0.5 mm thickness. Films were prepared by solvent evaporation method in acetone and used for X-ray imaging tests. First series of blends consisted of PCL-TIB and pristine PCL and were prepared for *in vitro* evaluation of PCL-TIB/PCL blends radio-opacity with respect to aluminum wedge reference. Weight ratios of PCL-TIB and PCL were

Table 1 Conditions for the synthesis of poly(ϵ -caprolactone-co- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB) from commercial PCL ($M_n = 32\,000\text{ g mol}^{-1}$; $D = 1.8$)

Sample	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	LDA eq.	CTIB eq.	SD (%)	M_n (g mol^{-1})	D	Distribution
PCL-TIB _{3,5}	-50	0.5	0.25	3.5	24 000	1.7	Monomodal
PCL-TIB ₈	-40	0.25	0.25	8	19 000	2.6	Monomodal
PCL-TIB ₁₂	-30	0.25	0.25	12	17 000	3.8	Weak shoulder
PCL-TIB ₂₄	-30	0.5	0.5	24	9500	4.5	Bimodal

adjusted to yield polymer blends containing 0, 5, 10, 15, and 25 wt% of iodine, which corresponds to PCL-TIB weight ratios in blends of 0 wt%, 2.5 wt% PCL-TIB₈, 50 wt% PCL-TIB₈, 55 wt% PCL-TIB₁₂ and 95 wt% PCL-TIB₁₂, respectively.

Second series of blends was prepared from PCL-TIB and PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ (central block PEG = $20\,000\text{ g mol}^{-1}$; side blocks PLA₅₀ = $175\,000\text{ g mol}^{-1}$) to evaluate *ex vivo* the potential of PCL-TIB as macromolecular radio-opacifier at various weight ratios. PLA₅₀-PEG-PLA₅₀ with a high molecular weight ($370\,000\text{ g mol}^{-1}$) was chosen as a non-X-rays visible resorbable thermoplastic model because it previously demonstrated interest as drug releasing coatings, drug releasing microparticles or as biomaterial to generate scaffolds for skin tissue engineering.⁴⁷⁻⁴⁹ Ratios of PCL-TIB and PLA₅₀-PEG-PLA₅₀ were adjusted to yield polymer blends containing 0, 1, 2.5, 5, 10 and 20 wt% of iodine, which corresponds to PCL-TIB weight ratios in blends of 0 wt% PCL-TIB, 10 wt% PCL-TIB_{3,5}, 25 wt% PCL-TIB_{3,5}, 50 wt% PCL-TIB_{3,5}, 50 wt% PCL-TIB₈ and 100 wt% PCL-TIB₈, respectively.

In vitro X-ray imaging

X-radiographs were obtained using a standard Elitys X-ray machine (Trophy radiology) kindly made available by M. Guilhem Romieu dentist in Prades-Le-Lez, France. Imaging parameters were as follow: sample-amplifier distance 5 cm, angle 90° , 70 kV, 4 mA, 0.1 s. Relative radio-opacity of samples was calculated by image analyses with respect to aluminum wedge of the same thickness. For this purpose, an aluminum scale with thicknesses ranging from 0.5 to 5.5 mm was used. Each image was analyzed using ImageJ software to determine the sample grey index (GI). For each sample, GI was measured in various locations (between 6 to 10) and was then expressed as mean value \pm standard deviation. GI scored on a 255-unit scale with white = 255 and black = 0. The X-ray absorbance ranged from 0% (no X-ray absorption) to 100% (full absorption) and was determined using eqn (1).

$$A(\%) = 100 \times \left(1 - \left(\frac{\text{GI}_s - \text{GI}_A}{255} \right) \right) \quad (1)$$

with A being the percentage of absorbance, GI_s the grey index of sample and GI_A the grey index of aluminum wedge.

Ex vivo X-ray imaging

X-radiographs were obtained using a standard clinical Trixell X-ray machine (Moirans, France) with Surgvisiotractor interface. Imaging parameters were as follow: sample-amplifier

distance 50 cm, angle 90° , 40 kV, 30 mA s^{-1} , 1 s. Chicken breast muscle (4 cm thickness) was chosen as an anatomic *ex vivo* model. This model was transected longitudinally in the middle and samples were placed in cutting area at a depth of ca. 2 cm from the muscle surface. To evaluate the influence of degradation time on X-ray visibility, control plate at 0 wt% iodine and sample plates at 10 and 20 wt% iodine were placed in 8 mL of PBS (pH 7.4) at constant temperature (37°C) under stirring for 6 weeks (stirring speed of 100 rpm). Degraded samples were then analyzed as described above. A 2 mm thick aluminum wedge placed next to the anatomic model was imaged with the samples and used as positive control.

Cytocompatibility

Mouse L929 fibroblasts (L929) were cultured in modified Eagle's medium (MEM) containing 10% horse serum, penicillin ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), streptomycin ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), and glutamax (1%). For each sample, three plates were punched out from the same PCL-TIB sample. Plates were disinfected in ethanol for 30 minutes before being immersed in a solution of sterile PBS containing penicillin and streptomycin (1 mg mL^{-1}) and incubated for 48 h at 37°C . The plates were then rinsed 3 times with sterile PBS before being soaked for 12 hours in sterile PBS. These sterile PCL-TIB plates were stamped to fit the wells of 24-well cell culture plates. *In vitro* cytocompatibility was assessed by monitoring the proliferation of L929 fibroblasts on the surface of the plates. To do this, the plates were placed in polystyrene 24-well tissue culture plates (TCPS) and seeded with 1×10^4 L929 cells. Cell viability after 1, 2 and 3 days was evaluated using the PrestoBlue™ assay that reflects the number of living cells present on a surface at a given time point. Culture medium was removed at scheduled time points and replaced by 1 mL of fresh medium containing 10% PrestoBlue™. Fluorescence at $\lambda = 530\text{ nm}(\lambda_{ex})$ and $\lambda = 615\text{ nm}(\lambda_{em})$ was measured on a Victor X3 photometer (Perkin-Elmer). All data points and standard deviations correspond to measurements in triplicate.

Results and discussion

Synthesis of radiopaque PCL

One reported way for preparing X-ray radiopaque PCL is the ring opening copolymerization of ϵ -CL with functional ϵ -CL bearing heavy atoms like iodine. This strategy was followed by our group in the recent past to yield poly(α -iodo- ϵ -caprolactone-co- ϵ -caprolactone).^{41,42} Speaking of materials however, the synthesis of functional lactones does not appear as a convenient strategy as

large amounts of products can barely be obtained. To overcome this limitation our group developed few years ago an anionic post-modification reaction that provided various functional PCLs with 5 to 15% of functional groups including poly(α -iodo- ϵ -caprolactone-*co*- ϵ -caprolactone) (PCL-I).⁴⁰ In the case of PCL-I, low stability of the aliphatic carbon–iodine bond was encountered, which led to a rapid loss of X-ray visibility. With the aim to prepare a more stable radiopaque PCL suitable for implantation, the anionic post-polymerization modification strategy has been applied to yield PCL bearing triiodobenzoyl groups (PCL-TIB). Another expected advantage of TIB substitution compared to direct iodine substitution is the higher iodine content that is reachable for the same degree of substitution of the PCL backbone. PCL-TIB being designed a radio-opacifier additive, this increase is of benefit as less PCL-TIB should be required to induce X-ray visibility, which should guaranty minimal impact on the polymer matrix properties.

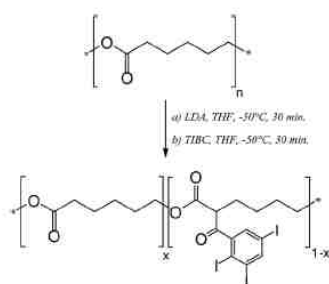
Scheme 1 summarizes the synthesis of PCL-TIB. Triiodobenzoyl chloride (TIBC) was first prepared as an activated intermediate in a 60% yield (ESI Fig. S1 and S2†). TIBC was then reacted with PCL under anionic chemical modification conditions. The parameters of the PCL activation step with LDA and of the subsequent substitution with TIBC have been chosen in order to guaranty visibility while minimizing side reactions including backbone hydrolysis. Each step was run for 30 minutes, while the number of reactant equivalents and the temperature were varied (Table 1). The polymer chemical structure was characterized by ¹H-NMR (ESI Fig. S3†). Substitution degree (SD) was calculated using eqn (2) by comparison of the integrations of the well-defined resonance peaks at 8.3 ppm and 7.6 ppm, corresponding to the aromatic protons of TIB group, with the integration of the resonance peak at 4.0 ppm, corresponding to a methylene of PCL.

$$\text{SD (\%)} = I_{8.3-7.6\text{ppm}}/I_{4\text{ppm}}/2 \times 100 \quad (2)$$

Depending on the reaction conditions a substitution degree ranging from 3.5% to 24% was obtained. As classically observed for this type of reaction, a strong impact on the molecular weight and dispersity was also observed. In more details, whereas the lowest SD of 3.5% could be obtained with

a minimal impact on the molecular weight and dispersity ($M_n \approx 24\,000 \text{ g mol}^{-1}$ and $D = 1.7$) compared to pristine PCL ($M_n \approx 32\,000 \text{ g mol}^{-1}$ and $D = 1.8$) (Fig. 1), a further increase of SD clearly had a strong impact on these macromolecular parameters (Table 1). In particular, for the highest SDs, a shoulder (PCL-TIB₁₂) or even bimodality (PCL-TIB₂₄) were observed on the chromatograms (not shown). For that reason, PCL-TIB₂₄ was not further considered in this work and PCL-TIB₁₂ was only used in the preliminary *in vitro* visibility assessments. It is to note that molecular weight decrease is classically observed with the anionic activation of polyester, as a consequence of hydrolysis and backbiting side reactions. However, although remarkable in terms of influence on the final molecular weight, the observed decrease only corresponds to a very low extent of side reactions. It represents less than 0.2% hydrolysis of the ester groups initially present in the polymer chain in the case of the lower SD, *i.e.* PCL-TIB_{3.5}, and *ca.* 0.7% hydrolysis for PCL-TIB₁₂. In addition, this drawback should be put in perspective with a major advantage of the approach, that is, starting from commercially available PCL this one pot and time saving reaction allows the preparation of *ca.* 2 g batches of PCL-TIB in a single day, including reaction and purification.

Thermal properties of monomodal PCL-TIB were studied by DSC and TGA and results are reported in Table 2. Melting temperatures of PCL-TIB_{3.5} were *ca.* 10 °C lower than the ones of pristine PCL with $T_{m1} = 52 \text{ °C}$ and $T_{m2} = 49 \text{ °C}$ for PCL-TIB_{3.5} against $T_{m1} = 62 \text{ °C}$ and $T_{m2} = 57 \text{ °C}$ for PCL. The same observation was done on crystallization temperature, which is 17 °C for PCL-TIB_{3.5} against 23 °C for PCL. Similar results were obtained with PCL-TIB₈ with as expected lower crystallinity and lower crystallization temperature compared to PCL-TIB_{3.5}. These differences can be ascribed to the lower molecular weight of PCL-TIB compared to pristine PCL, as well as a lower crystallinity due to chains packing disturbance resulting from the TIB side group. This lower crystallinity is confirmed by the melting enthalpy values measured that are *ca.* twice lower for PCL-TIB compared to PCL. With aim to compare stability of PCL-I and PCL-TIB, thermogravimetric analyses were conducted on radiopaque PCLs with a similar iodine molar content of 10%, PCL-TIB_{3.5} and PCL-I₁₀ (SD = 10%), that was synthesized according to the procedure previously reported.⁴⁰ Thermograms (ESI Fig. S4†) showed that PCL-TIB_{3.5} thermal degradation



Scheme 1 Synthetic scheme for the preparation of poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triiodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB).

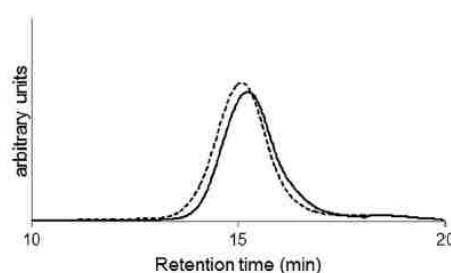


Fig. 1 SEC chromatograms of PCL (dashed line) and PCL-TIB_{3.5} (plain line).

Table 2 PCL-TIB thermal properties

Sample	T_g (°C)	$T_m/\Delta H_m$ (°C; J g ⁻¹)	$T_m/\Delta H_m$ (°C; J g ⁻¹)	T_c (°C)
PCL	<-60 °C	62/113	57/78	23
PCL-TIB _{3.5}	<-60 °C	52/60	49/44	17
PCL-TIB ₈	<-60 °C	52/44	48/41	12

occurred in the same range of temperature than for PCL with an onset temperature around 270 °C against 260 °C. Under the same conditions PCL-I degraded much earlier than PCL-TIB with an onset temperature found at *ca.* 205 °C and degradation temperatures $T_{d5\%}$ found at 269 °C for PCL-I against 296 °C for PCL-TIB. This result confirms the higher thermal stability of PCL-TIB vs. PCL-I.

In vitro X-ray imaging of PCL-TIB/PCL blends

As a first evaluation of PCL-TIB as radio-opacifier for X-ray imaging, blends of PCL and PCL-TIB were prepared. Defined quantities of PCL-TIB substituted at 8% and 12% were used to yield final iodine weight contents ranging from 0 to 25 wt%. Films with a thickness of 0.5 mm were imaged using Elitys (Trophy radiology) equipment (ESI Fig. S5†) and compared with an aluminum wedge of the same thickness. Grey index (scored on a 255-unit scale with white = 255 and black = 0), relative absorption and attenuation per μm were calculated based on the X-ray images analyses and are listed in Table 3. Note that images were measured simultaneously, that is, grey values can be compared. A quasi-linear evolution of GI with respect to iodine weight percentage was obtained. Similar GI, and therefore attenuation per μm thickness, was obtained for the aluminum wedge and the PCL/PCL-TIB blend with as low as 15 wt% iodine. This result demonstrates the ability of PCL-TIB to induce X-ray absorption when used in polymer blends.

Visual and mechanical evaluations of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends

To further evaluate the potential of PCL-TIB as radio-opacifier for X-ray imaging, blends of PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ and

Table 3 Comparison of *in vitro* X-ray absorptions of PCL-TIB/PCL blends (0.5 mm thickness) and of aluminum wedge (0.5 mm thickness)

Iodine content (wt%)	Grey index	Relative absorption ^a (%)	Attenuation ^b (%) per μm thickness
0	15 ± 3	25	0.011
5	26 ± 7	43	0.020
10	33 ± 8	55	0.025
15	64 ± 9	107	0.050
25	82 ± 7	136	0.065
Aluminum wedge	60 ± 8	100	0.047

^a Calculated with respect to grey index of the aluminum wedge.

^b Calculated based on the grey index scale with white = 255 and black = 0.

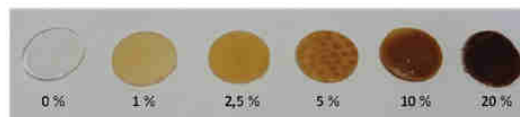


Fig. 2 Pictures of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends with increasing contents of PCL-TIB. Percentages correspond to iodine weight ratios.

PCL-TIB were prepared. Custom made PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ copolymer was chosen as it was successfully used by our group to formulate drug releasing coatings and drug releasing microparticles, or to generate scaffolds for skin tissue engineering.^{47–49} Considering the variety of applications for this family of copolymers, it appears therefore as a good candidate for blending and radio-opacifying with PCL-TIB. Again, defined quantities of PCL-TIB substituted at 3.5% or 8% were used to yield final iodine weight contents ranging from 0 to 20 wt%. The films obtained are shown in Fig. 2. Homogeneous films were obtained for low and high PCL-TIB contents (1, 2.5 and 20 wt% iodine). In opposition, macroscopic phase separation was observed for PCL-TIB contents corresponding to 5 wt% iodine (50 wt% PCL-TIB_{3.5}) and 10 wt% iodine (50 wt% PCL-TIB₈). Although PCL-TIB was present in the all sample, as demonstrated by the clear yellow color of the film, areas of higher PCL-TIB concentrations were observed under the form of brown spots. This result highlights a lower compatibility of the triblock copolymer and PCL-TIB when a 1 : 1 mass ratio is used. It is to note that phase separation was not observed in PCL blends, whatever the PCL-TIB concentration, which underlines the importance of the nature of polymers to be used in the blend, as well as the PCL-TIB/polymer ratio.

The impact of PCL-TIB_{3.5} on the mechanical properties of the blends was then assessed. The tensile tests were performed on dogbone-style tensile specimens (ESI Fig. S6†). Blends with the

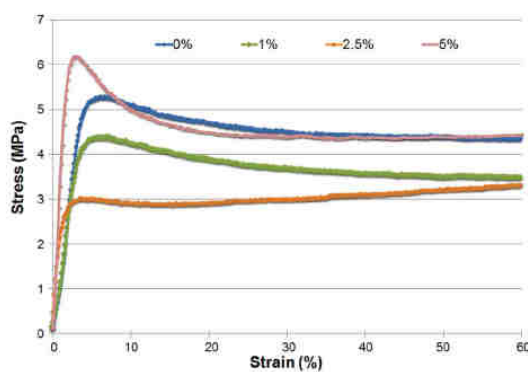


Fig. 3 Typical stress-strain tensile curves of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends (GABO Eplexor® 1500 N testing machine, 25 N cell force, 5 mm min⁻¹ crosshead speed rate, 37 °C). Percentages correspond to iodine weight ratios; samples were not loaded to failure.

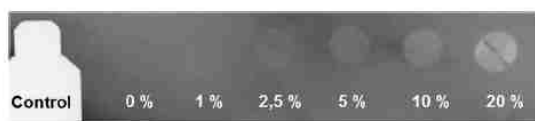


Fig. 4 *Ex vivo* X-ray images of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends implanted in a 4 cm thick anatomical model. Control corresponds to 2 mm thick aluminum wedge. Percentages correspond to iodine weight ratios (20 wt% sample film shown is broken in two pieces; dark line in the middle of the sample corresponds to this fracture).

highest PCL-TIB content were too fragile and were therefore not tested. The other samples (1 to 5 wt% iodine) were all prepared with the same PCL-TIB_{3,5} and were not loaded to failure as they present a rupture strain greater than the possibility of the testing machine. Typical tensile curves are shown in Fig. 3. The results present the nominal stress (force divided by the initial section) in function of strain (displacement divided by the initial length). The curves present an initial linear curve that can be assimilated to the elasticity of the material. The Young modulus is evaluated by fitting this part of the curve. The yield strain is defined as the end of this linear part. The values of the Young modulus and the yield strain are listed in Table 4. The increasing content of PCL-TIB seems to increase the stiffness of the material by increasing the Young modulus and reducing the yield strain. After the elastic part, the curves are very flat seeming to a creep test with an increasing deformation with a constant stress. It is to note that increasing contents of PCL-TIB_{3,5} (if iodine content is no greater than 5 wt%) do not change significantly the mechanical behavior of the PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ with similar strain-stress curves profiles and characteristic values in a same range.

Ex vivo X-ray imaging of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends

The radio-opacifying effect of PCL-TIB in the PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends was evaluated under conditions mimicking implantation. Radiopaque sample films with 0.5 mm thickness were inserted in chicken breast muscle that was chosen as anatomical *ex vivo* model. All samples were then imaged the same day under the same conditions (see experimental parts for details). It is first important to note that PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ sample without PCL-TIB did not demonstrate any additional X-ray absorption compared to the surrounding tissue (Fig. 4). It is to note that X-ray absorption of anatomical model was not nil as shown by the greyish color of tissues and the calculated absorption of 50% (Table 4).

In opposition, all samples containing PCL-TIB exhibited a clear contrast and were visible in the anatomical model. Remarkably, even iodine content in the blend as low as 1 wt% made the sample visible. This visibility was however considered too weak by surgeons for practical use. An iodine content of 2.5 wt% is therefore the lowest one with respect to practical clinical imaging. Little difference between blends containing 2.5 and 5 wt% iodine was observed in this X-ray imaging experiment. This was due to the inhomogeneity of muscle and

Table 4 Mechanical properties and percentage of X-ray absorption of polymer blends samples (600 μm thickness) *ex vivo* before and after degradation

Iodine content (wt%)	<i>E</i> (MPa)	<i>Y</i> (%)	Absorption at $t_0^{a,b}$ (%)	Delta absorption at 6 weeks ^{a,c} (%)
Muscle	—	—	47	0
0	0.8	5.2	50	0
1	0.9	4.2	52	nd
2.5	2.4	2.3	55	nd
5	2.9	3.3	55	nd
10	nd	nd	58	-0.4
20	nd	nd	73	-0.4
Aluminum wedge	—	—	96	—

^a Calculated based on the grey index scale with white = 255 (100% absorption) and black = 0 (0% absorption). ^b Image used for the analyses is shown in Fig. 4 ^c Image used for the analyses is shown in Fig. 5

of the above mentioned inhomogeneity of the 5 wt% blend that is visible in Fig. 4 and emphasized in Fig. S7 (ESI Fig. S7†) with clear isolated spots exhibiting higher contrast compared to the rest of the sample. Samples with 10 and 20 wt% iodine were obviously the most visible and exhibited X-ray absorption of 60% and 76%, respectively, compared to the 2 mm thick aluminum wedge. This result confirms that image contrast is proportional to the amount of iodine.

Stability of X-ray visibility over time was assessed using aged sample plates containing 0, 10 or 20 wt% iodine. Samples were placed for 6 weeks in PBS at 37 °C under stirring to mimic physiological conditions prior to implantation in an anatomical model for X-ray imaging. The non-degraded samples were implanted in the same anatomical model for comparison (Fig. 5). Degraded samples remained highly visible after 6 weeks. In addition, no difference of contrast was found between the degraded and non-degraded samples. A negligible variation of X-ray absorption (0.4%) was calculated from the GI values. These results confirm the high stability of the carbon-iodine bond in PCL-TIB and the potential of this copolymer to



Fig. 5 *Ex vivo* X-ray images of non-degraded (left-hand side) and degraded (right-hand side) PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends sample plates implanted in a 4 cm thick anatomical model. Control corresponds to 2 mm thick aluminum wedge. Percentages correspond to iodine weight ratios.

be used as macromolecular radio-opacifier for implantable medical devices.

Cytocompatibility of radiopaque PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends

X-ray absorption capability is the main parameter to consider PCL-TIB as a potential macromolecular radio-opacifying agent. However, in the frame of medical applications and implantable medical devices, another critical parameter is the biocompatibility of the biomaterial towards tissues and cells. For that reason, and as a first approach, an evaluation of cells proliferation was performed on films to assess the cytocompatibility of PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends and to determine whether they are suitable for cell culture and cell-contacting biomedical applications. Tests were conducted on the L929 fibroblast cell line, as recommended by International and European standards (ISO 10993-5:2009). Films with iodine contents in the range 1–5 wt% were tested. Fig. 6 shows the proliferation at 1, 3 and 7 days of L929 murine fibroblasts on the radiopaque blends compared to pure PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ (0 wt% iodine) and TCPS positive control. L929 fibroblasts adhered and proliferated on the samples. In more details, following an initial period up to 3 days with limited proliferation for all samples and controls, fast proliferation was then observed. As expected, proliferations on blends were slower than on TCPS positive control, but were significant with relative proliferations in the range 70–84% for blends containing 2.5 wt% and 5 wt%, respectively. It is of importance to note that cells proliferation was better on PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends compared to PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ and was improved with increasing PCL-TIB contents. This is remarkable considering that block copolymers of PLA and PEG are widely recognize as cytocompatible materials and have a long track record as biomaterials. This result confirms that PCL-TIB appears to be suitable for the growth of fibroblasts and cell-contacting applications and may be of interest for the design of X-ray visible medical devices.

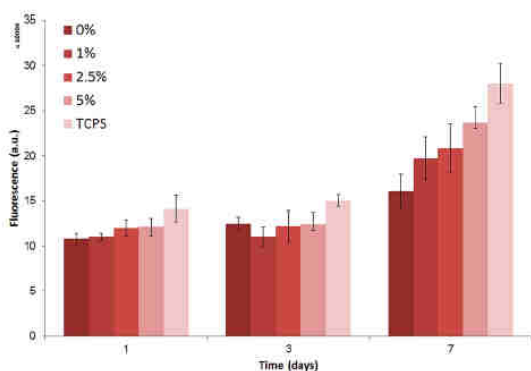


Fig. 6 L929 fibroblasts proliferation on PCL-TIB/PLA₅₀-*b*-PEG-*b*-PLA₅₀ blends (1 to 5 wt% iodine) compared to pristine PCL films (0 wt% iodine) and TCPS control at 1, 3, and 7 days (data are expressed as means \pm SD and correspond to measurements in triplicate).

Conclusions

Poly(ϵ -caprolactone-*co*- α -triodobenzoate- ϵ -caprolactone) (PCL-TIB) was synthesized with substitution ratios ranging from 3.5 to 24%. This family of macromolecular X-ray contrast agents could be blended in (co)polyester matrices to induce X-ray opacity. Mechanical properties of the blends with up to 5 wt% iodine were not significantly impacted by PCL-TIB_{3.5} compared to the raw polymer matrices. Radio-opacity was observed in *ex vivo* model with 1 wt% iodine although for practical use a 2.5 wt% should be preferred. In addition, PCL-TIB was shown to be stable enough to make blends radiopaque, even after 6 weeks degradation, and compatible with L929 fibroblasts proliferation. In conclusion, PCL-TIB copolymers appear to be promising candidates as additive for implantable medical devices requiring X-ray imaging abilities.

Acknowledgements

The authors thank the University of Montpellier for the participation to Mr Rémi Samuel funding (University Montpellier 1; Trainee Program 2013-2014), Ms Majda Akraich and Ms Mélanie Bayarri for their help on *in vitro* X-ray experiments, Mr Guilhem Romieu for access to his X-ray Elitys equipment. Authors also thank Mr Quentin Breche for his help on the GABO Eplexor® 1500 N testing machine and Mr Benjamin Spencer from GMCAO for his help on *ex vivo* imaging.

References

- 1 S. M. Janib, A. S. Moses and J. A. MacKay, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, 62, 1052–1063.
- 2 B. Nottelet, V. Darcos and J. Coudane, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.06.023.
- 3 Z. Y. Wang, T. Chang, L. Hunter, A. M. Gregory, M. Tanudji, S. Jones and M. H. Stenzel, *Aust. J. Chem.*, 2014, 67, 78–84.
- 4 N. Anton and T. F. Vandamme, *Pharm. Res.*, 2014, 31, 20–34.
- 5 S. Dawlee, A. Jayakrishnan and M. Jayabalan, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2009, 20, 243–250.
- 6 S. Kiran, N. R. James, R. Joseph and A. Jayakrishnan, *Biomaterials*, 2009, 30, 5552–5559.
- 7 M. Marcos, P. Cano, P. Fantazzini, C. Garavaglia, S. Gomez and L. Garrido, *Magn. Reson. Imaging*, 2006, 24, 89–95.
- 8 F. Hallouard, S. Briancon, N. Anton, X. Li, T. Vandamme and H. Fessi, *J. Pharm. Sci.*, 2013, 102, 4150–4158.
- 9 F. Hallouard, S. Briancon, N. Anton, X. Li, T. Vandamme and H. Fessi, *Pharm. Res.*, 2013, 30, 2023–2035.
- 10 V. P. Torchilin, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 235–252.
- 11 A. J. L. Villaraza, A. Bumb and M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 2921–2959.
- 12 M. Vert, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, 32, 755–761.
- 13 M. Vert, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2009, 20, 437–446.
- 14 B. Nottelet, C. Di Tommaso, K. Mondon, R. Gurny and M. Moller, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2010, 48, 3244–3254.
- 15 M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, 35, 1217–1256.

- 16 B. C. Thanoo, M. C. Sunny and A. Jayakrishnan, *Biomaterials*, 1991, 12, 525–528.
- 17 B. C. Thanoo and A. Jayakrishnan, *Biomaterials*, 1990, 11, 477–481.
- 18 F. Luderer, I. Begerow, W. Schmidt, H. Martin, N. Grabow, C. M. Buenger, W. Schareck, K.-P. Schmitz and K. Sternberg, *J. Biomater. Appl.*, 2013, 28, 219–231.
- 19 C. Shasteen, S. M. Kwon, K. Y. Park, S. Y. Jung, S. H. Lee, C. G. Park, M. H. Kim, S. Kim, W.-C. Son, T. H. Choi and Y. B. Choy, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2013, 101, 320–329.
- 20 T. Lamsa, H. Jin, J. Mikkonen, J. Laukkanen, J. Sand and I. Nordback, *Pancreatology*, 2006, 6, 301–305.
- 21 I. Nordback, S. Raty, J. Laukkanen, S. Jarvinen, A. Piironen, J. Leppiniemi, M. Kellomaki and J. Sand, *Pancreatology*, 2012, 12, 264–271.
- 22 L. Mazzocchetti, M. Scandola and A. Pollicino, *Polymer*, 2008, 49, 5215–5224.
- 23 L. Mazzocchetti, E. Cortecchia and M. Scandola, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, 1, 726–734.
- 24 J. L. Pariente, L. Bordenave, R. Bareille, C. Ohayon-Courtes, C. Baquey and M. Le Guillou, *Biomaterials*, 1999, 20, 523–527.
- 25 W. Wang, J. Liu, C. Li, J. Zhang, J. Liu, A. Dong and D. Kong, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 4185–4192.
- 26 D. Mawad, H. Mouaziz, A. Penciu, H. Mehier, B. Fenet, H. Fessi and Y. Chevalier, *Biomaterials*, 2009, 30, 5667–5674.
- 27 F. Mottu, D. A. Rufenacht, A. Laurent and E. Doelker, *Biomaterials*, 2002, 23, 121–131.
- 28 A. Galperin and S. Margel, *Biomacromolecules*, 2006, 7, 2650–2660.
- 29 D. Horak, M. Metalova and F. Rypacek, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, 34, 183–188.
- 30 M. A. B. Krufft, A. Benzina, F. Bar, F. H. Vanderveen, C. W. M. Bastiaansen, R. Blezer, T. Lindhout and L. H. Koole, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994, 28, 1259–1266.
- 31 M. A. B. Krufft, A. Benzina, R. Blezer and L. H. Koole, *Biomaterials*, 1996, 17, 1803–1812.
- 32 N. Moszner, U. Salz, A. M. Klester and V. Rheinberger, *Angew. Makromol. Chem.*, 1995, 224, 115–123.
- 33 K. Saralidze, Y. B. J. Aldenhoff, M. L. W. Knetsch and L. H. Koole, *Biomacromolecules*, 2003, 4, 793–798.
- 34 B. Vazquez, M. P. Ginebra, F. J. Gil, J. A. Planell, A. L. Bravo and J. San Roman, *Biomaterials*, 1999, 20, 2047–2053.
- 35 C. Zaharia, T. Zecheru, M. F. Moreau, F. Pascaretti-Grizon, G. Mabileau, B. Marculescu, R. Filmon, C. Cincu, G. Staikos and D. Chappard, *Acta Biomater.*, 2008, 4, 1762–1769.
- 36 N. R. James, J. Philip and A. Jayakrishnan, *Biomaterials*, 2006, 27, 160–166.
- 37 S. Kiran, N. R. James, A. Jayakrishnan and R. Joseph, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2012, 100, 3472–3479.
- 38 M. D. Hindenlang, A. A. Soudakov, G. H. Imler, C. T. Laurencin, L. S. Nair and H. R. Allcock, *Polym. Chem.*, 2010, 1, 1467–1474.
- 39 K. A. Aamer, K. L. Genson, J. Kohn and M. L. Becker, *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2418–2426.
- 40 B. Nottelet, J. Coudane and M. Vert, *Biomaterials*, 2006, 27, 4948–4954.
- 41 S. El Habnoui, S. Blanquer, V. Darcos and J. Coudane, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2009, 47, 6104–6115.
- 42 S. El Habnoui, V. Darcos and J. Coudane, *Macromol. Rapid Commun.*, 2009, 30, 165–169.
- 43 T. R. Olsen, L. L. Davis, S. E. Nicolau, C. C. Duncan, D. C. Whitehead, B. A. Horn and F. Alexis, *Acta Biomater.*, 2015, 20, 94–103.
- 44 C. Rode, A. Schmidt, R. Wyrwa, J. Weisser, K. Schmidt, N. Moszner, R. P. Gottlober, K. Heinemann and M. Schnabelrauch, *Polym. Int.*, 2014, 63, 1732–1740.
- 45 L. Sang, Z. Y. Wei, K. L. Liu, X. H. Wang, K. D. Song, H. Wang and M. Qi, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2014, 102, 1121–1130.
- 46 A. L. Carbone, M. Song and K. E. Uhrich, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 1604–1612.
- 47 X. Garric, O. Guillaume, H. Dabboue, M. Vert and J. P. Moles, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2012, 23, 1687–1700.
- 48 A. K. Jain, A. K. Goyal, N. Mishra, B. Vaidya, S. Mangal and S. P. Vyas, *Int. J. Pharm.*, 2010, 387, 253–262.
- 49 M. Morille, V. T. Tran, X. Garric, J. Cayon, J. Coudane, D. Noel, M. C. Venier-Julienne and C. N. Montero-Menei, *J. Controlled Release*, 2013, 170, 99–110.

Annexe V-1 : Analyse fonctionnelle du besoin

1. Définitions

Système : Un système est un ensemble d'éléments formant un tout structuré satisfaisant plusieurs besoins cohérents. Un système est défini par six éléments :

- 3 Externes : objectifs, environnement et évolution ;
- 3 Internes : composants, structures et fonctions.

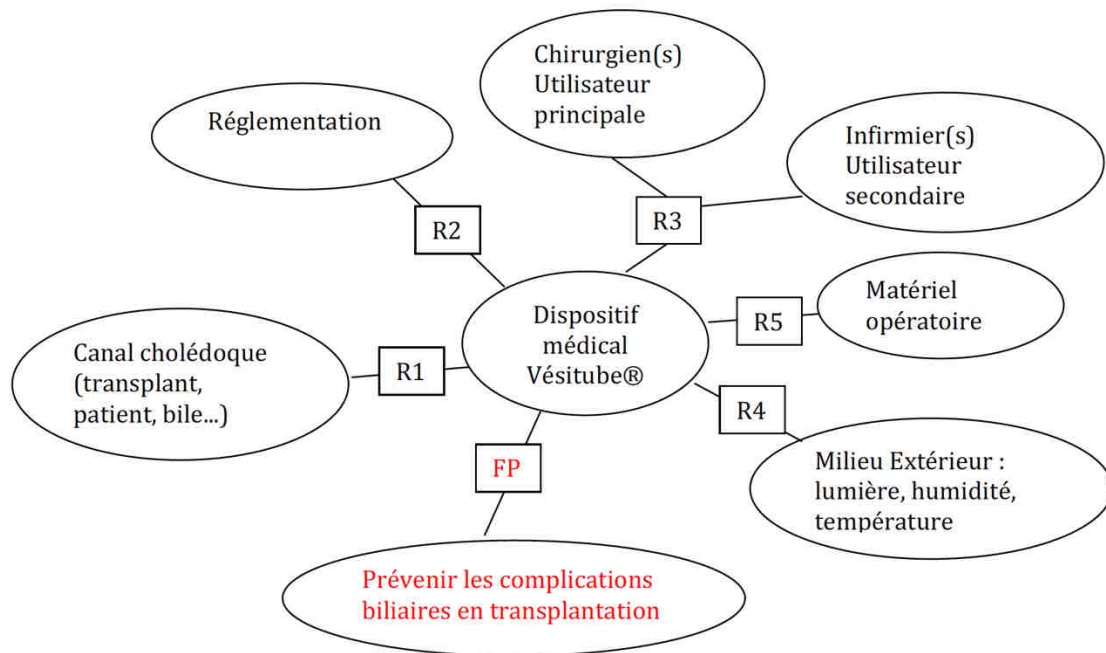
Fonction principale : C'est la fonction qui satisfait le besoin. Elle assure la prestation du service rendu. C'est la raison pour laquelle le produit a été créé.

Fonction contrainte : Une contrainte c'est une limitation à la liberté de choix du concepteur-réalisateur d'un produit. Les fonctions contraintes sont les fonctions qui participent à définir le besoin en recensant les conditions qui doivent être impérativement vérifiées par le produit, mais qui ne sont pas sa raison d'être.

Limite d'acceptation : Niveau de critère d'appréciation au-delà duquel, ou en dessous suivant le cas, le besoin est jugé non satisfait.

2. Expression du besoin

Pour chaque élément de l'environnement il existe une relation avec le produit :



FP : Fonction Principale

R1 : Relation DM-Patient

R2 : Relation DM- réglementation

R3 : Relation DM-Utilisateur

R4 : Relation milieu DM-Milieu extérieur

R5 : Relation DM-Matériel de bloc

Pour chaque relation environnement-DM, on peut définir un ou plusieurs besoins :

<u>Relations :</u>	<u>Besoin :</u>	<u>Expression des besoins :</u>
R1	R1B1	Diminuer le risque de complications et de ré hospitalisation liés à l'anastomose biliaire en TH
	R1B2	Respecter l'intégrité du patient
R2	R2B1	Répondre à toutes les exigences de la réglementation

R3	R3B1	Faciliter l'activité médicale en réduisant le temps de prise en charge par patient
R4	R4B1	Assurer la conservation des caractéristiques physico-chimiques et biologiques du dispositif jusqu'à son utilisation
R5	R5B1	Rester inerte

3. Expression des fonctions permettant de répondre aux besoins

Une ou plusieurs fonctions peuvent répondre à chaque besoin. Ces fonctions peuvent être de plusieurs types : transferts, contraintes, explicites, implicites, extrinsèques, intrinsèques, principales, secondaires. Les fonctions peuvent être une combinaison de plusieurs catégories de fonctions.

<u>Relation :</u>	<u>Besoin :</u>	<u>Fonction :</u>	
R1	B1	R1B1F1	Assurer l'écoulement de la bile dans le temps et dans l'espace
		R1B1F2	Eliminer le produit sans ré-intervention chirurgicale
	B2	R1B2F1	Assurer la sécurité du patient
		R1B2F2	Accorder à la physiologie du patient
R2	B1	R2B1F1	Tracer le produit lors de toutes les étapes du cycle de vie
		R2B1F2	Identifier facilement le produit et sa nature conformément à la réglementation
		R2B1F3	Contenir les explications permettant d'utiliser le produit
R3	R3B1	R3B1F1	Faciliter l'intervention chirurgicale
		R3B1F2	Faciliter la prise en main par le personnel soignant
		R3B1F3	Faciliter le suivi postopératoire
R4	R4B1	R4B1F1	Isoler le produit des éléments chimiques délétères de l'environnement
		R4B1F2	Isoler le produit vis à vis des dégradations physiques jusqu'à l'utilisation
		R4B1F3	Isoler le produit de l'environnement biologique
R5	R5B1	R5B1F1	Supporter de l'air ambiant avant utilisation

4. Expression des sous-fonctions ou Caractéristiques

Les fonctions répondant à un besoin sont ensuite approfondies en sous-fonctions ou caractéristiques.

R1B1F1 : Assurer l'écoulement de la bile dans le temps et dans l'espace	
C1	Isoler le conduit en l'environnement autour du conduit de la bile
C2	Conduire l'écoulement de la bile
C3	Isoler l'anastomose de la bile jusqu'à la cicatrisation de l'anastomose

R1B1F2 : Elimination du produit sans ré-intervention chirurgicale	
C1	Eliminer par les vois naturelles
C2	Eliminer sans obstruer le conduit
C3	Eliminer progressivement

R1B2F1 : Assurer la sécurité du patient	
C1	Eliminer sans résidu toxique
C2	Être inerte vis à vis des tissus

R1B2F2 : Accorder à la physiologie du patient	
C1	Accorder les dimensions du dispositif avec l'anatomie du conduit du patient
C2	Accorder les propriétés physiques du dispositif aux contraintes physiologiques

R2B1F1 : Tracer le produit lors de toutes les étapes du cycle de vie	
C1	Posséder un identifiant unique sur les supports obligatoires
C2	Posséder un numéro de lot
C3	Faciliter le renseignement de la base de données

R2B2F1 : identifier facilement le produit et sa nature conformément à la Règlementation	
C1	Identifier de façon claire le du nom du produit
C2	Identifier marquage CE
C3	Identifier numéro de lot

R2B3F1 : contenir les explications permettant d'utiliser le produit	
C1	Expliquer le fonctionnement normal du DM
C2	Détailler les indications inhérentes à l'utilisation normale
C3	Détailler les contres indications
C4	Présenter le marquage CE
C5	Présenter le numéro de lot

R3B1F1 : Faciliter l'intervention chirurgicale	
C1	Résister aux contraintes de l'acte chirurgical
C2	Préserver les tissus du canal lors de la mise en place

R3B1F2 : Faciliter la prise en main par le personnel soignant	
C1	Indiquer les ouvertures
C2	Ne pas être glissant pour permettre la préhension

R3B1F3 : Contenir les explications permettant d'utiliser le produit	
C1	Contrôler la présence du dispositif et son bon positionnement
C2	Faciliter le renseignement de la traçabilité sur le support adapté

<u>R4B1F1 : Protéger l'intégrité du drain</u>	
C1	Isoler le produit des éléments chimiques délétères de l'environnement
C2	Isoler le produit vis à vis des dégradations physiques jusqu'à l'utilisation

<u>R4B1F2 : Conserver les propriétés intrinsèques du produit</u>	
C1	Isoler le DM de la lumière
C2	Isoler le DM de l'environnement biologique

<u>R5B1F1 : Supporter l'air ambiant avant utilisation</u>	
C1	Conserver les propriétés intrinsèques malgré une exposition à l'humidité
C2	Conserver les propriétés intrinsèques malgré une exposition à la lumière
C3	Conserver les propriétés intrinsèques malgré une exposition à l'air

Annexe V-2 : Textes réglementaires et normes applicables

1. TEXTES RÉGLEMENTAIRES

- **MDR 2017/745** : Règlement Européen des dispositifs médicaux
- **Recommandations MEDDEV**

2. NORMES APPLICABLES

2.1. Système de management de la qualité

NF EN ISO 13485:2004 : Management de la qualité appliqué aux DM

2.2. Gestion des risques

NF EN ISO 14971:2009 : Application de la gestion des risques aux DM

2.3. Aptitude à l'utilisation

NF EN ISO 62 366:2008 : Application de l'ingénierie de l'aptitude à l'utilisation aux DM

2.4. Analyse fonctionnelle

NF X 50-150:1990 : Analyse fonctionnelle et cahier des charges

2.5. Evaluation clinique

EN ISO 14155:2011 : Bonnes pratiques cliniques

MEDDEV 2.7/1 rev.4 : Evaluation clinique : Guide à destination des fabricants et des organismes notifiés

MEDDEV 2.7/3 rev.3 : Investigations cliniques

2.6. Stérilisation

EN 556-1:2001 : Stérilisation des dispositifs médicaux – Exigences relatives aux dispositifs médicaux en vue d’obtenir l’étiquette STERILE – Partie 1 : Exigences relatives aux dispositifs médicaux stérilisés au stade terminal.

EN ISO 11140-1:2009 : Stérilisation des produits de santé – Indicateurs chimiques – Partie 1 : Exigences générales (ISO 11140-1 :2005).

NF EN ISO 11137-1:2015 : Stérilisation des produits de santé - Irradiation - Partie 1 : exigences relatives à la mise au point, à la validation et au contrôle de routine d'un procédé de stérilisation pour les dispositifs médicaux

NF EN ISO 11137-2:2015 : Stérilisation des produits de santé - Irradiation - Partie 2 : établissement de la dose stérilisante

NF EN ISO 14937:2009 : Exigences générales pour la caractérisation d’un agent stérilisant et pour le développement, la validation et la vérification de routine d’un processus de stérilisation pour dispositifs médicaux

NF EN ISO 11737-1 : Méthodes microbiologiques : Détermination d'une population de micro-organismes sur des produits.

NF EN ISO 11737-2 : Méthodes microbiologiques : Tests de stérilité effectués dans la définition, la validation et le maintien d'un procédé de stérilisation

2.7. Biocompatibilité

NF EN ISO 10993-1 : Evaluation et essais

NF EN ISO 10993-2 : Exigences concernant la protection des animaux

NF EN ISO 10993-3 : Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction

NF EN ISO 10993-4 : Choix des essais pour les interactions avec le sang

NF EN ISO 10993-5 : Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*

NF EN ISO 10993-6 : Essais concernant les effets locaux après implantation

NF EN ISO 10993-8 : Sélection et qualification des matériaux de référence utilisés pour les essais biologiques

NF EN ISO 10993-9 : Cadre pour l'identification et la quantification des produits potentiels de dégradation

NF EN ISO 10993-10 : Essais d'irritation et d'hypersensibilité retardée

NF EN ISO 10993-11 : Essais de toxicité systémique

NF EN ISO 10993-12 : Préparation des échantillons et matériaux de référence

NF EN ISO 10993-13 : Identification et quantification de produits de dégradation de polymères

NF EN ISO 10993-16 : Conception des études toxicocinétiques des produits de dégradation et des substances relargables

NF EN ISO 10993-17 : Etablissement des limites admissibles des substances relargables

NF EN ISO 10993-18 : Paramètres et méthodes de caractérisation chimique

NF EN ISO 14971 : Application de la gestion des risques aux dispositifs médicaux

MDR 2017/745 : Règlement européen relatif aux dispositifs médicaux

NF EN ISO 15814:1999 : Implants chirurgicaux - Copolymères et mélanges à base de polylactide - Essais de dégradation *in vitro*

2.8. Conditionnement

NF EN ISO 11607-1:2009 : Emballage des Dispositifs Médicaux stérilisés au stade terminal - exigences relatives aux matériaux, au système de barrière stérile et aux systèmes d'emballage

NF EN ISO 11607-2:2006 : Emballage des Dispositifs Médicaux stérilisés au stade terminal- exigences de validation pour les procédés de formage, scellage et assemblage

EN ISO 15223-1:2016 : Dispositifs médicaux – Symboles à utiliser avec les étiquettes, l'étiquetage et les informations à fournir relatives aux dispositifs médicaux – Partie 1 : Exigences générales

NF EN 1041:2008 : Terminologie, symboles et informations à fournir avec les dispositifs médicaux

2.9. Transport et packaging

ASTM D4169 : Norme de test de performance pour les systèmes d'emballage d'expédition

ASTM D6942 : Méthode d'essai pour la détermination de la résistance à la compression de conteneurs, et de systèmes unitaires d'emballage d'expédition

ASTM D880 : Méthode d'essai pour des tests d'impact sus les systèmes d'emballage d'expédition

ASTM D951 : Méthode d'essai pour la résistance à l'eau de système d'emballage d'expédition par pulvérisation

ASTM D999 : Méthode d'essais de vibration pour les systèmes d'emballage d'expédition

ASTM D5276 : Norme de test de chute par chute libre sur système d'emballage d'expédition

2.10. Général

NF EN ISO 14630 : Implants chirurgicaux non actifs – exigences générales

Annexe V-3 : Récapitulatif des essais pré-cliniques

<u>Test réalisé :</u>	<u>Normes revendiquées :</u>	<u>Exigences de la norme :</u>
Caractérisation physico-chimique		
Extraction exagérée	NF EN ISO 10993-1,17,18 ISO 14971	Détection et quantification des substances extractibles du matériau
FTIR	NF EN ISO 10993-1, 18 ISO 14971	Détection des molécules organiques non volatiles
HPLC-MS	NF EN ISO 10993-1, 18 ISO 14971	Détection et quantification des molécules organiques non volatiles
HPLC-IC	NF EN ISO 10993-1,17,18 ISO 14971	Détection et quantification des ions organiques
ICP-MS	NF EN ISO 10993-1,17,18 ISO 14971	Détection molécules élémentaires (tableau périodique)
GC-MS	NF EN ISO 10993-1,17,18 ISO 14971	Détection et quantification des molécules organiques semi-volatiles
Headspace GS-MS	NF EN ISO 10993-1,17,18 ISO 14971	Détection et quantification de molécules organiques volatiles
Masses molaires		
GPC	NF EN ISO 10993-1, 18 ISO 14971	Détermination de la masse molaire en poids et de la dispersité du matériau
Viscosité	NF EN ISO 10993-1,18 ISO 14971	Détermination de la masse molaire viscosimétrique du matériau
Essais mécaniques		
Essais de traction	NF EN ISO 10993-1,18 ISO 14971	/
Essais de compression	NF EN ISO 10993-1,18 ISO 14971	/
Essais d'étirement	NF EN ISO 10993-1,18 ISO 14971	/
DSC	NF EN ISO 10993-1,18 ISO 14971	Détermination de la pureté du matériau, degré de cristallinité, température de fusion/transition vitreuse
Evaluation biologique : cytotoxicité		
Essai de cytotoxicité <i>in vitro</i> (NCTC 929)	NF EN ISO 10993-1 NF EN ISO 10993-5 NF EN ISO 10993-12	Evaluation qualitative : Obtention de réactivité des cellules d'un grade supérieur à la classe 2 considéré comme cytotoxique ; Evaluation quantitative : Réduction de la viabilité cellulaire de + de 30% considérée cytotoxique
Evaluation biologique : Irritation et hypersensibilité retardée		

Tests Magnusson & Klingman (cobayes)	NF EN ISO 10993-1, 2, 10, 12 OCDE 406	Evaluation qualitative : Absence de réaction de sensibilisation (érythème/rougeurs) Evaluation quantitative : Un grade supérieur à 1 est considéré comme sensibilisant
Tests d'irritation <i>in vivo</i> (lapins)	NF EN ISO 10993-1, 2, 10, 12	Les composés chimiques du dispositif médical ne doivent pas entraîner de réaction d'irritation après la mise en contact du dispositif médical avec la peau, les yeux et les muqueuses
Evaluation biologique : Toxicité systémique		
Tests de toxicité systémique aiguë (souris)	NF EN ISO 10993-1 NF EN ISO 10993-2 NF EN ISO 10993-11 NF EN ISO 10993-12	Les résultats sur 5 animaux démontrent : si 2 animaux ou plus meurent ou si 3 animaux ou plus perdent minimum 10% de leur masse corporelle, le dispositif médical est considéré toxique
Tests de toxicité systémique subaiguë (application intrapéritonéale subaiguë)	NF EN ISO 10993-1 NF EN ISO 10993-2 NF EN ISO 10993-11 NF EN ISO 10993-12 OCDE 409	Les composés chimiques du dispositif médical ne doivent entraîner aucune réaction de toxicité : Aucune modification physique, comportementale ou la mort des animaux ne doit être constaté
Tests de toxicité systémique sub-chronique (rongeur)	NF EN ISO 10993-1 NF EN ISO 10993-2 NF EN ISO 10993-11 NF EN ISO 10993-12	Les composés chimiques du dispositif médical ne doivent entraîner aucune réaction de toxicité : Aucune modification physique, comportementale ou la mort des animaux ne doit être constaté
Evaluation biologique : Essais de génotoxicité		
Bacterial Reverse Mutation (<i>in vitro</i>, <i>Salmonella typhiurium</i>)	NF EN ISO 10993-1, 3, 12 OCDE 471	Les composés chimiques du dispositif médical ne doivent pas induire de mutation génétique
Tests <i>in vivo</i> du micro-noyau (rates)	NF EN ISO 10993-1, 2, 3, 12 OCDE 474	Les composés chimiques du dispositif médical ne doivent pas induire de mutation génétique
Essais d'implantation	NF EN ISO 10993-1 NF EN ISO 10993-2 NF EN ISO 10993-6 NF EN ISO 10993-12	Evaluation qualitative sur le lieu d'implantation : Absence de réaction tissulaire, présence éventuelle de résidus de matériaux dégradables, aucune anomalie en analyse histopathologique
Evaluation biologique : Essais d'hémocompatibilité		
Non applicable, car aucun contact direct ou indirect avec le sang n'est envisagé		
Evaluation biologique : Essais de biodégradation et substances relargables		
Identification des produits de dégradation	NF EN ISO 10993-1, 2, 9, 12 NF EN ISO 10993-13	/
Quantification et caractérisation des produits de dégradation	NF EN ISO 10993-1, 2, 9, 12 NF EN ISO 10993-13	Détermination des masses à l'équilibre, masses molaires et leur distribution
Etudes toxico-cinétiques	NF EN ISO 10993-1, 2, 9, 12 NF EN ISO 10993-13 NF EN ISO 10993-16	Détermination de la cinétique des produits de dégradation