

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2022

2022 TOU3 1534

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Elise LUPON

le 15 Avril 2022

**Décellularisation et recellularisation des allogreffes de tissus composites :
état des lieux et nouveaux concepts**

Directeur de thèse : Dr. Alexandre G. LELLOUCH

JURY

Monsieur le Professeur	Jean-Louis GROLLEAU-RAOUX	Président
Monsieur le Professeur	Benoît CHAPUT	Assesseur
Monsieur le Professeur	Frédéric LAUWERS	Assesseur
Monsieur le Docteur	Mohcine TAÏZOU	Assesseur
Monsieur le Docteur	Emilien CHABRILLAC	Suppléant
Monsieur le Docteur	Alexandre G. LELLOUCH	Invité



TABLEAU du PERSONNEL HOSPITALO-UNIVERSITAIRE
des Facultés de Médecine de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2021

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. GLOCK Yves
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel	Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. GRAND Alain
Professeur Honoraire	M. ADOUE Daniel	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe	Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. LANG Thierry
Professeur Honoraire	M. BARRET André	Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. BLANCHER Antoine	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MALECAZE François
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard	Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude
Professeur Honoraire	M. BONNEVIALLE Paul	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland	Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre	Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	M. CARON Philippe	Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PARINAUD Jean
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean	Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel	Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. DAHAN Marcel	Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REGIS Henri
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas	Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges	Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette	Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.	Professeur Honoraire	M. TKACZUK Jean
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles	Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Émérites

Professeur ADER Jean-Louis	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur ARBUS Louis	Professeur LANG Thierry
Professeur ARLET Philippe	Professeur LAURENT Guy
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	Professeur LAZORTHES Yves
Professeur BOCCALON Henri	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur BOUTAULT Franck	Professeur MANELFE Claude
Professeur BONEU Bernard	Professeur MARCHOU Bruno
Professeur CARATERO Claude	Professeur MASSIP Patrice
Professeur CHAMONTIN Bernard	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CHAP Hugues	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur CONTÉ Jean	Professeur MURAT
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur RISCHMANN Pascal
Professeur DABERNAT Henri	Professeur RIVIERE Daniel
Professeur DELISLE Marie-Bernadette	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur FRAYSSE Bernard	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GRAND Alain	Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur SERRE Guy
Professeur JOFFRE Francis	Professeur SIMON Jacques

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme ABRAVANEL-LEGRAND Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie	Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme AUSSEIL-TRUDEL Stéphanie	Biochimie et Biologie Moléculaire	Mme BREHIN Camille	Pédiatrie
Mme BELLIERE-FABRE Julie	Néphrologie	Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion	M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
M. BIETH Eric	Génétique	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
M. BUSCAIL Etienne	Chirurgie viscérale et digestive	Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CASSAGNE Myriam	Ophthalmologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie	Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CONGY Nicolas	Immunologie	M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
Mme COURBON Christine	Pharmacologie	M. DEGBOE Yannick	Rhumatologie
M. CUROT Jonathan	Neurologie	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie	M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
Mme DE GLISEZINSKY Isabelle	Physiologie	Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
M. DELMAS Clément	Cardiologie	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme FLOCH Pauline	Bactériologie-Virologie; Hygiène Hospit.
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie	Mme GALINIER Anne	Nutrition
M. GANTET Pierre	Biophysique	Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie	M. GASQ David	Physiologie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
M. HAMDI Safouane	Biochimie	Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme HITZEL Anne	Biophysique	M. GUERBY Paul	Gynécologie-Obstétrique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire	Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie	Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
Mme MASSIP Clémence	Bactériologie-virologie	M. MOULIS Guillaume	Médecine interne
Mme MONTASTIER-SIMMERMAN Emilie	Nutrition	Mme NASR Nathalie	Neurologie
M. MONTASTRUC François	Pharmacologie	Mme QUELVEN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
Mme MOREAU Jessika	Biologie du dével. et de la reproduction	M. REVET Alexis	Pédopsychiatrie, Addictologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie	M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	Mme SIEGFRIED Aurore	Anatomie et Cytologie Pathologiques
Mme PERROT Aurore	Hématologie ; Transfusion	Mme VALLET-GAREL Marion	Physiologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie	M. VERGEZ François	Hématologie
Mme PLAISANCIE Julie	Génétique		
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie		
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène		
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie		
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie		
M. TREINER Emmanuel	Immunologie		
Mme VIJA Lavinia	Biophysique et médecine nucléaire		

Maîtres de Conférences Universitaires de Médecine Générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M. BISMUTH Michel
M. ESCOURROU Emile

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr FREYENS Anne
Dr PIPONNIER David
Dr PUECH Marielle

Dr BIREBENT Jordan
Dr BOUSSIER Nathalie
Dr LATROUS Leila

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : Elie SERRANO

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1 ^{ère} classe		P.U. - P.H. 2 ^{ème} classe	
M. ACAR Philippe	Pédiatrie	M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. ACCADBLE Franck	Chirurgie Infantile	M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne	M. BERRY Antoine	Parasitologie
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie	M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie	Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie	M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique	M. CORRE Jill	Hématologie, Transfusion
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie	Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie	M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire	M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-Entérologie	M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie	M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire	Mme FARUCH-BILFELD Marie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. CHAYNES Patrick	Anatomie	M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie	M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
M. COURBON Frédéric	Biophysique	M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie	Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire	M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. DELABESSE Eric	Hématologie	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses	M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. DELOIRD Jean-Pierre	Cancérologie	M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie	Mme MARTINEZ Alejandra	Cancérologie, Radiothérapie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique	M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie	M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie	M. PUGNET Grégory	Médecine interne, Gériatrie
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique	M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie	M. RENAUDINEAU Yves	Immunologie
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique	M. SAVALL Frédéric	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie	M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie	M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. HUYGHE Eric	Urologie	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie	Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. LARRUE Vincent	Neurologie	M. TACK Ivan	Physiologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie	M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation	M. YRONDI Antoine	Psychiatrie d'Adultes ; Addictologie
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie	M. YSEBAERT Loic	Hématologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie		
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation		
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile		
M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition		
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie		
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale		
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie		
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie		
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne		
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie		
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie		
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie		
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail		
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie		
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive		
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie		
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique		
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique		
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie		
		Professeur des Universités de Médecine générale	
		Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31000 TOULOUSE

Doyen : Didier CARRIE

P.U. - P.H.

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1^{ère} classe

2^{ème} classe

M. AMAR Jacques (C.E)	Thérapeutique	Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BONNEVILLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. AVET-LOISEAU Hervé (C.E.)	Hématologie, transfusion	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CAVIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E)	Chirurgie Vasculaire	M. GUIBERT Nicolas	Pneumologie, Addictologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	M. HERIN Fabrice	Médecine et Santé au Travail
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro	M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. CALVAS Patrick (C.E)	Génétique	M. MARTIN-BLONDEL Guillaume	Maladies infectieuses, maladies tropicales
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie	Mme PASQUET Marlène	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Médecine d'urgence	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	Mme RUYSSSEN-WITRAND Adeline	Rhumatologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	Mme TREMOLLIÈRES Florence	Biologie du développement
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie	Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie		
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie		
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique		
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie		
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie		
M. GAME Xavier	Urologie		
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation		
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie		
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique		
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition		
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie		
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine d'urgence		
M. LAUWERS Frédéric	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie		
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque		
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie		
M. MALAUDA Bernard	Urologie		
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique		
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie		
M. MAZIERES Julien	Pneumologie		
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth (C.E)	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OSWALD Eric (C.E)	Bactériologie-Virologie		
M. PAGES Jean-Christophe	Biologie Cellulaire et Cytologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PAUL Carle (C.E)	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie		
M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie		
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie		
Mme RAUZY Odile	Médecine Interne		
M. RECHER Christian (C.E)	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme (C.E)	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire		
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques		
M. SIZUN Jacques	Pédiatrie		
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie		
M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale		
		Professeurs des Universités de Médecine générale	
		M. MESTHÉ Pierre	
		M. OUSTRIC Stéphane (C.E)	
		Professeurs Associés Médecine générale	
		M. ABITTEBOUL Yves	
		M. CHICOULAA Bruno	
		M. POUTRAIN Jean-Christophe	
		Professeur Associé en Bactériologie - Virologie; Hygiène Hospitalière	
		Mme MALAUDA Sandra	

Remerciements

A notre Maître et Président de jury

Monsieur le Professeur Jean-Louis GROLLEAU

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Chirurgie Plastique, Reconstructrice, Esthétique et des Brûlés

Chef de service

CHU de Toulouse

Je ne vous remercierai jamais assez pour votre générosité, votre bienveillance et votre enseignement. Vous m'avez ouvert les portes de votre service et de cette spécialité magnifique qu'est la chirurgie plastique.

Intimidée et impressionnée, je me souviens avoir passé des heures, pendant plusieurs semaines, devant votre porte avant d'avoir osé frapper. En m'acceptant finalement dans votre équipe, alors que je n'avais pas toutes les conditions requises pour y accéder, vous m'avez également offert un cadeau merveilleux : la gratitude. C'est une énergie qui marquera toute ma vie et ma façon de l'appréhender.

Vous m'avez également soutenue lorsque j'ai souhaité réaliser un Master 2 aux États-Unis et êtes devenu mon rendez-vous virtuel immanquable du dimanche soir et la seule personne à avoir connu toutes les péripéties de ce voyage. S'il m'est beaucoup plus aisé de vous écrire que de vous parler, sachez que ce n'est que le reflet de toute l'estime que j'ai pour vous, et qui me fait souvent perdre mes mots.

Intelligent de cœur et d'esprit, vous êtes très lucide sur les personnes qui vous entourent et rien ne vous échappe. Si, par maladresse, j'ai pu pendant un temps me montrer un peu égoïste, masquant peut-être un conflit interne de légitimité, je m'en excuse. Si c'était à refaire, je ne changerais rien car j'ai tant appris sur le chemin, humainement et professionnellement. Je ne peux pas vous garantir que j'arriverai à faire moins de choses, mais je ferai mon maximum pour les faire mieux.

Je me sens sincèrement l'interne la plus chanceuse que je connaisse, d'avoir eu l'opportunité d'être votre élève et une interne du service de chirurgie plastique de Toulouse, qui est à votre image. C'est un service dans lequel les inter-CHU viennent de la France entière et où beaucoup aimeraient rester. C'est un service unique, qui respire la bonne humeur, la tolérance, le respect, l'honnêteté et la confiance mais c'est aussi une organisation fiable et solide dans laquelle règne la qualité du soin, la transversalité professionnelle et l'expertise.

C'est un service que j'ai pris l'habitude d'appeler « la maison » plutôt que « le travail ». Cette dernière année dans notre équipe a été un vrai bonheur et j'ai été heureuse de me lever chaque jour pour retrouver le service. C'est donc le cœur lourd mais pleins de merveilleux souvenirs et de gratitude que je quitte « la maison ».

Je vous remercie infiniment.

A notre Maître et juge

Monsieur le Professeur Benoît CHAPUT

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Chirurgie Plastique, Reconstructrice, Esthétique et des Brûlés

CHU de Toulouse

Une énergie et une bonne humeur hors du commun. Être avec toi, c'est quitter la dimension terre et se retrouver sur la planète Chaput – un endroit fantastique où la chirurgie devient simple et évidente – où tout s'enchaîne parfaitement et où tout problème a une solution. C'est aussi un monde de travail acharné, d'innovation, d'exigence et de dépassement de soi. Tout cela avec beaucoup de rires, de malice et de chansons.

Il y a tellement d'affection et de bêtises qui me viennent en tête en pensant à toi (surtout depuis que tu vas saluer plusieurs fois par soir les patientes qui ne sont pas les tiennes !) que je vais me contenter de rire beaucoup, et te remercier de tout mon cœur pour cette personnalité (a-ty-pique ! le barbu !) si attachante et qui concorde si bien avec la mienne (même si, il faut bien l'avouer, cela n'aide pas mes défauts de concentration) et pour ta bienveillance.

Je ferais au mieux pour représenter l'école toulousaine et honorer toutes les inestimables leçons chirurgicales et universitaires que tu m'as transmises (et même les autres conseils plus originaux). Il m'est très difficile de te dire au revoir et j'espère que, malgré la distance, un regard complice - une phrase - suffira toujours pour nous déclencher un fou rire.

J'ai eu la chance inestimable de bénéficier de 6 mois de binôme avec toi. Je pèse donc bien mes mots quand j'affirme que tu es l'une des personnes les plus talentueuse, résiliente, disponible et agréable que je connaisse.

Au long du chemin – et au-delà d'un mentor - j'ai découvert un véritable ami.

Tu vas énormément me manquer.

A notre Maître et juge

Monsieur le Professeur Frédéric LAUWERS

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Chirurgie Maxillo-faciale

CHU de Toulouse

Ce sont vos valeurs morales très fortes qui m'ont poussée à vous contacter initialement. Humaniste et solidaire, vous contribuez par vos actions à l'égalité des chances dans la santé et la formation. J'ai une grande admiration pour votre dévouement, votre altruisme et votre humilité. Je n'ai malheureusement pas eu l'opportunité de passer dans votre service, que mes co-internes recommandent tous, et sachez que j'en suis triste.

Je vous remercie pour le temps que vous avez pris à m'orienter vers le Professeur Meara.

C'est grâce à vous que j'ai pu découvrir le programme de « *Global Surgery and Social Change* », et passer ces moments précieux dans leur équipe à l'école de Santé Publique de Harvard et rencontrer des personnes qui partagent cette passion.

Mon sujet de thèse initial devait porter sur la chirurgie mondiale (et qu'on nommera, bientôt je l'espère, chirurgie globale). Bien que le délai imparti ne m'ait pas permis d'en faire le sujet de cette thèse, je ferais mon maximum pour mener à bien ce travail et je me réjouis de vous le faire relire bientôt.

Je vous remercie d'être ici aujourd'hui pour juger ce travail, pour ce moment si important à mes yeux et voyez-en celui-ci le témoignage de ma sincère et profonde considération.

A mon Maître, ami et juge

Monsieur le docteur Mohcine TAÏZOU

Assistant universitaire du laboratoire d'anatomie

Université de médecine Toulouse Rangueil

Chirurgie Plastique, Reconstructrice, Esthétique et des Brûlés

Le grand frère que j'ai toujours voulu avoir, et un chef sur lequel on peut toujours compter. On les compte sur les doigts d'une main, les personnes en qui on a vraiment confiance et tu en fais partie. Ce n'était pourtant pas gagné d'avance lors de mon premier jour dans le service et il a fallu un peu de temps pour « s'appriivoiser » (je suis sûre que ce pauvre prisonnier aura su aviver cette aptitude de transmission du savoir que tu portes en toi !).

Ton parcours force l'admiration et est une source d'inspiration. Tu viens de loin. Tu connais la valeur de chaque chose. Pour ton talent, ton perfectionnisme, ton impartialité et ton écoute, tu as acquis le respect de tous tes pairs et des gens qui t'entourent. C'est pour ces qualités que tu es si souvent sollicité. Tu deviendras également, très bientôt, un papa formidable et un entrepreneur à succès, je n'en ai aucun doute.

Je sais comme il t'est difficile de laisser la main et cela ne fait qu'amplifier ma reconnaissance pour ta confiance ces derniers mois au bloc opératoire.

Merci pour ces années d'accompagnement et de bienveillance.

Comme le renard avait les champs de blé pour se rappeler du petit prince qui l'avait apprivoisé, les petits koalas accrochés à leur famille n'auront plus jamais la même signification pour moi.

Vois en ce travail le témoignage de mon estime, mon amitié et de ma sincère reconnaissance.

A mon Maître, ami et juge

Monsieur le docteur Emilien CHABRILLAC

Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole

Chirurgien oto-rhino-laryngologiste

Je t'admire beaucoup pour ton parcours sans faute, et cette détermination dont tu fais preuve ces dernières années pour rejoindre le chemin universitaire.

Après avoir survécu au Covid chez les Anglais – et toute la réglementation qui va avec, te voilà maintenant dans les joies du master 2, un peu plus loin des blocs opératoires. Je n'ai aucun doute sur ta réussite, à tous les niveaux.

Je te remercie pour cet humour piquant - dont je ne me lasse pas, cet accent typique de la ville rose qui sonne si bien, tes convictions honorables et ta générosité (j'ai d'ailleurs pu découvrir des caisses de déguisements stupéfiants en récupérant mes affaires, que ta famille avait gentiment gardées pendant presque deux ans !)

Je suis heureuse de savoir Alexia et toi ensemble et me réjouit de votre mariage très bientôt. Vous m'avez soutenue, même dans mes périodes les plus ambivalentes, et vous avez toute ma reconnaissance pour cela. J'espère que vous viendrez vite me rendre visite à Nice ! Il y a bien moyen de trouver un train de 13 heures, je crois (ce qui devrait être un jeu d'enfant après votre entraînement Italien).

Si j'ai souhaité te voir parmi les membres de ce jury, c'est pour ton expertise d'universitaire en devenir, mais aussi, parce que c'est un moment important pour moi et qu'il m'est cher que Alexia et toi soyez au premier rang.

Vois donc en ce travail le témoignage de mon estime, mon amitié et de ma sincère reconnaissance.

A mon Maître, ami, juge et directeur de thèse

Monsieur le docteur Alexandre G. LELLOUCH

Chef de clinique des Universités – Assistant des hôpitaux

Hôpital Européen Georges-Pompidou

Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique

Je me souviens encore de cette rencontre surprenante, alors que je cherchais à obtenir ton nom depuis des mois, et le jour où je l'ai obtenu, par magie, tu étais assis en face de moi.

Quand tu m'as parlé de Harvard et de tous les projets, je ne te croyais pas vraiment. Il fallait le voir pour le croire. Mais, depuis que j'ai mis les pieds dans ton univers incroyable, j'ai compris qu'on pouvait aussi croire aux choses, pour pouvoir les voir.

Père de quatre enfants, chirurgien plasticien, lecturer à Harvard, leader de projets qui atteignent bientôt Mars et greffeur de face de singe ou de cœur de souris à tes heures perdues, c'est toi, le véritable *Alien with extraordinary ability*.

Tu as un vrai don pour stimuler les collaborations, voir les opportunités et motiver tes pairs (et aussi pour la microchirurgie !). Ceci ajouté à ton travail acharné, ton autodiscipline et ta détermination sont à l'origine de ces résultats impressionnants.

Cela commence à faire quelques années que nous évoluons ensemble, et tu m'as accompagnée dans mes plus grandes réussites et aussi mes plus grandes déceptions, comme je t'ai soutenu dans les tiennes. Je te remercie pour ton mentoring tout au long de ces années et d'avoir cru en moi. Tu élèves chacun d'entre nous et nous invites à nous dépasser. Tu nous as appris à voir grand, très grand pour pouvoir partager ton rêve et imaginer le nôtre.

On a encore pleins de projets à venir et je m'en réjouis.

Vois en ce travail le témoignage de mon estime, mon amitié et de ma sincère reconnaissance.

A ma famille

- *La Bretagne*

- A ma mère : Sans qui je ne serais rien aujourd'hui. Brillante et sensible, tu t'es souvent oubliée pour qu'on réussisse. Merci pour ta douceur, ton dévouement, ta patience et ton amour infini. Tu m'as soutenu sans relâche jusqu'à aujourd'hui. Adolescente un peu impulsive, je t'en ai fait voir de toutes les couleurs et je m'en excuse. J'aime penser que si cela n'avait pas été si « sportif » à cette époque, je n'aurais pas cette détermination et persévérance aujourd'hui. Stp, continue de m'envoyer ces morceaux de saxophone que j'apprécie tant. Moi aussi, je t'aime à l'infini.

- Amélie : Une douceur, une patience et une gentillesse sans égale. Tu ressembles à maman. Je suis si fière de toi et de ce que tu as construit. Tu es bien plus forte que ta sensibilité ne laisse paraître. Je te dois beaucoup et je n'en serais pas là aujourd'hui sans ton soutien infaillible et ta bonne humeur communicative. Merci pour avoir supporté mes 400 coups et tous ces fous rire (Lil Bow Wow, les balzanes blanches, ça marche très très bien, le radis qui pique, les auto-tamponneuses, le réservoir...).

- Nino (Taure) : Mon petit frère, mon trésor. Avec nos 10 ans de différence, je t'ai vu grandir et devenir le beau jeune homme que tu es aujourd'hui. J'espère que ce travail t'inspirera. Il est temps pour toi de sortir de ta zone de confort et de croquer la vie à pleines dents ! Just do it !

- Marc : Merci pour avoir été présent. Tu m'as donné une éducation dans laquelle la discipline, l'exigence et la valeur des choses sont au premier rang. Tu n'y es pas pour rien dans ma capacité à avoir pu mener à bien ce travail.

- Marie Paule : Merci pour ta générosité et tes attentions. Tu n'as jamais oublié un anniversaire.

- Jean Luc et Armelle : Merci de votre soutien. La famille que vous avez créée est un exemple pour moi. Votre venue pour ce moment important me fait chaud au cœur.

- Mes cousines chéries, Aude et Candice : Pour toutes ces parties de quems dont je ne me lasse pas. Je suis fière de vous. Merci de votre présence.

- Emmanuel (alias Lénine) : Un père de famille responsable, aimant, méticuleux et courageux, tu as beaucoup évolué pendant ces années. Si « l'intelligence est la capacité d'adaptation », on peut dire que tu es brillant puisque te voilà maintenant officiellement Français et avec le même nom que notre président ! Tu contribues à élever notre pays. Bravo pour ton parcours. Tu as beaucoup de mérite.

- La famille Diaz Suarez : Nubia, Hernando, Maria et Anna pour m'avoir fait découvrir votre magnifique pays, la Colombie. Su lenguaje melodioso y su alegría de vivir son magníficos.

- La famille Magré pour m'avoir accueillie et fait découvrir votre captivant univers en Utah.

- Mes grands-parents † « mamie et papi tambour ». Pour ces valeurs de respect et de tolérance que vous avez diffusé dans la famille. Vous seriez si fier de nous tous.

- Les petits derniers, Robin et Marianne. Les rayons de soleil de la famille. J'attends déjà vos frères et sœurs, mais aussi cousins et cousines avec impatience !

- ***La Martinique***

- Mon père : Même si j'ai évolué un peu loin de toi, tu m'as soutenu dans mes choix et dans les moments importants. Tu m'as transmis des valeurs qui te sont chères concernant la tolérance, la lutte contre le racisme et à être fier de mon métissage (je ne parlerais pas de notre tempérament explosif et râleur (les « caliméros »), notre humour particulier et toutes ces allergies dont j'ai aussi hérité au passage !). Je comprends comme il peut être difficile de se sentir bien loin de chez soi et je sais que tu as fait du mieux que tu pouvais avec ton passé, tes expériences et tes besoins. Je t'aime.

- Sandra : Une sœur découverte vers mes 10 ans et un « cadeau de la vie tombé du ciel ». Tu es merveilleuse. Ce superbe voyage en Thaïlande (et nos déboires sentimentaux) nous auront permis de devenir si proches et confidentes aujourd'hui. Courageuse, sensible et forte, tu permets souvent à la famille d'entretenir les liens. Je suis fier de toi. Merci pour ton soutien indéfectible et ta joie de vivre.

- Sétina : Tu es bien plus forte et douée que tu ne peux l'imaginer. Je te souhaite le meilleur pour le futur, tu pourras toujours compter sur moi.

- Mon petit frère, Julien : Je n'ai pas eu l'occasion de beaucoup te connaître, je te souhaite de trouver l'apaisement et d'être heureux. J'espère aussi qu'on pourra partager davantage de temps ensemble.

- Ma grand-mère : Le pilier de la famille. Même si mon créole me fait de plus en plus défaut pour bien communiquer avec toi, je te remercie pour ta bienveillance et ton amour.

- Mon oncle, Charly : Mon exemple d'enfance. Médecin inspirant et brillant, je te remercie de ton soutien et ta présence en ce jour si spécial, où nous devenons officiellement, confrère et consœur.

- Mes cousin(e)s : Anaïs, pour ces posters de chevaux et de Leonardo Dicaprio, ces zouks love et chansons de Céline Dion qui ont marqués notre enfance. Sensible, réfléchie et ambitieuse, ton combat pour les sourds et muets est honorable. Merci pour ton soutien aux USA.

Pierrick, « picou » pour ce « danger boule », le « film chouette mais en Vietnamien » et toutes ces parties de Nintendo. C'est à toi que revient la chanson « powerful » qu'on a écoutée en boucle. Votre présence m'est très chère aujourd'hui.

- Vivianne : Pour nous avoir couvert d'anti-moustique de la tête aux pieds lorsqu'on arrivait aux Antilles. Et pour tout le reste. Merci d'avoir pris soin de nous.

- Fernande : Ta présence auprès de papa est inestimable pour nous tous. Ta bonne humeur et ta résilience à toutes épreuves sont exemplaires. Tu es une merveilleuse personne. Merci pour tout.

- Audrey : Toujours prête à nous aider et nous accueillir. Merci pour ton dynamisme et ta gentillesse. C'est toujours un plaisir de te voir avec Brice et Matéo.

- Fred : Souriant, détendu, présent et agréable, je suis heureuse de savoir Sandra avec toi.

- Mon grand-père †, Denise †, Daoma †, Manu, Alexandra, Chichine, Olivier, Ralph, Stéphan, Suzie, Victoria, et toutes mes autres tantes, cousins et cousines que je connais moins.

- Les petits derniers, Lucas et Victoria qu'ils me tardent de rencontrer.

Mes strasbourgeoises

- Sarah : My amazing Sarah (tu sais que je meurs d'envie de t'appeler autrement). Jeune interne, tu m'as immédiatement considérée et prise sous ton aile, me donnant mes premiers rudiments de chirurgie plastique. Tu es devenue très vite cette amie si douée, drôle, créative, enjouée et inspirante. Parce que chaque moment avec toi est garanti en surprises - que je découvre que tu parles encore une nouvelle langue, que tu peux courir des marathons sans efforts ou que tu t'es lancée dans un nouvel apprentissage professionnel ou activité insolite - je te trouve géniale. Merci pour ton soutien et toutes ces petites péripéties qui rendent notre amitié si précieuse à mes yeux (m'avoir attendue des heures sur la ligne d'arrivée à Rome, m'avoir poussée à me dépasser au Adam's Peak, me rejoindre à Carcassonne ou à Barcelone en bravant tous les challenges liés au Covid, m'avoir fait courir après cette intervention (réussie !) sans bipolaire au Luxembourg, avoir posé des indications de mastopexie chez tous les singes du Sri Lanka, avoir supporté mes folies universitaires en Martinique et toutes ces « monkey photos »...). Je suis heureuse de te sentir épanouie dans ta vie personnelle et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

- Charlinette : Si c'est un mot, c'est la joie. Une chanson, c'est « la kiffance » (désolée, je te l'ai un peu imposée celle-là !). Une vision, c'est un rayon de soleil. Tu fais partie de ces êtres qui remplissent mon cœur de bonheur, juste en les voyant. Toujours partante pour boire un verre et faire la fête, tu n'en es pas moins très sérieuse et très fiable. Tu as fait l'unanimité lors de ton passage à Toulouse et ton départ m'a été pénible. Nos apéritifs sur cette grande terrasse me manquent souvent. J'ai hâte qu'on remette ça à Nice bientôt. Merci de m'avoir aidée à surmonter mes challenges « post-Américain ». Tu es une femme pétillante, pleine de talent et d'énergie et une amie en or. Finalement, tu connais tous mes secrets... I am groot !

Les Rencontres de Toulouse :

- Ulysse : Merci pour ce magnifique tour du monde et de m'avoir supporté pendant ces années. Mon estime pour toi est sans équivoque et tu seras toujours dans mon cœur. Je m'excuse si je t'ai blessé. Sincèrement, tu es génial et tu mérites d'être heureux.

- Alexia : La « sur femme » qui cours 80 km sous la neige, lors de son temps libre. Sérieuse, réfléchie et épatante, tu seras une véritable championne quand tu en seras aussi convaincue que je le suis. Merci pour tous ces souvenirs glorieux, de notre recalage - sans appel - du Berghain, à ces hébergements d'Américain (exhibitionniste !) ou de Belge perdus à l'internat, notre crémaillère déguisée très prisée ou ce semi-marathon sous la tempête Lyonnaise et que j'ai réalisé entièrement vêtue d'un sac poubelle. Mon plus beau souvenir restera celui de te voir faire du bruit avec des conserves vides au milieu de la campagne de Vancouver pour éloigner les ours.

- Laura : J'entends ton rire d'ici. Et du coup ça me fait rire. Et ça y est, on est reparties à rire pour rien. En souvenir de notre petite colocation où j'ai acheté assez d'œufs pour nourrir tout l'immeuble, ce bus de 10 h pour retourner à Rennes, cette arnaque à la location de voiture Italienne et ta pâte à modeler confisquée. Merci pour ton amitié, ta spontanéité et ta joie de vivre.

- Pierre Marek : Avec toi c'est « la qualité, pas la quantité ». Merci pour ta gentillesse, ton humour, ta grande patience et ta compréhension. J'ajouterais également un remerciement spécial sur ta prise en charge exemplaire de mon entorse au piton des neiges (d'ailleurs, aïe !). Je peux compter sur toi à tout moment et tu as rendu mon temps bien agréable ces derniers mois. On a d'ailleurs installé une vraie dynamique de vie, entre ces centaines de sushis, d'huîtres et de comté, le jump pré-sommeil, le temps pour le masterpiece « plutôt pas mal », les fipettes de 7h00, mes tartiflettes « maison », l'exorciste jamais très loin (l'aiiisse), mes interrogations existentielles nocturnes (pourquoi les zèbres ont-ils des rayures ? Est-ce qu'un chirurgien qui écrit ses initiales sur le foie d'un patient doit être puni ?), tes mes vêtements du soir, ~~tes~~ mon parfum de jour. Touk. Tes pâtes pesto au saumon (j'ai la belle vie moi), ce « Bonjour » bien dynamique de Rires et Chanson, ces honnêtes parties d'échecs... Fraü ! Je ne sais pas ce que nous réserve l'avenir mais, merci pour ces moments magiques. Je tiens beaucoup à toi.

- Arthur Bedet : Ta rencontre justifie à elle seule cette inscription au DU d'anglais. Drôle, intelligent et à l'écoute, j'adore passer du temps avec toi ! Je compte sur toi pour venir me faire un coucou à Nice (et refaire ces mojitos maison à l'occasion !).

- Luc : « doudou ». Toujours un plaisir de te voir à l'occasion d'un opéra ou d'un week-end Aveyron. Je te souhaite pleins de belles choses, pas trop de questionnements, et un passage à Nice très bientôt !

- Laurie : Merci pour ta grande gentillesse. J'admire ton investissement dans ce que tu entreprends. Tu as l'air d'être sur un petit nuage avec Maxime et j'en suis ravie.

- Michel † et Vana : Courage. Tu as l'air d'aller beaucoup mieux et ça fait plaisir à voir.

- Ayria : Pour ces premiers semestres d'internat mouvementés. Je te souhaite pleins de bonnes choses.

- Laure : C'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi et c'est beaucoup plus facile d'appréhender mon arrivée à Nice grâce à toi. Merci. (Nb : j'adore quand tu m'appelles Ninette !)

- Vincent : Même si j'étais rarement dans notre « mobil home », c'était très chouette de t'avoir connu.

Les acteurs de cette superbe revue :

- Bernadette : Icône emblématique de l'internat de Toulouse, le meilleur internat de France et c'est surtout grâce à vous ! Merci pour votre soutien appuyé et votre bienveillance pendant ces années.

- Yoann Dalmas : Toujours dans les bons plans et prêt à aider, tu as été un co-interne de rêve. Parce que tu es sur tous les fronts (et il fallait passer du temps avec toi pour se rendre compte de tous ce que tu fais !), brillant, travailleur, attentionné, honnête et que tu trouves quand même le temps de profiter de la vie, j'ai une très grande estime pour toi. Je sais que tu iras très loin. Merci pour ce beau semestre, ton interprétation unique de Jacques Dutronc et aussi pour ces superbes Irish Coffee maison !

- Stephan Levy : Je souris encore en nous revoyant sur scène dans ce duo magique, avec ton splendide slip rouge moulant, et cela devant tous les PU-PH ! Ta gentillesse et ton ouverture d'esprit font de toi une très belle personne. Tu as survécu à ce début de présidence de l'internat mouvementée, qui commence à prendre un goût plus agréable et c'est bien mérité ! Je suis triste de ne pas pouvoir poursuivre l'aventure avec vous (qui rivalisera avec ces coms pleines de fautes d'orthographe ???).

- Suzanne Robert : Pour reprendre l'expression de Yoann, « une main de fer dans un gant de velours », qui te décrit si bien. Sérieuse et brillante, tu es aussi une des meilleures danseuse et chanteuse que je connaisse ! C'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi.

- Arthur Justo : Une philosophie et une discipline militaire qui ne me déplaisent pas. Merci de nous pousser tous vers le haut, à ta façon. Je devine beaucoup de bienveillance derrière tout cela.

- Joris Tiercelin : Maké ! Merci pour cette fine performance dans l'imitation des urologues, ton déguisement douteux du génie avec lampe incluse et ton interprétation colorée de la corrida. Tu es aussi un chouette cointerne, discret, efficace et souriant, c'est agréable de travailler avec toi.

- Maxime Teulière : Je ne sais pas ce que je préfère entre ton interprétation dynamique de Debonnecaze, ta performance inégalable dans le rôle du patient uro / neuro / polypathologique ou ton accent du Sud-Ouest si attachant !

- Déborah Foltran : Merci pour ton soutien pas loin de la scène, et pour ces grands sourires éclatants. Mais aussi, Pierre Potin, l'homme de l'ombre qui nous as tous encouragé et guidé, Jean Baptiste, pour cette interprétation entraînant du Pr Bonnevialle, Chloé et Célia pour ce « rap néphrologique » déchaîné, Alexis, la jolie voix, Natacha, Madeleine, les musiciens et tous les autres.

Les autres rencontres de l'internat :

- Candide : Sans toi, ces midis à l'internat n'auraient pas le même goût ! Merci de ta gaieté.

- Le Anouar sauvage et Fred (et cette photo récurrente de Chihuahua, la Palinka, P'tite bière ?), Franck-olivier (toujours souriant), Alix, Adèle, Julien, Pierre et Guillaume.

Chirurgie Plastique Rangueil

- **A ceux qui sont ou ont été mes chefs :**

- Pr. Jean-Pierre Chavoin : C'est un honneur d'avoir pu garder contact avec vous, sur des sujets universitaires, des projets internationaux ou juste pour prendre des nouvelles. Vos œuvres de carrière sont reconnues même de l'autre côté de l'Atlantique. La renommée du service de chirurgie plastique de Toulouse ne serait pas ce qu'elle est sans vous. Merci de tout ce que vous nous avez transmis.

- Thomas Meresse : Chirurgien remarquable et coach sportif en fin de journée, j'ai adoré ce binôme avec toi. Merci pour ton énergie communicative, ce trail du cassoulet et tout ce que tu m'as appris.

- Dimitri Gangloff : Merci pour ton expertise et ton enseignement, ainsi que ces belles chirurgies oncologiques auxquelles j'ai eu l'opportunité d'assister. J'aurais voulu passer plus de temps avec toi. Je poursuivrai au mieux ces projets avec la SFCO - et donc avec toi - pour mettre en avant la place indéniable de la chirurgie oncologique dans notre spécialité.

- Hadrien Paoli : Merci pour ces deux mois de binôme que j'ai adoré. Tous les internes qui sont passés avec toi disent la même chose : tu es un chef exceptionnel et une personne en or. Ces moments d'apprentissage au bloc dans une ambiance décontractée ont été très agréables. Merci pour ta gentillesse, ton aide pour mon déménagement, et même ce trajet mémorable en voiture – devant la police - côté passager sur les genoux de Pierre. Sache que depuis ton départ du service, tu manques souvent au personnel, médical comme paramédical, qui parle toujours de toi et qui ne t'a pas oublié.

- Jérôme Laloze : Tu as joué un rôle non négligeable dans l'émergence de ce travail. C'est effectivement toi qui m'as mis en contact avec Audrey Varin et Alice Prévost, lorsque je cherchais un terrain de Master 1, étape préalable indispensable pour pouvoir effectuer la suite. Par ailleurs, je garde un très bon souvenir de mon binôme avec toi, où j'ai beaucoup appris et dans une ambiance détendue et apaisante. Je te souhaite pleins de bonheur avec Constance et Joseph.

- Samuel Riot : Merci pour ton soutien, ta bonne humeur et de m'avoir laissé réaliser mon premier lambeau fasciocutané seule (qui a mal tourné d'ailleurs !). C'était un plaisir de travailler avec toi.

- Charline Berthier : La gentillesse et la gaieté. Merci pour m'avoir appris à faire des vidéos et tous tes tips sur i-movie qui m'ont permis d'en réaliser un sacré nombre depuis.

- Gilles Claro : Merci pour ces soirées insolites, ton humour et ton accueil à la Réunion.

- Silvia Gandolfi : En quelques semaines, te voilà référente des résections tête-col et des amputations. Toujours partante pour faire quelques poignets à PPR avec toi ! On a plein de projets à faire ensemble et j'ai hâte d'avoir plus de temps pour qu'on puisse monter ce réseau Toulouse-Nice et « brainstormer » sur des cellules souches et des études multicentriques randomisées qui n'excitent que nous !

- Karim Kolsi : Tous tes voyages à travers le monde t'ont donné une culture chirurgicale très riche et j'aurais aimé passer pouvoir plus de temps au bloc avec toi.

• **A ceux qui sont ou ont été mes cointernes :**

- Benjamin : Vif d'esprit et sérieux, tu seras un excellent chirurgien et chef dans quelques mois (venant de la plus vieille interne de l'histoire, ça a un certain poids). Merci pour ton humour, ta dérision, ta gaieté et cette imagination incroyable dans ces piratages de boîte e-mail. Stp, continue à prendre soin de Bubulle. J'aurais adoré devenir co-chef avec toi. Tu vas me manquer mon p'tit Benji.

- Thomas de Laâge : « Le marquis » et sans nul doute le seul interne de France à quitter le bloc pour assister à une vente aux enchères de coco-fesses ! Merci pour cette personnalité nonchalante, sarcastique et humble que je trouve si charmante. Je n'oublierai pas tes très beaux cheveux et ton rire.

- Gauthier : La mascotte ! (mais aussi Gauth-liath, le mât de voilier, Hulk, le pylône de téléphérique, double cœur de girafe, Gauthzilla et tout un tas de nouveau surnom que tu récoltes chaque jour). Merci pour ce montage photo exceptionnel. Ta détermination est admirable. J'espère sincèrement te revoir bientôt à Nice avec la jolie Victoria. Nb : tu as beaucoup progressé dans la préparation du planning ^^

- Steven : À peine arrivé, tu fais déjà l'unanimité ! Vous en connaissez beaucoup vous, des premiers semestres qui revienne de consultation avec les bras remplis de bouteilles de champagne et de cadeaux ? Ta curiosité, ta bonne humeur, ta gentillesse, ton respect et ta rigueur font de toi une très belle personne. Tu iras loin. Mais, je ne te laisse pas partir comme ça, je t'attends bientôt en inter CHU à Nice et j'espère que ce travail te donnera aussi envie de rejoindre l'aventure à Boston.

- Polochon : Bosseur, droit, râleur et si attachant. Pas de faux semblant avec toi. Tu t'es occupé de Josh et Kévina avec beaucoup (trop ?) d'attention et d'investissement. Tu es toujours le bienvenu à Ranguel pour rencontrer Bubulle, qui survit à tout propriétaire depuis des années. J'entends que tu te régales chirurgicalement à Saint Malo et j'en suis ravie. À bientôt, à Rennes, Boston ou Toulouse !

- Zizou : Une volonté sans égale et un esprit très positif, tu as aussi le cœur sur la main et tu es toujours plein de bonnes intentions pour ton entourage. De Berlin, à Nice en passant par le PPR et Montpellier, on en a fait des voyages ensemble ! De tout mon cœur, je te souhaite de trouver ta place et d'être heureux dans ta vie professionnelle et personnelle.

- Gregory Lafaye : Un parcours sans fautes ! Je te souhaite pleins de bonnes choses pour l'avenir.

- Juliette Fraisse : Je ne me suis toujours pas remise de ce déguisement de Iron Man. Merci.

- Alexine : Originale, drôle et attachante. Merci pour ta contribution à ce superbe semestre.

- Maxime Testory : Courage, gentillesse et bonne humeur. Tu m'as beaucoup impressionné par ta force d'esprit. Au faite, les prothèses mammaires t'allaient à ravir !

- Chrissou : Distingué et sensible, ces images de votre drôle de binôme avec Maxime – à l'envers - et toi concentré sur le canapé du bureau des internes ne cesseront pas de me faire sourire de sitôt.

Mais aussi Zoé (rayonnante), Donia (la douceur), Charles (et ce semestre magique), Amirou (pour les couisses), Juliette Surlemont (les biscottes !), Élena (inépuisable) et Adrien (avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler mais c'est toujours agréable de savoir que l'invasion Bretonne se poursuit).

- **A toute l'équipe du bloc :** Patou, qui met « tout le monde debout », tes danses rendent le bloc si attrayant. Lucie, Anne, Cécile, Sophie, Marina, Manue et toutes les autres, c'était un immense plaisir de travailler avec vous.
- **A l'équipe d'hospitalisation :** Je suis honnêtement impressionnée par le travail que vous fournissez chaque jour. Merci pour votre dévouement, vos rires, vos suggestions pertinentes et votre efficacité.
- **A l'équipe de la consultation :** Merci de votre disponibilité et un clin d'œil à Christine, que j'apprécie tant et qui va me manquer.
- **A Yasmina, Atanaska, Fanfan et Hélène :** Merci de rattraper toutes nos et bourdes. Merci de votre gentillesse et de votre patience.
- **A l'équipe des grands-brûlés et l'équipe d'anesthésie :** Maryline qui sait tout faire, Hélène Favarel et cette efficacité incroyable, Cyrilou, Arnaud, Christelle, Jérémy, Adam, Floriane, Simon, Xavier, et tous les autres.
- **Au Dr Saboye :** Merci pour votre parcours et votre énergie si inspirante. C'est toujours un plaisir de vous voir.

A mes amis Bretons :

- Alex : Tu as toute ma reconnaissance pour avoir supporté ce terrible « hiiii everyone » pendant que l'on traversait l'Utah, avoir dû écouter « powerful » en boucle en Thaïlande (jusqu'à ce que tu l'apprécies), et avoir survécu au « fish & chips » anglais pendant des années. Tu es un ami précieux.

- Emmanuelle : Comme nos vies ont changé depuis cette tumultueuse première année de médecine ! Notre amitié, elle, est devenue toujours un peu plus forte au fil des années, peu importe la distance. Tu m'as confié l'immense honneur d'être la marraine de ta fille et je t'en remercie.

- Capucine : Même si je ne suis pas tout près, tu peux toujours compter sur moi.

- Julien-Yacine, alias « trapi » (ce drôle de personnage qui vient attester de ma déconcentration phénoménale pendant les cours), nos RDV Parisiens sont toujours un moment de délire assuré. Drôle et toujours relax, tu es aussi une personne très attachante.

- Alicia : Partie initialement pour quelques semaines en Irlande, te voilà devenue mère de famille et presque nationalisée ! Je suis si fière de toi. Ta vision du monde est magnifique et contagieuse. Merci d'être toujours présente depuis toutes ces années. Je t'adore.

- Marion « mama » : Quel chemin parcouru depuis ces après-midis au Poney-Club ! Drôle, élégante et généreuse, c'est toujours un immense plaisir de te voir avec Stephen, Gabriel et Carmen.

- Margaux : Ma « mie » d'Italie (nous pouvons même authentifier que oui, Vérone est bien une ville où tout le monde se déteste). Drôle, cultivée et consciencieuse, nos retrouvailles Parisiennes sont toujours un grand plaisir.

- Elodie : « Ma sorcière ». Toujours souriante et bienveillante, tu es comme un soleil qui illumine toutes les personnes autour d'elle. C'est grâce à toi qu'on a pu faire cette superbe expérience au Burkina Faso. Merci pour ton soutien et ton humour (et les astuces anti-crin de cheval).

- Marie : « Le cadavre et la biatch ». Je ne pourrais pas décrire ici toutes les fourberies douteuses qu'on a faites mais -avec un peu de recul pour certaines - qu'est-ce qu'on a ri ! De nos escapades hors du lycée, en passant par nos stratégies de « win », à nos instants à la mairie Toulousaine, j'ai des souvenirs insolites plein la tête. J'ai hâte de rencontrer bientôt la petite Nina.

- Françoise Perrin : Merci pour ta gentillesse et ta grande générosité. Tu es d'une résilience et d'un dynamisme sans égal.

- Marc Perrin † : Médecin surdoué et artiste désorganisé, tu étais mon coach de première année et probablement la première personne à avoir vraiment cru que c'était possible pour moi. Merci de ton soutien précieux. Je n'ai pas oublié que « *Celui qui est prêt à sacrifier un peu de liberté pour plus de sécurité, ne mérite ni l'un ni l'autre* ». J'espère que tu as trouvé ta liberté dans l'autre monde.

- Mes amies de la faculté de Rennes 1 : Pauline pour avoir traversé le Burkina-Faso à moto. Aude pour nos soirées gastronomiques qui resteront mes plus grosses avancées culinaires. Julie pour m'avoir donné goût à ton incroyable détermination et Harmony pour avoir partagé ce séjour aux Antilles.

- Mes rencontres de l'externat : Dimitri, pour ta grande disponibilité et à toute heure, m'avoir initié aux cours de rock, de tennis et à la randonnée Péruvienne. Georges et Diane, toujours le mot pour rire, Jeanne, le génie de l'ECN, Soizic, étudiante modèle et Marjolaine, la championne de course à pied.

- Justine : On a fait du chemin depuis notre errance Rennaise et je suis fière de nous. Tu seras très bientôt une merveilleuse maman et je vous souhaite beaucoup de bonheur.

- Les Vezinoises : Avec une mention spéciale pour mes filles de l'équipe de Basket (même s'il faut bien avouer que j'ai passé plus de temps sur le banc de touche que sur le terrain !), Charlotte (la stroumpfet'), Eva, Marion, Anaïs et Floriane.

- Mégane : Brillante et sérieuse, je suis ravie que ton intégration en métropole ai été aussi réussie.

- Mes amies d'enfance : Elise Romer avec qui j'ai vraiment fait les 400 coups et Claire Méré.

En souvenir de cette époque où on avait hérité du surnom du « gang des serpillères » et pendant laquelle on créait des chansons « révolutionnaires » dans des garages et en rollers.

- Franck et Gwen : Pour le petit Prince, Melba, les vraies crêpes salées, « les petits pâtés »...

Boston

- Curtis L. Cetrulo, Jr : Mon mentor Américain. Toujours le mot pour m'encourager et me pousser à m'améliorer. Tu ne m'as pas laissée tomber quand les procédures liées à mon visa ont été plus complexes et je te remercie infiniment de ta confiance. J'espère ne jamais te décevoir.

- Marc Randolph : Figure emblématique du laboratoire, je te remercie pour ta bienveillance et ta gentillesse mais aussi ton aide avec mon visa, ce tour en bateau et ce magnifique Thanksgiving.

- Aylin : Comme une grande sœur bienveillante, tu m'as accompagnée tout au long de ce travail. Tu m'as presque tout appris sur la décellularisation et son aspect pratique, faisant preuve d'une patience incroyable avec cette étudiante qui parlait à peine la langue... Je te remercie beaucoup.

- Alec : Whaaat's up? Tu nous as tout appris sur le lab' et je te remercie et te félicite de ta patience et de nous avoir supportés (« What did you do ???!! »). C'est toujours un immense plaisir de te voir.

- Marion : Brillante et ambitieuse, tu es aussi très drôle et j'ai tout un tas de souvenirs hilarants en tête quand je pense à toi. Je me dois de te présenter comme il se doit, « Murray, MD, MSc, PhD pending, control, plumber, banker and sheeper escort, chocolate addict, De vries fan club, Cookie best translator, John & Lars's French dream, rat and monkey ambassador, Miami sunburn candidate, Peter Parker Principle promotor, "bowl" word international teacher and coffee Nero faithful costumer » - pour ne citer que le minimum. Ton soutien m'a été très précieux pendant cette année, que ça soit pour m'accompagner dans l'effrayante frozen room pour aller chercher des biopsies oubliées sur des cadavres de porcs, nous perdre à Chelsea à l'occasion d'un dosage de tacrolimus et « make weird friends », faire des injections irréalistes de 0,0004 ml de bupronex à des souris. T'accompagner « là où les gens ne juge pas », sur un air de « Dance Monkey » a été un réel plaisir. Je te souhaite le meilleur.

- Hyshem : En toute honnêteté, ce travail n'aurait pas du tout la même allure sans toi et ton aide si précieuse à la maîtrise d'End-Note et de Prism. Merci pour ta gentillesse, ton humour, ta patience, ton investissement et ce pull délavé. MGH à de la chance de t'avoir et tu mérites d'upgrader très vite !

- Yanis : Pr Berkane sonne mieux. Ambitieux, travailleur et brillant, tu iras très loin. Te retrouver (en moonwalk) aux USA est à chaque fois un plaisir. Je ne dirais rien pour la petite fille de Wall Street, la « de-fen-se » du TD Garden et ton (des)intérêt pour le vin « artificiel » de Toulouse.

- Basak Uygun, pionnière dans la décellularisation, ce travail n'existerait pas sans toi et ton expertise.

- A tous ceux qui ont contribué à ce voyage magique : Helen Liu -> « *where there is a will, there is a way* », Eric Liao, Ruben, Reinier, Ariella, Nick, Korkut, Fernando, Natasha, Philipp, Gustave.

- L'équipe du PGSSC : Pr John Meara, Ulrich, Alexandre et Anudari. Merci pour votre accueil.

- Ian : pour avoir traversé, avec et pour moi, toute l'Amérique, puis l'Atlantique, puis toute la France. Merci pour les fous rires, ta patience et de m'avoir décomplexée de cet accent qui m'était si pénible. Merci de m'avoir accompagnée un bout de chemin et de m'avoir accueillie comme un membre de ta famille quand j'étais si loin de la mienne. « Fade away ». Je te souhaite le meilleur.

Mes stages hors filières et inter CHU

▪ Chirurgie cardiaque – Rangueil

Une histoire de cœur(s). Merci à Jean Porterie (un chef de clinique hors-pairs), Bertrand Marcheix (un génie de la chirurgie), Christophe Cron (sportif sans limites), Etienne Grunenwald (et les surnoms rigolos) et Daniel Roux (responsable de cette décoration touchante du service), pour m'avoir pris par la main à l'occasion de ce premier semestre pendant lequel je ne comprenais pas grand-chose à l'internat. Merci de m'avoir fait découvrir cette chirurgie que j'ai trouvée si belle, et qui m'a donné goût à la transplantation. J'ai adoré mon semestre dans votre service.

▪ Chirurgie digestive de Carcassonne :

Dr Nini, Dr Labbe, Dr Sondji et le Dr Mercier. Je vous remercie de m'avoir initiée à votre spécialité (même si je crois que la coelioscopie me donnera toujours le mal de mer). Je vous suis également très reconnaissante de m'avoir autorisée à faire ce stage de M1 qui m'a permis – indirectement – de mener à bien ce travail.

▪ Chirurgie Vasculaire - Rangueil

Pr. Chaufour : Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé et pour votre compréhension.
Mr Bossavy, Benoît, Jean, Florian, Grégoire, Alia, Aurélien et Pierre. Merci également à Camille.

▪ Chirurgie Plastique – APHP

Pr Marc Revol : Vous m'avez inspirée durant tout mon internat et je vous en remercie. J'ai toujours en tête la loi de Pareto et ce petit tableau des priorités pour la gestion des tâches et du temps.

Pr Ignacio Garrido : Le PU le plus cool de France et toujours dans les bons plans ! Quand j'y repense, on a presque assisté à une greffe de face ensemble ! La photo est quand même très chouette.

Pr Laurent Lantieri, pour vos avancées passionnantes dans le domaine des VCA.

Mais aussi : L'équipe du service chirurgie plastique de l'HEGP et particulièrement Corentin, Laura et les attachés dont Adrien et Jérémy.

▪ **Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique de PPR**

- Pr. Mansat : Vous m'avez soutenue et relu dans mes travaux universitaires orthopédiques et je vous en remercie. C'est toujours un plaisir de pouvoir faire un bloc avec vous quand l'occasion se présente.

- Dr Rongieres : Je vous remercie pour votre aide m'ayant permis d'accéder au DU de chirurgie de la main lorsque j'étais à Boston et de votre confiance.

- Dr Costel Apredoaei : Pour votre philosophie. Aller au bloc avec vous a été un grand plaisir.

- Dr Stéphanie Delclaux : Je n'ai pas eu l'occasion de passer avec toi (les places sont chères...) mais je te remercie pour tes conseils et ton soutien.

- Arnaud, que j'adore, toujours motivé pour faire la fête, quitte à payer 400 euros pour tapage nocturne et affronter de nouveau la police : « normal ».

- Thomas : Sérieux et investi, c'était un plaisir de travailler avec toi (et aussi pour les yeux).

- Florence : Alors que tu ne me connaissais pas, tu as passé une après-midi entière à m'aider sur des présentations pour le GEM, par pure altruisme. Merci pour ta gentillesse et ta grande expertise.

- Aux secrétaires : notamment Émilie pour ta gentillesse et ton efficacité.

- À tous les autres, pour votre rigueur, discipline et votre humour d'orthopédiste, François, Émilie, Vincent, Louis, Timothée, Rémi, Juliette, Marine, Hugo, Lucéna...et tous les autres.

Aux Parisiennes

- Julie : Une personne qu'on peut appeler vers 1 heure du matin en semaine pour déposer ses bagages à l'improviste et squatter pour une durée indéterminée, j'appelle cela - au moins - une vraie amie. Même si notre petit Pokémon a dit que « Tu vas disparaître », je crois que tu vas exister encore longtemps dans ma vie. Je sais qu'il n'y aura pas besoin de te forcer pour venir sur la Côte d'Azur et je me réjouis déjà de ces apéros sur la plage.

- Anaïs Lemaire : Tout en couleur et avec une énergie débordante ! Merci pour tous ces fous rires lors de mon premier semestre. Tu as l'air de t'éclater dans ta nouvelle vie et c'est beau à voir !

- Nelly : pour avoir partagé ces semis marathons à Rome et à Viennes.

A ceux qui ont rendu ce travail possible :

- **Master 2 :**

Pr. Martinod, un professeur passionné, bienveillant et ouvert d'esprit. Votre programme est excellent et inspirant. Je regrette que nous n'ayons pas pu le faire en présentiel.

Je remercie l'équipe de la Fondation de la vocation Marcel Bleustein-Blanchet avec une mention spéciale pour Sabine que j'espère rencontrer bientôt. Merci à l'équipe de la bourse BNP Paribas & Upec et la fondation de l'Avenir avec Marion Lelouvier à sa tête pour me soutenir à poursuivre ces travaux sur l'ingénierie tissulaire.

- **Master 1 :**

Audrey Varin : Un grand merci pour m'avoir accepté à STROMAlab et imprégnée en quelques semaines de votre rigueur et perfectionnisme. Vous m'avez fait re-travailler mon mémoire jusqu'à ce qu'il soit à la hauteur de vos exigences. Sachez que vos conseils m'ont été utiles dans chaque instant de la rédaction de ce travail.

Alice Prévost, je te remercie de m'avoir pris sous ton aile pendant ce mois de recherche. J'en garde un très bon souvenir et tu n'y es pas pour rien.

Pr. Catros : Merci pour votre réactivité et avoir facilité les démarches vers l'obtention des équivalences inter-faculté.

- Les bibliothèques du monde entier, « mon havre de paix ».
- La France, car même si je ne cache pas mon amour pour les États-Unis, je n'en serais jamais arrivé ici sans l'accessibilité qu'offre notre merveilleux pays aux études (Arthur et Charline, j'imagine votre réjouissance en lisant ces lignes).

À l'équipe de chirurgie plastique de Nice :

Au Docteur Olivier Camuzard, et son équipe, pour cet accueil chaleureux et les projets à venir. J'espère - et je ferais de mon mieux pour - être digne de ta confiance et à la hauteur de tes ambitions.

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

- Albert Einstein -

Abréviations

ATC : Allogreffes de Tissus Composites vascularisés

AVMA: American Veterinary Medical Association

DE/RE : Décellularisation / Recellularisation

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DW : eau déionisée

ELP: Elastin Like Peptide

FBS: Fœtale Bovine Serum

GAG : Glyco-Amino-Glycans

HUVECS: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

H&E : Hématoxyline & Eosine

IF : ImmunoFluorescence

IHC : ImmunoHistoChimie

IPSC-EC : Cellules Souches Pluripotentes Induites dérivées en Cellules Endotéliales

LFC : Lambeau Fascio Cutané

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MGH : Massachusetts General Hospital

MT : Masson Trichrome

PBS : Phosphate Buffer Saline

SEM : Erreur standard de la moyenne

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Tri : Triton X-100

Sommaire

I. Introduction	33
II. Matériels et méthodes	35
A. Expérience chez le rongeur	35
1. Technique chirurgicale.....	35
2. Technique de décellularisation.....	36
3. Quantification d'ADN.....	38
4. Analyse macroscopique au microscope à balayage.....	39
5. Analyses spécifiques dans le groupe sélectionné.....	40
6. Transplantation.....	41
B. Expérience chez le porc	42
1. Technique chirurgicale.....	42
2. Technique de décellularisation.....	43
3. Quantification d'ADN.....	45
4. Prélèvements des échantillons et analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence.....	45
5. Quantification des composants de la matrice extra cellulaire.....	47
6. Évaluation du réseau vasculaire et morphologique.....	47
7. Recellularisation <i>in vitro</i>	48
C. Expérience chez l'homme	49
1. Technique chirurgicale.....	49
2. Technique de décellularisation.....	51
3. Prélèvements des échantillons et analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence.....	53
4. Quantification d'ADN.....	54
5. Quantification des composants de la matrice extra cellulaire.....	54
6. Evaluation du système vasculaire et morphologique.....	54
7. Test des propriétés mécaniques.....	55
8. Recellularisation <i>in vitro</i>	56
D. Etude immunologique in vivo	56
E. Analyse statistique	60
IV. Résultats	61
A. Expérience chez le rongeur	61
1. Aspect macroscopique.....	61
2. Clairance cellulaire et ADN résiduel.....	61
3. Analyse au microscope à balayage.....	62
4. Analyses spécifiques dans le groupe sélectionné.....	63
5. Transplantation <i>in vitro</i>	65
B. Expérience chez le porc	66
1. Aspect macroscopique.....	66
2. Clairance cellulaire et ADN résiduel.....	66
3. Analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence.....	67
4. Evaluation du système vasculaire et morphologique.....	70
5. Analyse spécifique dans le groupe sélectionné.....	71
6. Recellularisation <i>in vitro</i>	74
C. Expérience chez l'homme	75
1. Aspect macroscopique.....	75
2. Clairance cellulaire et ADN résiduel.....	77
3. Analyses histologiques, immunohistochimiques et immunofluorescentes.....	80

4.	Evaluation du réseau vasculaire et morphologique	85
5.	Test des propriétés mécaniques.....	87
6.	Recellularisation in vitro	89
D.	Biocompatibilité in vivo	90
1.	Clinique.....	90
2.	Détermination des cellules B	90
3.	Détermination des cellules T.....	91
V.	<i>Discussion</i>	92
VI.	<i>Conclusion et perspectives</i>	97
VII.	<i>Références bibliographiques</i>	99
VII.	<i>Annexes</i>.....	103
	Annexe 1 : Checklist du prélèvement de face	103
	Annexe 2 : Protocole de prélèvement du bas abdomen humain.	104
	Annexe 3 : Justification des analyses histologiques réalisées et non réalisées.	105
	Annexe 4 : Zones de prélèvement des échantillons pour les analyses histologiques et ADN du greffon de bas abdomen.....	106
	Annexe 5 : Liste des financements et des prix	106

Figures

Figure 1. Membre inférieur de rat prélevé.	36
Figure 2. Processus de décellularisation des membres postérieurs de rats.	37
Figure 3. Schéma chronologique du processus de décellularisation des membres inférieurs de rats selon le groupe de traitement. a. Groupe traité en immersion dans le SDS 1 % b. Groupe traité au SDS 1 % c. Groupe traité au SDS 0,2 %.....	38
Figure 4. Zones d'analyse des membres inférieurs de rats.	39
Figure 5. Prélèvement du lambeau saphène.	43
Figure 6. Installation du système de décellularisation des LFC.....	44
Figure 7. Schéma chronologique du processus de décellularisation des LFC selon le groupe de traitement.....	45
Figure 8. Prélèvement du greffon facial de cadavre humain. a. Cadavre pendant la dissection. b. Cadavre après la dissection. c. Greffon facial prélevé – Vue interne. d. Greffon facial prélevé – Vue externe.....	50
Figure 9. Greffon de bas abdomen humain après prélèvement.	50
Figure 10. Processus de décellularisation du greffon de face humaine.	51
Figure 11. Schéma chronologique du processus de décellularisation des greffons faciaux traités au SDS 1%.....	52
Figure 12. Installation en cours du processus de décellularisation du greffon de bas abdomen humain.....	52
Figure 13. Échantillons soumis au test de traction.	56
Figure 14. Etape de la procédure chirurgicale pour l'analyse de sensibilisation in vivo.....	57
Figure 15. Aspect macroscopique des membres inférieurs postérieurs de rat selon les groupes de traitement.	61
Figure 16. Quantification de l'ADN dans les membres postérieurs de rat à la fin du processus de décellularisation.....	62
Figure 17. Surface dermique des échantillons de greffon faciaux au microscope à balayage.	62
Figure 18. Coupes des échantillons de greffon de membre postérieur colorés au H&E.....	63
Figure 19. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.....	64
Figure 20. Contenu en collagène dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	64
Figure 21. Analyse angiographique dans les membres postérieurs de rat.	65
Figure 22. Transplantation orthotopique d'un membre postérieur de rat décellularisé.	65
Figure 23. Aspect macroscopique des lambeaux porcins avant et après décellularisation. a. Groupe traité par du SDS 1%. b. Groupe traité par du SDS 0,1%. c. Groupe traité par du SDS 0,2%. Images à gauche de chaque groupe : Face dorsal. Images à droite de chaque	

groupe : Face ventral. Images de la rangée supérieure : lambeaux natifs. Images de la rangée inférieure : lambeaux après décellularisation	66
Figure 24. Quantification de l'ADN dans les LFC à la fin du processus de décellularisation dans les différents groupes.	67
Figure 25. Coupes colorées à l'H&E dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.a. Groupe traité par du SDS 1%. b. Groupe traité par du SDS 0.1%. c. Groupe traité par du SDS 0.2%.	68
Figure 26. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.....	69
Figure 27. Contenu en collagène dans les LFC décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.....	70
Figure 28. Analyse angiographique dans les LFC décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	71
Figure 29. Coupes des échantillons de lambeaux porcins colorés au MT.	72
Figure 30. Surface des échantillons de lambeaux porcins au microscope à balayage.	72
Figure 31. Contenu en collagène dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	73
Figure 32. Recellularisation in vitro dans les échantillons de lambeaux porcins acellulaires.	74
Figure 33. Dé-épithélialisation au cours du processus de décellularisation.....	75
Figure 34. Aspect macroscopique après décellularisation du greffon facial.....	75
Figure 35. Aspect macroscopique des oreilles prélevées sur cadavre.....	76
Figure 36. Aspect macroscopique du greffon de bas abdomen après décellularisation.....	76
Figure 37. Quantification de l'ADN dans les greffons faciaux à la fin du processus de décellularisation.	77
Figure 38. Quantification de l'ADN journalière dans un greffon facial au cours du processus de décellularisation. La concentration est exprimée en ng/mg de poids sec pour la teneur en ADN.	78
Figure 39. Quantification de la teneur en ADN dans le cartilage et le tissu osseux à la fin du processus de décellularisation.	79
Figure 40. Quantification de la teneur en ADN dans le greffon de bas abdomen à la fin du processus de décellularisation.	79
Figure 41. Coupes des échantillons de greffon faciaux acellulaires colorés à l'H&E.	80
Figure 42. Coupes des échantillons de greffon faciaux acellulaires colorés au MT.....	80
Figure 43. Coupes des échantillons de greffon faciaux traités avec différentes colorations. A gauche : échantillons natifs.	81
Figure 44. Contenu en collagène dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	82
Figure 45. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.....	82

Figure 46. Contenu en facteurs de croissance dans les échantillons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	84
Figure 47. Contenu en collagène dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	84
Figure 48. Contenu en GAG dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.	85
Figure 49. Angiographie des greffons de faces.	85
Figure 50. Surface dermique des échantillons de greffon faciaux au microscope à balayage.	86
Figure 51. Injection vasculaire de microfil dans les greffons de faces acellulaires montrant le réseau microvasculaire.	86
Figure 52. Angiographie du greffon de bas abdomen.	87
Figure 53. Propriété mécanique au test de traction.	88
Figure 54. Recellularisation in vitro dans les échantillons de matrices acellulaires faciales... ..	89
Figure 55. Aspect clinique à la fin de l'étude de biocompatibilité.	90
Figure 56. Analyse des cellules lymphocytaires B.	90
Figure 57. Analyse des cellules lymphocytaires T.	91

I. Introduction

La décellularisation/recellularisation (DE/RE) représente une voie prometteuse pour surmonter certains défis actuels de la transplantation, notamment la pénurie de tissus et les séquelles à long terme de l'immunosuppression chronique (1-3).

La décellularisation d'organes a été popularisée en 2008 par une équipe du Massachusetts General Hospital (MGH) avec la décellularisation d'un cœur humain (4). Différents organes et structures ont ensuite été traités, tel que le poumon (4, 5), le foie (6), le pancréas (7), l'intestin (8), des tendons, des ligaments et de l'os (9). Cette technologie vise à produire une matrice biologique acellulaire, supposée non immunogène, qui peut subir une recellularisation autologue et être ensuite transplantée de manière à restaurer, maintenir ou améliorer la fonction du tissu ou de l'organe. Ces matrices peuvent potentiellement être repeuplées avec des cellules dérivées du patient, ce qui atténue ou élimine le besoin d'immunosuppression (10).

Le processus de décellularisation permet l'élimination des cellules natives tout en préservant la matrice extracellulaire (MEC). Le seuil d'ADN < 50 ng/mg est suggéré comme la norme de référence pour les tissus décellularisés (1). La matrice 3D naturelle qui en résulte offre de nombreux avantages par rapport aux structures synthétiques. Ces avantages incluent la préservation de l'architecture du tissu natif, qui est souvent difficile et coûteuse à créer à grande échelle, et la préservation du réseau vasculaire, qui est actuellement impossible à reproduire à l'aide d'autres techniques. La MEC contient également des facteurs de croissance et des cytokines qui facilitent la fixation et la prolifération des cellules et elle conserve les propriétés biochimiques, physiques et biomécaniques propres au spécimen natif, qui permettent le remodelage des tissus après l'implantation (10, 11). Une fois les cellules d'origine retirées, la recellularisation consiste à repeupler le tissu décellularisé afin de rendre la matrice viable et transplantable.

Alors que la décellularisation et la recellularisation (DE/RE) ont montré un grand potentiel dans la transplantation d'organes solides (12), la DE/RE pour les allogreffes de tissus composites (ATC) n'a été étudiée que récemment (13).

L'ATC englobe le transfert de plusieurs tissus tels que le muscle, le tendon, le cartilage, l'os, le nerf et la peau, sous la forme d'une unité fonctionnelle (par exemple, une main ou une

face). L'ATC est apparue comme une option réalisable pour restaurer des défauts anatomiquement complexes qui ne peuvent être traités par une chirurgie autologue (14). Étant donné que les ATC permettent, le plus souvent, d'améliorer la vie plutôt que de la sauver, l'application réussie des techniques de DE/RE à l'ATC serait cruciale car cette technologie pourrait potentiellement éviter la nécessité d'une immunosuppression à vie, un facteur particulièrement limitant pour les procédures programmées telles que les ATC (15). Effectivement, l'expérience acquise depuis la première greffe de main avec succès en 1998 (16), de face en 2005 (17) et de la retransplantation de face en 2018 (18) a mis en évidence le problème majeur de rejet chronique et l'absence de traitement efficace.

Pour contourner la nécessité d'immunosuppression et faciliter l'accès aux greffons, nous avons développé et optimisé des modèles de matrices de tissus décellularisés chez le rat, le porc et l'homme. Les résultats les plus prometteurs en termes de fonctionnalité d'organes décellularisés ayant été obtenu chez le rat (19), un modèle d'allogreffes de tissus composites chez le rongeur nous a semblé indispensable à développer (membre postérieur de rat). Notre étude d'optimisation sur le tissu porcine se basait sur les travaux de Jank et al. au MGH en 2017 (20) qui permettaient la décellularisation de lambeaux porcins grâce à une perfusion de SDS 1% par le pédicule vasculaire. Finalement, nos études d'optimisation sur le tissu humain se basaient sur les travaux de Duisit et al. en 2017 (21) qui décrivaient une face décellularisée grâce à une perfusion par le pédicule vasculaire de SDS 1%.

Les approches actuelles de décellularisation utilisent un traitement détergent fort et sont confrontées à la nécessité de trouver un équilibre entre l'élimination complète des cellules et la perturbation minimale de la structure et de la fonction de la MEC (causée par les détergents) (22). En outre, il a été démontré que le SDS résiduel peut avoir un effet nocif, dépendant de la dose et du temps d'exposition, sur les tissus décellularisés (23).

Nos protocoles de décellularisation visaient ainsi à être les moins agressifs possibles pour la MEC, tout en étant efficaces. Après analyses en détail de ces matrices, des essais de recellularisation *in vitro* et de transplantation *in vivo* ont été menés chez certains spécimens afin d'établir les potentiels et limites de nos protocoles.

II. Matériels et méthodes

A. Expérience chez le rongeur

1. Technique chirurgicale

Toutes les procédures chirurgicales ont été approuvées par l'Institutional Animal Care and Use Committee du Massachusetts General Hospital. Les rats Lewis ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane. L'induction a été administrée à 5 % d'isoflurane dans la chambre d'induction. Le maintien a ensuite été réalisé avec une inhalation d'isoflurane à 1,5-3 % à travers un cône respiratoire. Le site chirurgical a été rasé, traité avec une crème dépilatoire, frotté et champé avec des champs stériles. L'anesthésie totale a été confirmée par un test de pincement des orteils avant l'incision et régulièrement pendant la procédure. Les fréquences cardiaque et respiratoire ont été surveillées tout au long de la procédure. Pour toutes les interventions chirurgicales, les conditions stériles ont été pleinement respectées en utilisant des instruments, des fournitures, des draps et des gants stériles.

Le prélèvement du membre postérieur du donneur a été fait par une incision de 2,5 cm dans le pli inguinal. La dissection du coussinet adipeux inguinal et sa rétraction distale permettaient d'exposer les vaisseaux fémoraux. On utilisait ensuite un crochet pour rétracter le ligament inguinal et une pince de serrage pour maintenir le coussinet adipeux inguinal en position distale. La dissection des vaisseaux fémoraux était faite en individualisant les branches de Murphy (branches collatérales musculaires profondes généralement situées à mi-chemin entre le ligament inguinal et la branche épigastrique) et en les ligaturant avec des attaches en nylon 8/0. Le rat donneur était ensuite hépariné avec 3000 UI d'héparine injectée dans la veine dorsale du pénis à l'aide d'une aiguille 27,5G. L'incision était complétée autour de la hanche. Les muscles de la cuisse étaient cautérisés à l'aide d'une pince bipolaire et le nerf sciatique était cautérisé et coupé à mi-fémur. Le fémur était exposé proximalelement au niveau de la crête fémorale postérieure (les muscles adducteurs et quadriceps étaient laissés en dehors du prélèvement). Le pédicule innomé était préservé.

Les vaisseaux fémoraux étaient ligaturés avec des fils en nylon 8/0 au niveau du ligament inguinal. Une artériotomie sur l'artère fémorale, juste en-dessous de la ligature, permettait

l'insertion d'un angio-cathéter 24G. Le muscle restant sous le pédicule était cautérisé et coupé, exposant la face antérieure du fémur. Le fémur était coupé à l'aide d'un coupe-os aussi proximale et distale que possible (mi-longueur). Le membre postérieur partiel était ensuite rincé avec 2 ml de solution saline héparinée (100 UI/ml) pour obtenir un écoulement veineux clair et conservé sur glace dans une compresse stérile jusqu'au début du processus de décellularisation (Figure 1).



Figure 1. Membre inférieur de rat prélevé.

2. Technique de décellularisation

Afin de tester différents protocoles de décellularisation, trois groupes d'études qui diffèrent par la méthode de décellularisation (par immersion ou par perfusion) et par la concentration de SDS (1 % et 0,2 %) perfusée par le pédicule vasculaire ont été constitués.

Dans chaque groupe d'études, 3 membres inférieurs de rats étaient analysés.

2.1 Matériel de perfusion :

Ce système de perfusion comprend une pompe à rouleaux délivrant un débit continu (07522-20 DRIVE MFLEX L/S 600RPM 115/230, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, États-Unis) et une tubulure pré-stérilisée de taille 16 (Masterflex® L/S Platinum-Cured Silicone Tubing, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, États-Unis). Un capteur de pression était connecté sur la tubulure d'entrée en dérivation avec le cathéter artériel (BD Angiocath 24G, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). Un récipient en plastique servait de réservoir à perfusât. Le membre était aussi placé dans un contenant rempli de perfusât (Figure 2). Ce perfusât servant pour l'immersion était changé toutes les douze heures. Le capteur de pression était relié directement à la pompe pour ajuster le débit permettant de maintenir une pression vasculaire autour de 90 mmHg tout au long de la perfusion.



Figure 2. Processus de décellularisation des membres postérieurs de rats.

2.2 Protocole de perfusion-décellularisation :

La première étape de la perfusion consistait à perfuser du PBS durant environ une heure pour vérifier le bon fonctionnement de notre système et éliminer tout résidu sanguin avant de perfuser avec le détergent. Puis nous perfusions avec du SDS pour débuter la décellularisation. Dans le groupe 1 %, le SDS était utilisé à la concentration de 1 % et dans le groupe 0,2 %, le SDS était utilisé à la concentration de 0,2 %. Ce premier détergent était perfusé durant 120 heures puis nous réalisons un premier lavage de 24 heures en perfusant de l'eau déionisée. Ensuite nous initiions la perfusion par le Triton X-100 1 % pour terminer la décellularisation et éliminer le SDS restant dans les tissus. Enfin, nous rincions nos tissus et éliminons les détergents restants par une perfusion de 48 heures de PBS (Figure 3).

2.3 Protocole d'immersion :

La première étape consistait à immerger le membre dans du PBS durant environ une heure pour vérifier le bon fonctionnement de notre système et éliminer tout résidu sanguin. Nous mettions ensuite en immersion le membre avec du SDS 1 % pour débuter la décellularisation durant 120 heures puis nous réalisons un premier lavage de 24 heures en plaçant le membre dans de l'eau déionisée. Ensuite nous initiions l'immersion dans du Triton X-100 1 % pour terminer la décellularisation. Enfin nous rincions nos tissus et éliminons les détergents restants par une immersion pendant 48 heures dans du PBS (Figure 3).

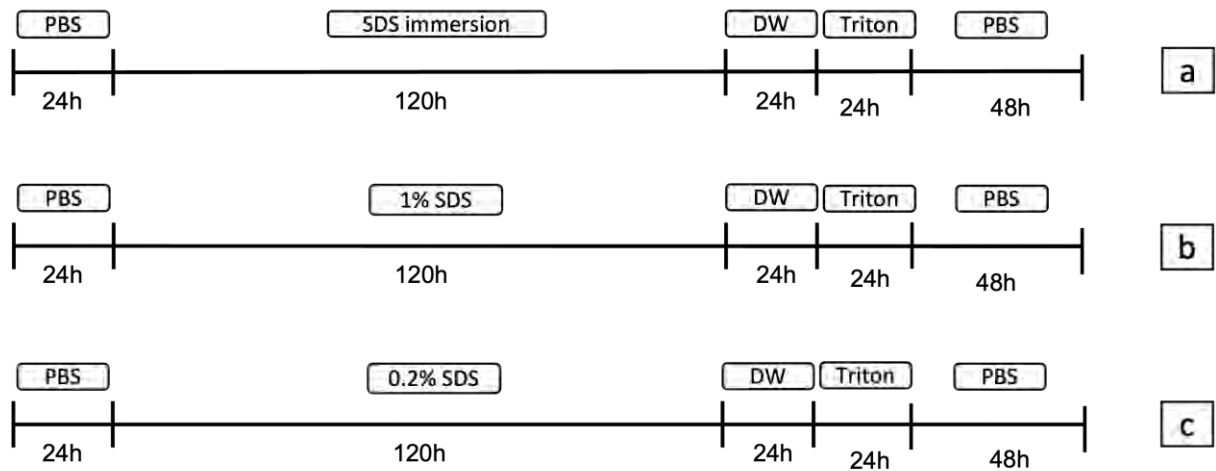


Figure 3. Schéma chronologique du processus de décellularisation des membres inférieurs de rats selon le groupe de traitement. a. Groupe traité en immersion dans le SDS 1 % b. Groupe traité au SDS 1 % c. Groupe traité au SDS 0,2 %.
DW : eau déionisée / Tri : Triton X-100 1%

Une dé-épithélialisation manuelle (à la pince) était réalisée à partir de J2. Avant l'analyse des tissus, chaque membre a été examiné pour vérifier la présence d'épiderme et de phanère, le blanchiment et la morphologie.

3. Quantification d'ADN

Pour les membres inférieurs des trois groupes d'études, l'ADN d'échantillons d'épiderme, de tissu sous-cutané et de muscles des échantillons décellularisés et natifs, a été analysé avec le kit DNeasy Blood & Tissue (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US). En bref, les tissus ont été incubés pendant la nuit à 56°C avec une solution de protéinase K (40 mAU/mg de protéines). Après avoir ajouté du tampon et de l'éthanol, le mélange a été transféré sur une colonne de spin remplie de tampons et des éluions répétées ont été effectuées. L'ADN purifié de chaque échantillon a ensuite été quantifié à l'aide du Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US) conformément au protocole du fabricant. La valeur finale a été exprimée en ng d'ADN par mg de poids humide de tissu.

Les zones de prélèvement d'échantillons des membres postérieurs de rats pour les analyses d'ADN sont schématisées en [Figure 4](#) (zone cutanée, 1, 2, et 3).

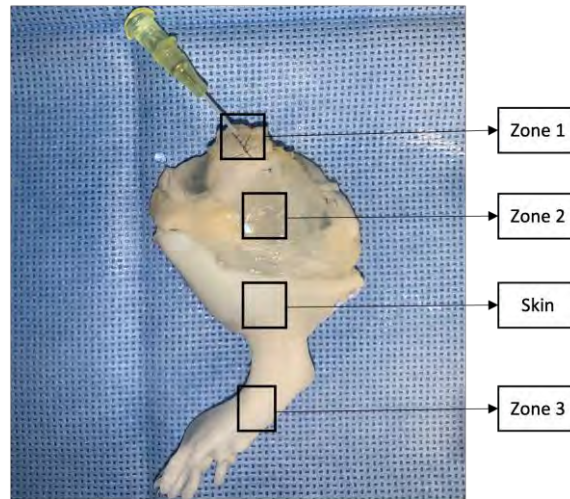


Figure 4. Zones d'analyse des membres inférieurs de rats.

4. Analyse macroscopique au microscope à balayage

Pour tous les membres postérieurs de rat de tous les groupes d'études, la microscopie électronique a été réalisée au Schepens Eye Institute core facility soutenu par le NIH National Eye Institute Core Grant #P30EY003790. En bref, les échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol graduées et séchés au point critique à l'aide d'un séchoir à point critique Samdri 795 (Tousimis, Rockville, Md USA), puis montés sur des socles d'aluminium et chromés à l'aide d'une coucheuse à faisceau ionique haute résolution Gatan (Gatan Inc, Pleasanton, CA USA). Différentes surfaces des échantillons ont été imagées à l'aide d'un microscope électronique à balayage à émission de champ JEOL JSM-7401F (JEOL Inc, Peabody, MA USA) permettant une évaluation qualitative de l'architecture de la matrice acellulaire.

5. Analyses spécifiques dans le groupe sélectionné

5.1 Analyses histologiques

▪ *Prélèvements des échantillons*

Les zones de prélèvements d'échantillon des membres inférieurs de rats pour les analyses histologiques sont schématisées en Figure 4 (zone cutanée, 1, 2, et 3).

▪ *Extraction en paraffine*

Les échantillons de tissu natif et acellulaire ont été fixés au formol tamponné neutre à 10% pendant 24 h, déshydratés, inclus en paraffine et micro sectionnés en tranche de 5 µm.

▪ *Coloration histologique*

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées. Nous avons utilisé les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) pour l'analyse architecturale des échantillons.

5.2 Évaluation du système vasculaire

Uniquement sur des échantillons de membres postérieurs de rats décellularisés appartenant au groupe sélectionné, et avant le prélèvement des échantillons, un agent de contraste (Visipaque, GE Healthcare) mélangé à une solution saline normale (1:2) a été injecté dans le pédicule artériel à l'aide d'une pression constante de la seringue, pour le greffon natif avant décellularisation et pour le membre après décellularisation. Un agent de contraste (Visipaque, GE Healthcare) mélangé à une solution saline normal (1:2) a été injecté dans le pédicule artériel à l'aide d'une pression constante de la seringue, pour le greffon natif avant décellularisation et pour le greffon après décellularisation (mais avant le prélèvement des échantillons pour préserver l'intégrité vasculaire).

L'acquisition d'images a été réalisée avec un Powermobil C-Arm (Siemens, Munich, Allemagne). Les images ont été exportées au format DICOM et visualisées à l'aide du logiciel Osirix (Pixmeo, Bernex, Suisse).

6. Transplantation

Pour montrer que les greffes de tissus composites peuvent être utilisées pour la reconstruction chirurgicale après la perte d'un membre, nous avons réalisé des transplantations orthotopiques de membres. Deux membres décellularisés (n=2) ont été transplantés sur des rats Lewis en utilisant une technique microchirurgicale standard pour les anastomoses vasculaires.

Lors de la chirurgie du receveur, avant l'incision, le rat était rasé à l'arrière du cou afin de permettre l'administration de la buprénorphine 0,1 mg/kg par voie sous-cutanée. Le rat était positionné couché sur un coussin chauffant. Une incision de 2,5 cm dans le pli inguinal permettait de disséquer le coussinet adipeux inguinal et de l'incliner distalement pour exposer les vaisseaux fémoraux. Un crochet permettait de rétracter le ligament inguinal et une pince de serrage permettait de maintenir le coussinet adipeux inguinal en position distale. Les vaisseaux fémoraux étaient disséqués et les branches Murphy individualisées et ligaturées avec des fils de nylon 8/0.

Les deux vaisseaux étaient sectionnés au-dessus des vaisseaux épigastriques en utilisant des fils en nylon 8/0. Les extrémités des vaisseaux étaient dilatées et rincées avec une solution saline héparinée. L'incision était complétée autour de la hanche. Les muscles de la cuisse étaient cautérisés à l'aide d'une pince bipolaire et le nerf sciatique était cautérisé et coupé à mi-fémur. Le fémur était exposé proximalelement au niveau de la crête fémorale postérieure. Le muscle restant sous le pédicule était cautérisé et coupé, exposant la face antérieure du fémur. Le fémur était coupé à l'aide d'un coupe-os aussi proximalelement et distalement que possible (mi-longueur). Le membre de rat donneur décellularisé était rapproché pour le transfert microvasculaire. Puis les vaisseaux fémoraux du greffon étaient anastomosés aux vaisseaux fémoraux du receveur. Les anastomoses veineuses et artérielles étaient réalisées à l'aide de sutures en nylon 10/0 (8 à 9 sutures sont généralement nécessaires pour l'anastomose veineuse, 6 sutures en moyenne pour l'anastomose artérielle). Les deux clamps microchirurgicaux étaient relâchés afin d'observer la revascularisation du membre. Un test de perméabilité sur les deux vaisseaux (Test de Patency) permettait d'évaluer la perméabilité de chaque anastomose.

B. Expérience chez le porc

1. Technique chirurgicale

Des porcs Yorkshire femelles ont été utilisés pour cette étude. Les animaux ont été hébergés au Centre de recherche en biologie de la transplantation conformément au Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Toutes les procédures chirurgicales ont été approuvées par l'Institutional Animal Care and Use Committee du Massachusetts General Hospital.

Tous les prélèvements ont été réalisés sur des porcs vivants, sous anesthésie générale dans le bloc opératoire du Knight Surgery Research Laboratory situé au sein du Massachusetts General Hospital. Un lambeau était prélevé de chaque côté sur chaque porc donneur. L'anesthésie des animaux était induite au Telazol et maintenue avec une inhalation d'Isoflurane à 2% avec de l'oxygène. Le site opératoire était préparé par une déterision à la Bétadine alcoolique et champé de manière stérile. En fin d'intervention le porc était euthanasié conformément aux directives de l'American Veterinary Medical Association (AVMA) pour l'euthanasie des animaux. Une vidéo de la technique chirurgicale a été réalisée (Opérateur A.G Lellouch / Film et montage : E. Lupon).

Le lambeau saphène est un lambeau fascio-cutané (LFC) vascularisé par le pédicule saphène, branche collatérale de l'artère fémorale externe (analogue de l'artère fémorale superficielle chez l'homme). Le pédicule saphène est la collatérale de la fémorale qui après sa naissance traverse le muscle gracilis pour devenir sous-facial environ 3 cm sous le pli inguinal. Les branches fascio-cutanées naissent directement du pédicule principal.

Pour dessiner le lambeau, on repère par palpation le trajet des vaisseaux saphènes puis l'on trace un patch cutané arrondi d'environ 12 cm de large sur la face médiale du genou centré sur ce pédicule avec pour limite supérieure le creux inguinal et la patella comme limite latérale (Figure 5a). Chirurgicalement, on débute par l'incision de la partie distale du LFC pour repérer notre pédicule et le ligaturer distalement. On poursuit par l'incision cutanée de l'ensemble du LFC qui est immédiatement suturé au fascia sous-jacent au Monocryl 3-0 pour maintenir la continuité fascio-cutanée.

On prélève ensuite progressivement le LFC en suivant le pédicule saphène qui plonge dans le muscle gracilis à environ 3 cm du pli inguinal (Figure 5b). On poursuit la dissection intramusculaire jusqu'aux vaisseaux fémoraux. Pour augmenter la longueur du pédicule, une dissection jusqu'aux vaisseaux fémoraux sur toute leur longueur est réalisée (Figure 5c).

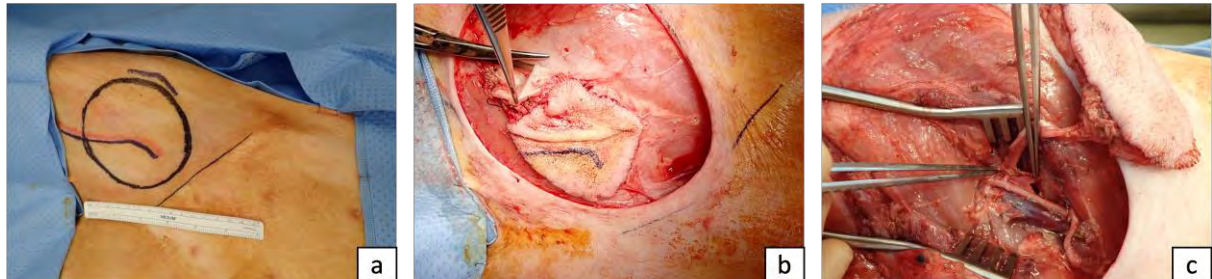


Figure 5. Prélèvement du lambeau saphène.

a. Dessin du lambeau. b. Lambeau levé sur son pédicule. c. Dissection étendue jusqu'au pédicule fémoral.

Une injection intraveineuse d'héparine 100 UI/kg était réalisée 5 minutes avant la ligature des vaisseaux fémoraux au fil de soie 2-0, au-dessous du ligament inguinal. Une fois le lambeau libre prélevé, l'artère fémorale était canulée avec un angiocathéter 20G et le lambeau était rincé avec 100ml de sérum hépariné avant d'être stocké dans un sac à organes stérile dans la glace le temps d'être transporté au Shriners Hospital for Children où était réalisée la décellularisation.

2. Technique de décellularisation

Afin de tester différents protocoles de décellularisation, trois groupes d'études qui diffèrent par la concentration de SDS perfusée par le pédicule vasculaire ont été constitués (1%, 0,2% et 0,1%).

2.1 Matériel de perfusion :

Ce système de perfusion comprend une pompe à rouleaux délivrant un débit continu (07522-20 DRIVE MFLEX L/S 600RPM 115/230, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, États-Unis), une tubulure pré-stérilisée de taille 16 (Masterflex® L/S Platinum-Cured Silicone Tubing, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, États-Unis).

Un capteur de pression était connecté sur la tubulure d'entrée en dérivation avec le cathéter artériel (BD Angiocath 20G, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). Un récipient en plastique sert de réservoir à perfusât. Le lambeau était aussi placé dans un contenant rempli de perfusât. Ce perfusât servant pour l'immersion était changé toutes les douze heures. Le capteur de pression était relié directement à la pompe pour ajuster le débit permettant de maintenir une pression vasculaire autour de 90 mmHg tout au long de la perfusion (Figure 6).

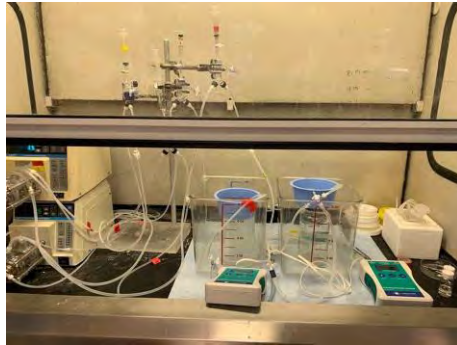


Figure 6. Installation du système de décellularisation des LFC.

2.2 Protocole de perfusion-décellularisation :

Dans chaque groupe d'étude, 3 lambeaux étaient analysés. La première étape de la perfusion consistait à perfuser du PBS durant une heure environ pour vérifier le bon fonctionnement de notre système et éliminer tout résidu sanguin avant de perfuser avec le détergent. Lorsque ce contrôle était positif, nous perfusions avec du SDS pour débiter la décellularisation. Dans le groupe 1 %, le SDS était utilisé à la concentration de 1 %. Dans le groupe 0,1 %, le SDS était utilisé à la concentration de 0.1 %. Enfin, le SDS était utilisé à la concentration de 0,2 % dans le groupe 0,2 %. Ce premier détergent était perfusé durant 120 heures puis nous réalisons un premier lavage de 24 heures en perfusant le l'eau déionisée. Ensuite nous initions la perfusion par le Triton X-100 1% pour terminer la décellularisation et éliminer le SDS restant dans les tissus (le Triton à la capacité de dissoudre le SDS). Enfin nous rincions nos tissus et éliminions les détergents restants par une perfusion de 48 heures de PBS (Figure 7).

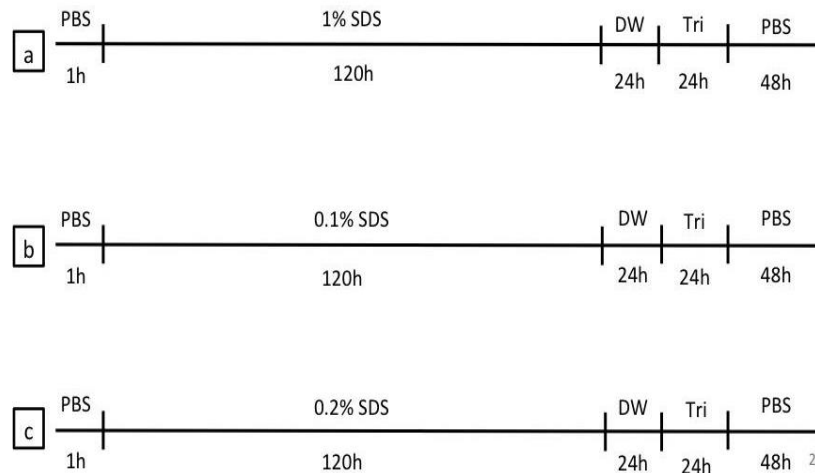


Figure 7. Schéma chronologique du processus de décellularisation des LFC selon le groupe de traitement. a. Groupe traité au SDS 1 % b. Groupe traité au SDS 0,1 % c. Groupe traité au SDS 0,2 %.

DW : eau déionisée / Tri : Triton X-100 1%

Une dé-épithélialisation manuelle (à la pince) était réalisée à partir de J2. Avant l'analyse des tissus, chaque greffon a été examiné pour vérifier la présence d'épiderme et de phanères, le blanchiment et la morphologie.

3. Quantification d'ADN

Pour les lambeaux des trois groupes d'études, l'ADN d'échantillons d'épiderme et de tissu sous-cutané des lambeaux décellularisés et natifs, en périphérie et au centre des lambeaux décellularisés a été réalisée selon la même méthode précédemment décrite avec le kit DNeasy Blood & Tissue (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, US).

4. Prélèvements des échantillons et analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence

4.1 Prélèvements des échantillons

Pour les lambeaux des trois groupes d'études, des colorations à l'H&E ont été réalisées et le contenu en GAG et en collagène a été évalué au niveau de l'épiderme et du tissu sous-cutané des lambeaux décellularisés et natifs, en périphérie et au centre des lambeaux décellularisés.

Uniquement dans le groupe sélectionné, des colorations au trichrome de Masson, DAPI, au bleu alcian et à la safranine O selon les protocoles standards ont été réalisées. Dans ce groupe, l'IHC a permis l'évaluation du composant MHC type I et l'IF du contenu en collagène de type I, en collagène de type II et en collagène de type IV. La présence de l'alpha-Gal épitope (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R), le principal antigène provoquant le rejet hyperaigu des xénogreffes porcines chez les primates, a également été évaluée dans ce groupe d'intérêt.

4.2 Extraction en paraffine

Les échantillons de tissu natif et acellulaire ont été fixés au formol tamponné neutre à 10% pendant 24 h, déshydratés, inclus en paraffine et micro sectionnés en tranche de 5 µm.

4.3 Coloration histologique

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées. Nous avons utilisé les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), au trichrome de Masson (MT), au bleu alcian et à la safranine O selon les protocoles standard.

4.4 Immunohistochimie (IHC)

Après déparaffinisation, les lames ont été soumises à une récupération d'antigène par chauffage à 98°C pendant 60 minutes dans un tampon citrate 10 mM, à pH 5,7. Les peroxydases endogènes ont été inhibées en utilisant 1 % de H₂O₂ et les sites antigéniques non spécifiques ont été neutralisés avec du sérum de chèvre 1:50. Les échantillons ont été incubés à 4°C pendant la nuit, en utilisant les anticorps primaires : anti-MHC type I (ab134189, 1:200, Abcam, Cambridge, UK).

4.5 Immunofluorescence (IF)

Les coupes fixées au formol et déparaffinées ont été refroidies avec du NaBH₄ (1:100), puis soumises à une extraction d'antigène par chauffage à 98°C pendant 60 minutes dans un tampon citrate 10 mM, pH 5,7. Les échantillons ont été incubés à 4°C pendant la nuit avec les anticorps primaires suivants : anti-collagène de type I (ab34710, 1:250, Abcam), anti-collagène de type II (ab34712, 1:200, Abcam) et anti-collagène de type IV (ab6586, 1:500, Abcam). La neutralisation des sites non spécifiques a été effectuée avec du PBS contenant 5 % de BSA.

Pour la coloration fluorescente, l'anticorps secondaire marqué avec Alexa Fluor 488 (IgG de chèvre anti-lapin ou anti-souris, 1:300, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) a été utilisé et les noyaux ont été colorés avec de l'alcool à 4 %. Les noyaux ont été colorés avec 4'-6-diamidino-2-phényl-indole (DAPI, 1:1000) et montés avec le milieu de montage fluorescent DAKO (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

5. Quantification des composants de la matrice extra cellulaire

À l'aide d'un punch de biopsie chirurgicale de 3 mm, des échantillons acellulaires et natifs cutanés et graisseux ont été prélevés au centre et en périphérie des greffons pour chacune des analyses. La teneur en collagène total a été mesurée à l'aide du kit de collagène total (QuickZyme Biosciences, Leiden, Pays-Bas), la teneur en glycosaminoglycanes (GAG) a été mesurée par un test colorimétrique suivant un protocole modifié par Farndale et al. (24).

L'analyse des facteurs de croissance a été faite à partir du kit RayBio® Swine Growth Factor Antibody Array G-Series 1 (RayBiotech Life, GA, USA) en suivant les recommandations du fabricant.

6. Évaluation du réseau vasculaire et morphologique

Pour tous les lambeaux de tous les groupes d'études, et avant le prélèvement des échantillons, un agent de contraste (Visipaque, GE Healthcare) mélangé à une solution saline normale (1:2) a été injecté dans le pédicule artériel à l'aide d'une pression constante de la seringue, pour le greffon natif avant décellularisation et pour le lambeau après décellularisation. L'acquisition d'images a été réalisée selon une procédure similaire à celle utilisée pour les échantillons de rat.

Uniquement sur des échantillons de lambeaux décellularisés appartenant au groupe sélectionné, la microscopie électronique a été réalisée au Schepens Eye Institute core facility soutenu par le NIH National Eye Institute Core Grant #P30EY003790. La technique est similaire à celle utilisée pour les échantillons de rat.

7. Recellularisation *in vitro*

L'ensemencement de nos échantillons par les cellules fibroblastiques était réalisé par un **ensemencement statique**. Pour cela nous injectons manuellement nos cellules fibroblastiques à travers l'échantillon. Ainsi, 1×10^5 fibroblastes dermiques humains ont été ensemencés sur des échantillons de lambeaux décellularisés de $0,5 \text{ cm}^2$ du groupe sélectionné.

Stérilisation : Les échantillons décellularisés de $0,5 \text{ cm}^2$ ont été stérilisés au préalable. La stérilisation était réalisée en immergeant sous agitation les échantillons décellularisés dans du PBS 5% associé à de l'acide acétique à 0,1% pendant 48 heures.

Lignée cellulaire et média : Nous avons utilisé des cellules fibroblastes dermiques humains issues de derme humain que nous avons cultivées 15 jours avant le début de notre ensemencement. Le milieu de culture utilisé était du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10 % de Fœtale Bovine Serum (FBS). La quantité de cellules ensemencées était de 1×10^5 .

Méthode d'ensemencement :

Les échantillons stériles ont été placés dans les puits d'une plaque à 96 puits à fixation ultra-faible, 3 échantillons du côté dermique et 3 échantillons du côté épithélial, en vue de l'ensemencement cellulaire. Les matrices ont été préconditionnées avec un milieu de base pour fibroblastes complété par du sérum (ATCC, Manassas, VA, US) dans un incubateur de culture cellulaire (37°C , 5% CO_2) pendant environ 30 minutes avant l'ensemencement. Des fibroblastes dermiques humains primaires (ATCC, Manassas, VA, US) ont été cultivés dans un milieu de base pour fibroblastes (ATCC, Manassas, VA, US) complété par un kit de croissance pour fibroblastes à faible teneur en sérum (ATCC, Manassas, VA, US). Les cellules ont été recueillies à l'aide de trypsine-EDTA à 0,05 % (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, US) et remises en suspension dans un milieu de culture pour être ensemencées sur l'échantillon acellulaire. Les cellules ont été ensemencées à raison de 1×10^5 cellules/échantillon de matrice. Elles ont été cultivées pendant 5 jours et analysées histologiquement pour vérifier la couverture cellulaire globale des matrices. Les cellules ont été cultivées pendant 72 heures à 37°C et 5 % de CO_2 . La croissance des cellules a été mesurée par le test Presto Blue (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, US)

effectué quotidiennement selon les instructions du fabricant. À la fin de la culture de 72 heures, les matrices ont été fixées dans du formol tamponné neutre à 10 % et traités pour l'histologie afin d'évaluer qualitativement la morphologie des cellules, comme décrit ci-dessus pour la coloration H & E. Nous avons réalisé une analyse de l'activité métabolique cellulaire et de la pénétration cellulaire. Pour déterminer la profondeur de pénétration des cellules, 5 tranches ont été sélectionnées et analysées pour chaque groupe expérimental. Dans chaque tranche, la distance des cellules les plus éloignées de la surface a été déterminée à l'aide du logiciel NDP view. Au total, 75 mesures ont été effectuées par groupe. La distance moyenne des cellules par rapport à la surface de la matrice a été normalisée par rapport à l'épaisseur totale de la tranche à l'aide du logiciel NDP view et la profondeur de pénétration des cellules a été représentée en % de l'épaisseur de l'échantillon.

Le nombre total de cellules dans les échantillons a été déterminé à l'aide du logiciel ImageJ, en utilisant les tranches colorées au H&E (5 tranches par groupe ont été analysées). Le nombre de noyaux présents jusqu'à 600 µm de profondeur de chaque tranche a été déterminé. La limite de 600 µm a été déterminée en se référant aux mesures de profondeur de pénétration des cellules pour inclure la majorité des cellules qui ont pénétré dans les échantillons. En plus du nombre total de cellules, le nombre de cellules a été déterminé par rapport à la profondeur de l'échantillon où 3 zones, à savoir : la surface (0-200 µm), le milieu (200-400 µm) et la profondeur (400-600 µm), ont été examinées. Le nombre de cellules dans chaque zone a été compté à l'aide d'ImageJ et représenté comme moyenne ± std. Trois régions d'intérêt (600x600 µm) ont été analysées par tranche en divisant chaque région en zones respectives.

C. Expérience chez l'homme

1. Technique chirurgicale

Dix greffons faciaux ont été prélevés sur dix donneurs cadavériques humains (Figure 8). Quatre de ces greffons ont été décellularisés. Avant le prélèvement, tous les donneurs avaient consenti à la recherche et à l'enseignement sur leur corps. Les donneurs étaient âgés de 55 à 85 ans au moment de leur décès et étaient décédés depuis 24 à 48 heures. Les têtes de cadavre ont été envoyées au laboratoire à l'état frais, sans produit de fixation, dans des cartons protégés de la glace par un sac plastique. Les cadavres ont été conservés dans une chambre froide à 4°C jusqu'au prélèvement de la greffe.

Les prélèvements de greffons de face humains sont obtenus à partir de dissections cadavériques réalisées par Alexandre Lellouch et Elise Lupon dans le Thier Building du Center for Transplantation Science du Massachusetts General Hospital (MGH) à Boston. Les tissus mous de face, y compris les muscles et leur innervation, ont été prélevés sur des cadavres humains. Les vaisseaux ont été disséqués à leur origine au niveau de l'artère carotide externe et de la veine jugulaire interne et externe. La cannulation des artères faciales droite et gauche et des artères temporales droite et gauche a été effectuée en tentant de les préserver au mieux. La check-list avec les différentes étapes de la technique chirurgicale utilisée est disponible en [annexe 1](#).

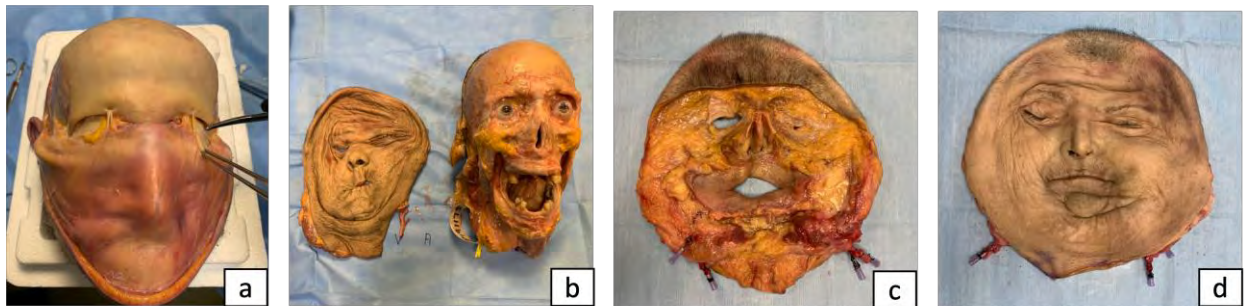


Figure 8. Prélèvement du greffon facial de cadavre humain. a. Cadavre pendant la dissection. b. Cadavre après la dissection. c. Greffon facial prélevé – Vue interne. d. Greffon facial prélevé – Vue externe.

Un greffon de bas abdomen masculin a été prélevé par une organisation privée sur donneur en état de mort encéphalique (Figure 9). La check list avec les différentes étapes de la technique chirurgicale est disponible en [annexe 2](#).



Figure 9. Greffon de bas abdomen humain après prélèvement.

Toutes les expériences sur les greffons ont été approuvées par le comité local du MGH et conformément à la loi Américaine pour l'expérimentation humaine.

Pour tous les greffons (faciaux et du bas abdomen), l'irrigation abondante et lente du greffon avec une solution saline héparinée (15 UI/ml) a été réalisée après prélèvement grâce à un cathéter inséré dans le pédicule artériel. Cette solution a été perfusée jusqu'à ce qu'un retour clair soit identifié par les veines, laissées libres.

2. Technique de décellularisation

1.1 Cas des faces humaines

Trois spécimens ont été placés en incubation dans des récipients individuels contenant des solutions (Figure 10).

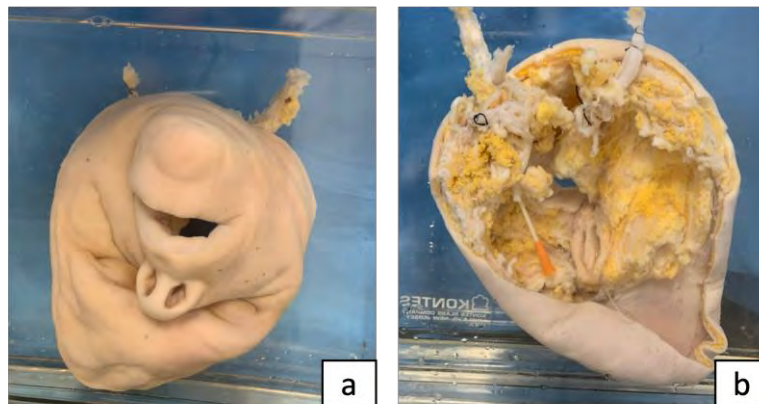


Figure 10. Processus de décellularisation du greffon de face humaine.
a. Greffon en solution – Face externe. b. Greffon en solution – Face interne.

Les greffons ont été seulement immergés, sans perfusion par le pédicule, successivement dans du PBS pour 24h, puis dans du dodécylsulfate de sodium à 1 % pendant 9 jours. Les greffons ont ensuite été lavés avec de l'eau déionisée pendant 24 heures, puis dans du Triton X-100 à 1% pendant 2 jours et finalement dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) pendant 2 jours (Figure 11).

Une dé-épithéliation manuelle (à la pince) était réalisée à partir de J2.

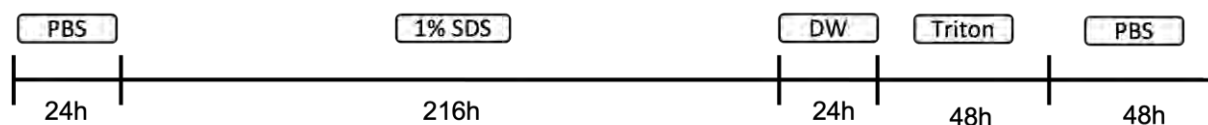


Figure 11. Schéma chronologique du processus de décellularisation des greffons faciaux traités au SDS 1%.

DW : eau déionisée

Un des trois greffons de face traité au SDS 1% a bénéficié d'une séquence de traitement supplémentaire par deux jours d'immersion dans du solvant polaire, le 2-propanolol, afin de traiter la graisse, comme ce qui a été réalisé par Duisit et al.(21). Le greffon a ensuite été lavé avec de l'eau déionisée pendant 24 heures, puis dans du PBS pendant 2 jours.

Le quatrième greffon de face a subi le même protocole mais avec une concentration plus faible de SDS, à 0,2% et sans traitement au propanolol.

Les prélèvements des échantillons ont été réalisés dès la fin du processus de décellularisation ou à distance après congélation immédiate post-décellularisation des échantillons labélisés.

2.2 Cas du greffon de bas abdomen

Un greffon de bas abdomen a été placé en incubation dans un récipient contenant des solutions (Figure 5). Le greffon a été immergé, sans perfusion par le pédicule, successivement dans du PBS pour 24 heures, puis dans du dodécylsulfate de sodium à 1% pendant 9 jours puis lavé avec de l'eau déionisée pendant 24 heures, puis dans du Triton X-100 à 1 % pendant 2 jours, et finalement dans du PBS pendant 2 jours (Figure 12).

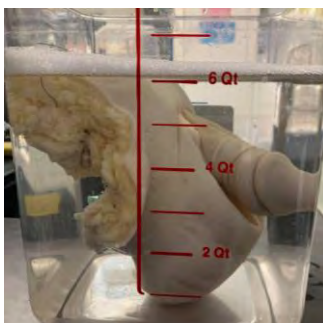


Figure 12. Installation en cours du processus de décellularisation du greffon de bas abdomen humain.

Avant l'analyse des tissus, chaque greffon a été examiné pour vérifier la présence d'épiderme et de phanère (poils), le blanchiment, la morphologie et l'intégrité de la greffe.

3. Prélèvements des échantillons et analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence

3.1 Extraction en paraffine

Les échantillons de tissu natif et acellulaire ont été fixés au formol tamponné neutre à 10% pendant 24 heures, déshydratés, inclus en paraffine et micro sectionnés en tranche de 5 µm.

3.2 Coloration histologique

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées. Nous avons utilisé les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) pour les greffons faciaux et du bas abdomen, au trichrome de Masson (MT), au bleu alcian et à la safranine O selon les protocoles standard pour les greffons faciaux.

3.3 Immunohistochimie (IHC)

Pour les greffons faciaux, après déparaffinisation, les lames ont été soumises à une récupération d'antigène par chauffage à 98°C pendant 60 minutes dans un tampon citrate 10mM, à pH 5,7. Les peroxydases endogènes ont été inhibées en utilisant 1 % de H₂O₂ et les sites antigéniques non spécifiques ont été neutralisés avec du sérum de chèvre 1:50. Les échantillons ont été incubés à 4°C pendant la nuit, en utilisant les anticorps primaires : anti-MHC type I (ab134189, 1:200, Abcam, Cambridge, UK).

3.4 Immunofluorescence (IF)

Les analyses ont été réalisées selon la même méthode précédemment décrite pour les LFC. Un résumé des justifications des analyses réalisées et non réalisées par rapport à l'étude de Dusit et al.(21) est disponible en [annexe 3](#).

Les zones de prélèvements des échantillons du greffon bas abdomen pour les analyses histologiques sont schématisées en [annexe 4](#).

4. Quantification d'ADN

Pour les faces, l'ADN d'échantillons de peau, de graisse, et de cartilage (conque) et osseux (os propre de nez) provenant des greffons natifs et décellularisés, a été prélevé au centre et en périphérie des greffons et a été analysé avec le kit DNeasy Blood & Tissue (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US), en traitant jusqu'à 25 mg de biopsies, selon la même méthode précédemment décrite. Un des greffons de face a subi un prélèvement quotidien d'échantillons à différents endroits du greffon (tissu cutané et sous-cutané) pendant toute la durée du processus de décellularisation afin de préciser le profil de décellularisation.

Les zones de prélèvements d'échantillon du greffon de bas abdomen pour les analyses d'ADN sont schématisées en [annexe 4](#).

5. Quantification des composants de la matrice extra cellulaire

À l'aide d'un punch de biopsie chirurgicale de 3 mm, des échantillons acellulaires et natifs cutanés et de tissus sous-cutanés ont été prélevés au centre et en périphérie des greffons pour chacune des analyses. La teneur en collagène total a été mesurée à l'aide du kit de collagène total (QuickZyme Biosciences, Leiden, Pays-Bas), la teneur en glycosaminoglycanes (GAG) a été mesurée par un test colorimétrique suivant un protocole modifié par Farndale et al. (24).

L'analyse des facteurs de croissance a été faite à partir du kit RayBio® Human Growth Factor Antibody Array G-Series 1 (RayBiotech Life, GA, USA) en suivant les recommandations du fabricant.

6. Evaluation du système vasculaire et morphologique

Un agent de contraste (Visipaque, GE Healthcare) mélangé à une solution saline normale (1:2) a été injecté dans le pédicule artériel à l'aide d'une pression constante de la seringue, pour le greffon natif avant décellularisation et pour le greffon après décellularisation (mais avant le prélèvement des échantillons pour préserver l'intégrité vasculaire).

L'acquisition d'images a été réalisée selon une procédure similaire à celle utilisée pour les échantillons de rats et porcins.

Une injection de microfil rouge par les deux artères faciales et temporales canulées a été réalisée sur un échantillon de matrice faciale décellularisée. Le « plâtre » de microfil a été durci pendant la nuit à 4 °C, avant de procéder aux biopsies. L'observation de la microvascularisation a pu être appréciée à ce stade. Le scanner μ CT, l'analyse d'image et la reconstruction 3D ont été tentés par un Scanco Medical μ CT40 au MGH Skeletal Core Imaging Facility avec une épaisseur de section de 6 μ m pour permettre la résolution des vaisseaux de petit calibre.

La microscopie électronique a été réalisée au Schepens Eye Institute core facility soutenu par le NIH National Eye Institute Core Grant #P30EY003790. La technique est similaire à celle utilisée pour les échantillons de rats et porcins.

7. Test des propriétés mécaniques

Des tests de traction ont été effectués pour déterminer la réponse contrainte-déformation des échantillons de peau native (n = 3) et décellularisée (n = 3) pour les greffons faciaux. Une face a été coupée en deux (Figure 13.a). Une des demi-faces a été décellularisée (Figure 13.b). Des échantillons de section rectangulaire, de 4x1 cm (Figure 13.c) de la demi-face décellularisée et native ont été prélevés au niveau du front, des joues et du menton. Les échantillons natifs et décellularisés ont été soumis à une charge de traction avec une vitesse de 10 mm/min et une distance initiale de préhension de 20 mm. Les charges ont été appliquées axialement sous contrôle de la contrainte (Figure 13.d). Les forces le long des axes ont été mesurées avec des transducteurs de couple et le mouvement des particules de graphite a été mesuré à l'aide d'une caméra CCD. Le rapport de la charge appliquée au cours de l'extension a été reporté sur un graphique. La valeur la plus élevée de la force ayant été exercée par le mécanisme de traction a été relevée, ainsi que le temps (en secondes) et le déplacement (en millimètres) pour cette force. Ces valeurs ont été comparées par un test ANOVA à deux voies entre chaque paire d'échantillons associés puis entre l'ensemble des échantillons natifs avec l'ensemble des échantillons décellularisés.

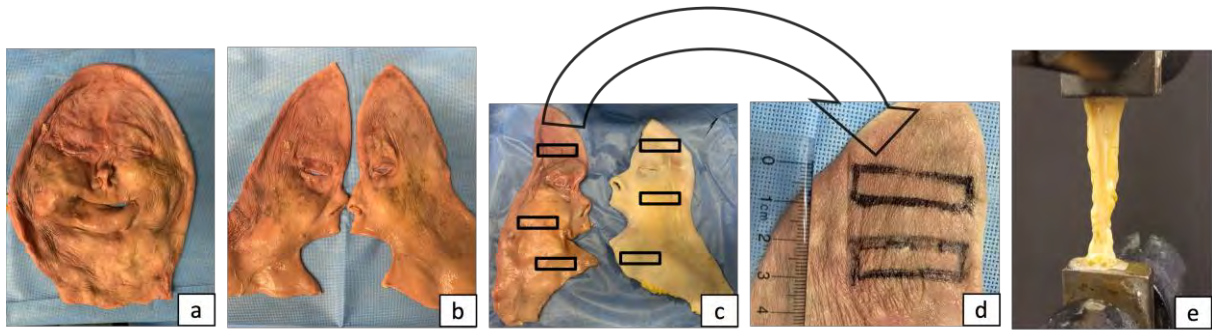


Figure 13. Échantillons soumis au test de traction.

a. Face entière avant section b. Face sectionnée en deux hémiface c. Héli face native et décellularisée d. Section rectangulaire de l'échantillon. e. Mécanisme de traction.

8. Recellularisation in vitro

L'ensemencement de nos échantillons par les cellules fibroblastiques était réalisé par un **ensemencement statique**. Pour cela nous injectons manuellement nos cellules fibroblastiques à travers l'échantillon de la même façon que pour les échantillons porcins décellularisés. Ainsi, 1×10^5 fibroblastes dermiques humains ont été ensemencés sur des échantillons de matrices faciales décellularisés de $0,5 \text{ cm}^2$. Les analyses de l'activité métabolique cellulaire et de la pénétration cellulaire ont suivi les mêmes principes que précédemment décrits.

D. Étude immunologique in vivo

Nous avons réalisé l'implantation d'échantillons sous-cutanés de matrices décellularisées sur des souris immunocompétentes C57/BL6 (toutes des femelles, poids moyen $208 \pm 15 \text{ g}$), donc capables de rejeter un matériel immunogène. Nous avons réalisé une évaluation clinique et histologique à 3 semaines de l'implantation.

1. Procédure chirurgicale

Au préalable, les échantillons décellularisés, prélevés avec des biopsie punch de 5 mm, étaient stérilisés en les immergeant dans du PBS 5% associé à de l'acide acétique à 0,1 %, et sous agitation pendant 48 heures. Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane. L'induction a été administrée à 5 % d'isoflurane dans la chambre d'induction. Le maintien a ensuite été réalisé avec une inhalation d'isoflurane à 1,5 % à travers un cône respiratoire adapté. Un lubrifiant oculaire a été appliqué avant la chirurgie dans les procédures de survie. Le site chirurgical a été rasé, traité avec une crème dépilatoire, frotté et champé avec des champs stériles. L'anesthésie totale a été confirmée par un test de pincement des orteils avant l'incision et régulièrement pendant la procédure. Les fréquences cardiaques et respiratoires ont été surveillées tout au long de la procédure. Pour toutes les interventions chirurgicales, les conditions stériles ont été pleinement respectées en utilisant des instruments, des fournitures, des draps et des gants stériles. Après désinfection, une incision médiane a été pratiquée sur le dos et une poche sous-cutanée a été créée. L'échantillon a été placé dans la poche sous-cutanée qui a été refermée par un fil résorbable 5.0 (Figure 14).

4 groupes d'études ont été individualisés :

1. Groupe 1 : 3 souris avec un implant chirurgical commercialisé, de type Permacol™ (derme acellulaire commercialisé).
2. Groupe 2 : 3 souris avec un implant de tissu porcin décellularisé.
3. Groupe 3 : 3 souris avec un implant de face humaine décellularisé.
4. Groupe 4 : 3 souris avec un implant de tissu de paroi abdominale basse décellularisée (3 échantillons au hasard).

Cinq souris ont été non traitées, souris dites "naïves" pour obtenir des valeurs de référence.

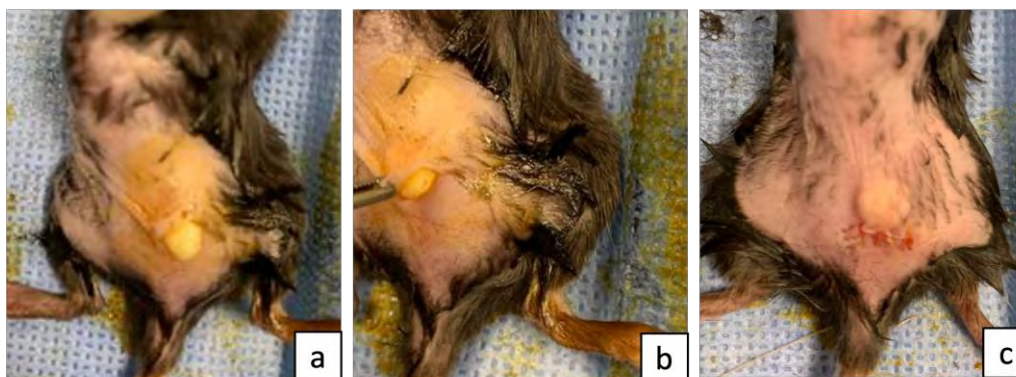


Figure 14. Étape de la procédure chirurgicale pour l'analyse de sensibilisation *in vivo*.
a, b. Implant en cours de placement c. Placement final de l'implant en sous-cutané.

2. Évolution durant l'étude et fin d'étude

Les animaux ont été évalués cliniquement tous les jours pendant toute la durée de l'étude afin de rechercher des signes de rejet clinique ou d'infection. Une administration quotidienne de buprénorphine 0,01 mg/kg par voie sous-cutanée a été réalisée pendant 3 jours.

L'euthanasie a été effectuée au jour postopératoire POD21 ou avant en cas d'inflammation.

Les implants ont ensuite été récupérés avec la peau native et le tissu sous-cutané environnant pour une analyse histologique. Les rates de chaque souris ont été prélevées, conservées dans 5 à 10 ml de RPMI et réfrigérées. Les ganglions lymphatiques drainants ont été recueillis, paraffinés, sectionnés et colorés avec H&E, anti-CD68 (ab31360, Abcam) et anti-CD3 (ab16669) par IHC. Des colorations spécifiques des CD3, CD16, CD19, IgM et IgG ont été utilisées.

Les cellules lymphocytaires B ont comme caractéristiques d'être CD3-/CD16-/CD19+. Le rapport entre les récepteurs IgM et IgG sur les cellules lymphocytaires B des trois groupes a été mesuré. Le passage d'IgM+ à IgG+ marquait la sensibilisation des cellules B *in vivo*.

L'analyse des ganglions lymphatiques comprenait la comparaison des marges entre les follicules de cellules T- et B- entre les groupes et la coloration IHC des macrophages pour déterminer les phénotypes M1 et M2 (sachant que M1 : CCR7+ et CD68+ et M2 : CD206+ et CD68+).

Les coupes colorées par CD68 et CD3 seront numérisées à l'aide d'un scanner de diapositives et analysées à l'aide de l'outil d'analyse d'images (Author version 6.6.3, Visiopharm, Hørsholm, Danemark). L'implant de chaque section sera pris manuellement et une exclusion des artefacts de l'analyse sera faite (*étude toujours en cours*).

Les pixels CD68- et CD3-positifs seront ensuite détectés dans le tissu précédemment délimité à haute résolution en utilisant une classification basée sur la caractéristique de l'image en mettant en évidence la coloration DAB (matrice HDAB-DAB du logiciel). Le seuil sera ajusté sur des zones représentatives de tissus colorés par rapport aux zones non colorées. Les résultats seront exprimés en pourcentages de zones colorées par CD68 et CD3 et calculés en tant que surface colorée/surface tissulaire totale. Les paramètres seront maintenus constants pour toutes les diapositives.

3. Caractérisation des populations cellulaires

Les différentes populations cellulaires présentes dans les échantillons ont été déterminées par cytométrie de flux. Après euthanasie des souris, les cellules splénocytaires ont été récupérées par lavage avec 10 mL de PBS. La concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'un compteur de cellules, puis 1×10^6 cellules/souris ont été analysées par cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées pendant 15 minutes à température ambiante avec un colorant de viabilité fixable (eBioscience, ThermoFisher Scientific) pour identifier les cellules vivantes. Après 2 lavages à 500g pendant 5 minutes dans un tampon de cytométrie (PBS avec 2% de FBS), les cellules ont été marquées avec un mélange d'anticorps pour caractériser les cellules B et T pendant 30 minutes à 4°C. Après 2 lavages, les cellules ont été fixées dans du PBS avec 2% de paraformaldéhyde et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux (FACSVerse, BD Biosciences). L'analyse des données de cytométrie a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo (FlowJo LLC).

Les rates des souris ont été récoltées au jour 21 et l'expression splénocytaire des marqueurs suivants a été analysée :

- o Pour les cellules lymphocytaires B (CD19/B220+) : Analyse de l'intensité de fluorescence moyenne de l'expression des IgM et des IgG pour déterminer si les lymphocytes B étaient sensibilisés chez les souris implantées avec du tissu décellularisé par rapport aux souris implantées avec le matériau commercial, Permacol™.

- o Pour les lymphocytes T (CD3+, CD4+ et CD8+) : L'analyse de l'expression de CD62L et CD44 a été utilisée pour caractériser les lymphocytes T à mémoire effectrice, à mémoire centrale et naïfs entre chaque groupe.

E. Analyse statistique

La présentation graphique et les analyses statistiques ont été effectuées sur Prism 9 (GraphPad Software). Pour le contenu en ADN, GAGs et collagène, un calcul de la moyenne de chacun des groupes puis un test ANOVA à deux voies – comparaisons multiples - ont été réalisés pour comparer tous les groupes entre eux afin de voir s'il y avait une différence significative. La concentration est exprimée en ng/mg de poids sec pour la teneur en ADN. La concentration est exprimée en µg/mg de poids sec pour la teneur en GAG et en collagène. La force (load) est exprimée en Newton (N), le temps en secondes (s) et l'extension de l'échantillon en millimètre (mm). Pour l'étude immunologique, un calcul de la moyenne de chacune de ces populations sur les 3 souris par groupe a été fait. Puis un test ANOVA à une voie a été réalisé pour comparer tous les groupes au groupe de référence (implant commercial, Permacol™) afin de voir s'il y avait une différence significative.

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (SD) pour toutes les analyses. Sur les graphiques, ns = non significatif, * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$. $P < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

IV. Résultats

A. **Expérience chez le rongeur**

1. **Aspect macroscopique**

Macroscopiquement, l'aspect des membres était préservé dans les trois groupes (Figure 15). Les lambeaux étaient devenus blanchâtres dans les groupes traités par une concentration de SDS 1 % et de SDS 0,2 %. Il persistait de nombreuses zones rosées dans le groupe traité par immersion et quelques zones rosées dans le groupe traité par une concentration de SDS 0,2 %.

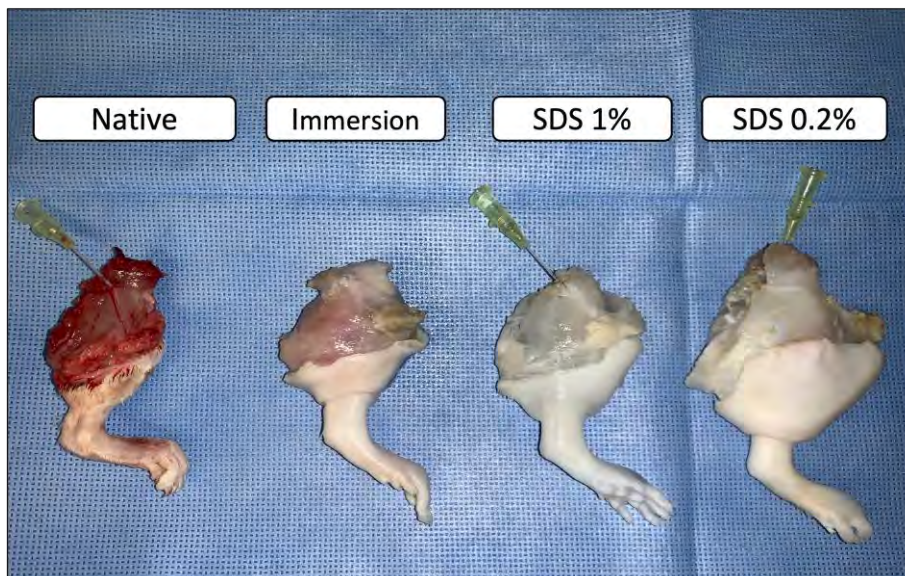


Figure 15. Aspect macroscopique des membres inférieurs postérieurs de rat selon les groupes de traitement.

2. **Clairance cellulaire et ADN résiduel**

Au total, 38 échantillons ont été analysés. L'élimination des cellules a également été évaluée objectivement par quantification de l'ADN, montrant une diminution de la teneur en ADN inférieure au niveau communément admis de 50 ng d'ADN par mg dans les zones cutanées, zones 1, 2, 3 des membres dans le groupe perfusé au SDS 1 % avec un total de 9,667 +/- 2,989 ng/mg contre 217,818 +/- 25,487 ng/mg de tissu dans les échantillons natifs, soit une diminution d'ADN de 95,6 % (Figure 16).

Dans le groupe traité par immersion (cutané et zone 1) et SDS 0,2 % (toutes les zones), il y avait une décellularisation incomplète des membres, avec une teneur en ADN supérieure au niveau communément admis pour la décellularisation. Pour le groupe SDS 0,2%, nous retrouvions un total de 89,901± 15,152 ng/mg (moyenne d'ADN en combinant les valeurs des échantillons cutané, zone 1, zone 2 et zone 3). Pour le groupe immersion, nous retrouvions un total de 54,517 ± 21,816 ng/mg de tissu.

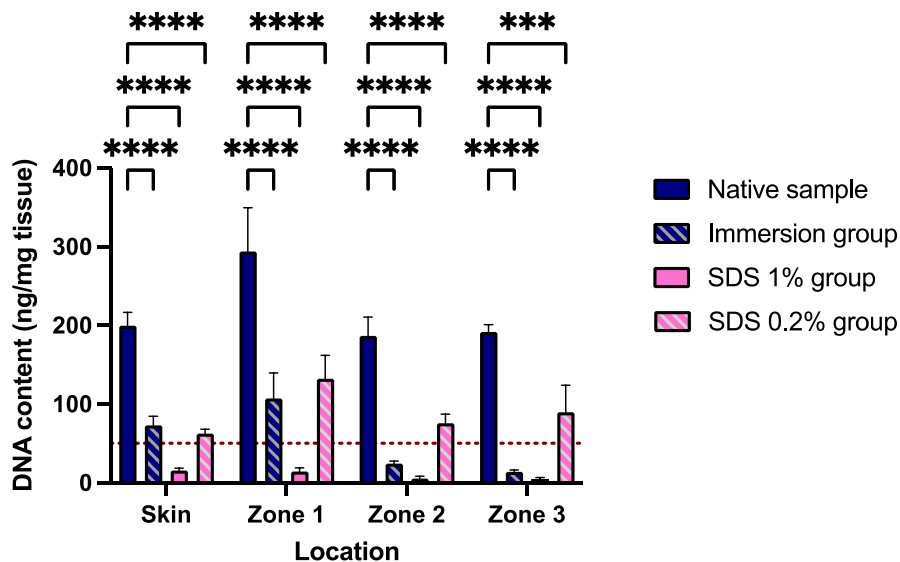


Figure 16. Quantification de l'ADN dans les membres postérieurs de rat à la fin du processus de décellularisation.

3. Analyse au microscope à balayage.

Les images prises à la microscopie à balayage montraient un aspect de la surface des échantillons décellularisés préservé par rapport aux échantillons natifs (Figure 17). On notait cependant une disparition des phanères dans le groupe perfusé avec du SDS 1%.

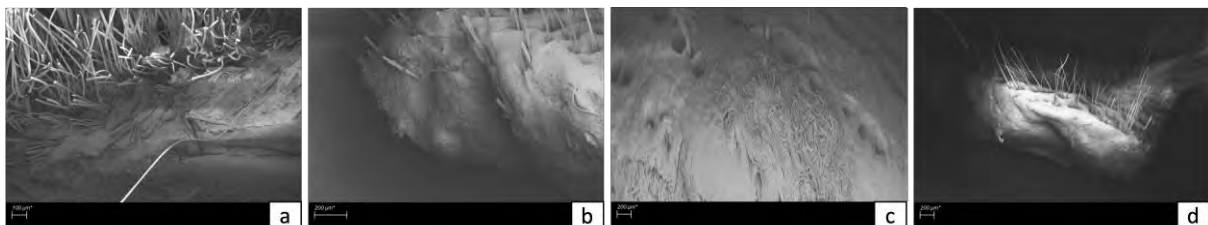


Figure 17. Surface dermique des échantillons de greffon faciaux au microscope à balayage. a) échantillon natif. b) échantillon après décellularisation avec du SDS en immersion. c) échantillon après décellularisation avec du SDS 1%. d) échantillon après décellularisation avec du SDS 0.2%.

4. Analyses spécifiques dans le groupe sélectionné

4.1 Choix du groupe sélectionné

Nous avons sélectionné le groupe perfusé au SDS 1 % (n = 3), que nous avons conclu comme étant le groupe le plus intéressant puisque les membres étaient décellularisés, avec des composants matriciels préservés et un réseau vasculaire intact. Des analyses complémentaires ont été réalisées sur ce groupe.

4.2 Analyse histologique

La coloration H&E effectuée sur des échantillons prélevés dans toutes les zones d'étude n'a identifié aucune coloration basophile indiquant la présence de noyaux cellulaires dans les groupes traités au SDS 1 %. L'architecture globale était conservée (Figure 18).

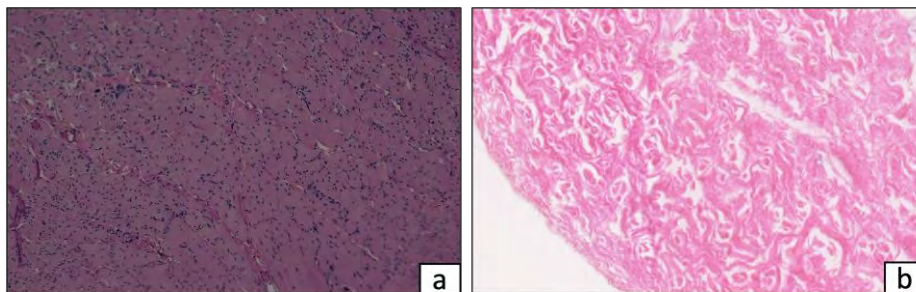


Figure 18. Coupes des échantillons de greffon de membre postérieur colorés au H&E.
a) avant b) après décellularisation

4.3 Composition de la MEC

Les analyses du compartiment en GAG ont montré, par rapport aux tissus natifs, une augmentation significative des GAG musculaires ($p = 0,0014$) avec $29,756 \pm 0,319 \mu\text{g}/\text{mg}$ et une absence de différence significative de la contenance en GAG cutané dans le groupe traité par du SDS 1 % ($p = 0,9892$) avec $26,972 \pm 0,303 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Figure 19).

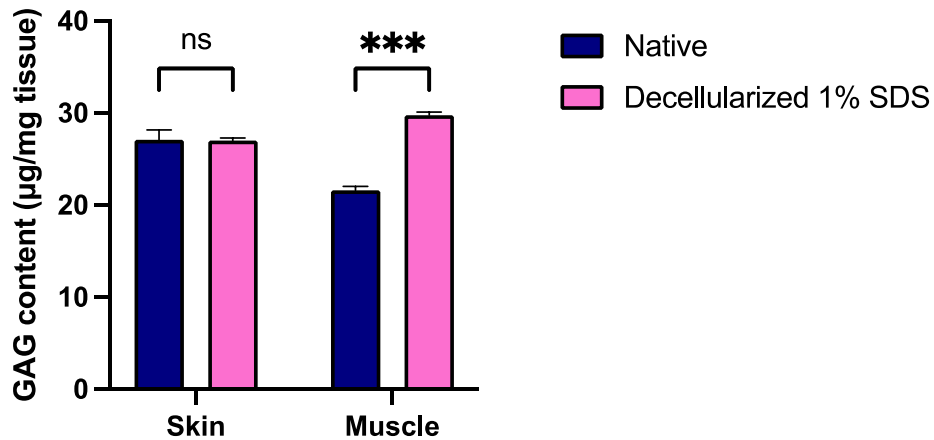


Figure 19. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

Les analyses du compartiment en collagène ont montré, par rapport aux tissus natifs, une augmentation significative du collagène musculaire ($p = 0,0052$) avec $164,105 \pm 15,453 \mu\text{g/mg}$ et une diminution significative de la contenance en collagène cutané dans le groupe traité par du SDS 1 % ($p < 0,0001\%$) avec $397,358 \pm 4,002 \mu\text{g/mg}$ (Figure 20).



Figure 20. Contenu en collagène dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

4.4 Analyse angiographique

L'imagerie radiographique avant la décellularisation était comparable à l'imagerie radiographique après la décellularisation dans le groupe perfusé avec du SDS 1 % (Figure 21).

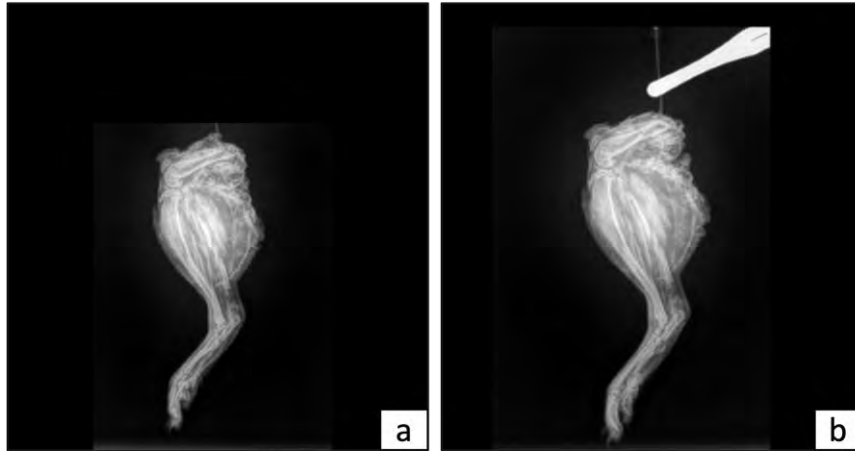


Figure 21. Analyse angiographique dans les membres postérieurs de rat.
a) natif b) décellularisé

5. Transplantation in vitro

Deux membres décellularisés au SDS 1% ont été transplantés de façon orthotopique. Après déclampage, le flux était visible dans l'artère fémorale et circulait dans le réseau vasculaire artériel profond et cutané et s'étendait jusqu'à la patte du membre inférieur (Figure 22).

Aucun retour veineux n'a été observé. L'artère est restée perméable pendant 56 minutes pour le premier transplant et 115 minutes pour le deuxième transplant.

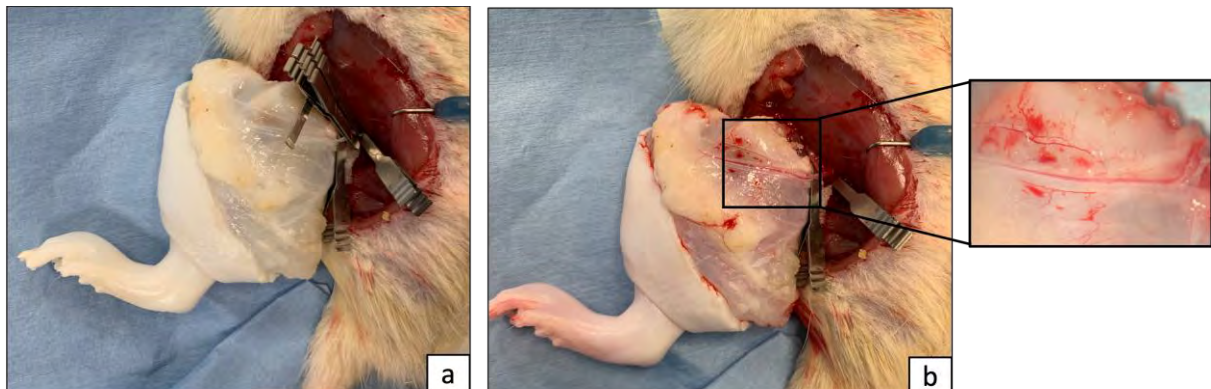


Figure 22. Transplantation orthotopique d'un membre postérieur de rat décellularisé.
a) Avant déclampage b) Après déclampage.

B. Expérience chez le porc

1. Aspect macroscopique

Macroscopiquement, l'aspect des lambeaux était préservé dans les trois groupes. Une dé-épithélialisation était apparue spontanément dans les premières 24 heures de la perfusion de SDS. Les lambeaux étaient devenus blanchâtres à la fin du processus de traitement dans les groupes perfusés par une concentration de SDS 1 % et de SDS 0,2 %. Il persistait des zones rosées dans le groupe traité par une concentration de SDS 0,1 % (Figure 23).

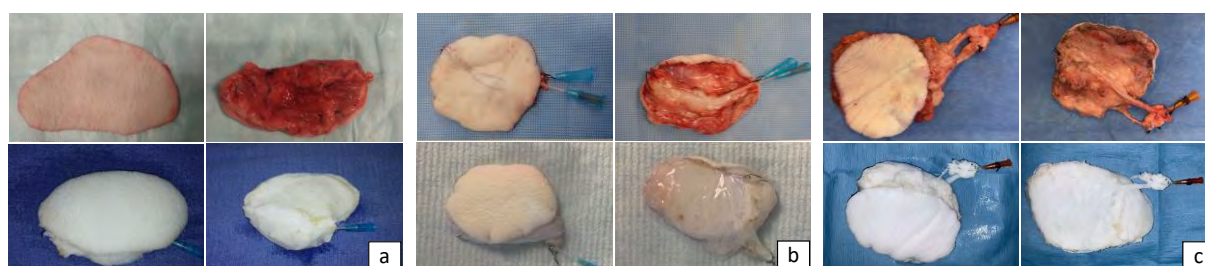


Figure 23. Aspect macroscopique des lambeaux porcins avant et après décellularisation. a. Groupe traité par du SDS 1%. b. Groupe traité par du SDS 0,1%. c. Groupe traité par du SDS 0,2%. Images à gauche de chaque groupe : Face dorsale. Images à droite de chaque groupe : Face ventral. Images de la rangée supérieure : lambeaux natifs. Images de la rangée inférieure : lambeaux après décellularisation

2. Clairance cellulaire et ADN résiduel

Au total, 36 échantillons ont été analysés. L'élimination des cellules a également été évaluée objectivement par quantification de l'ADN, montrant une diminution de la teneur en ADN inférieure au niveau communément admis de 50 ng d'ADN par mg de tissu humide au centre et à la périphérie des lambeaux dans les groupes SDS 1 % (5,906 +/- 0,672 ng/mg au niveau cutané et 4,2 +/- 0,469 ng/mg dans le tissu sous-cutané) et 0,2 % (14,6 +/- 1,5 ng/mg au niveau cutané et 22,368 +/- 7,643 ng/mg dans le tissu sous-cutané) (Figure 24a & b).

Dans le groupe 0,1 %, il y avait une décellularisation incomplète des lambeaux au niveau cutané, avec une teneur en ADN supérieure au niveau communément admis (82,6751 +/- 5,597 ng/mg au niveau cutané et 50,615 +/- 2,037 ng/mg dans le tissu sous-cutané) (Figure 24c).

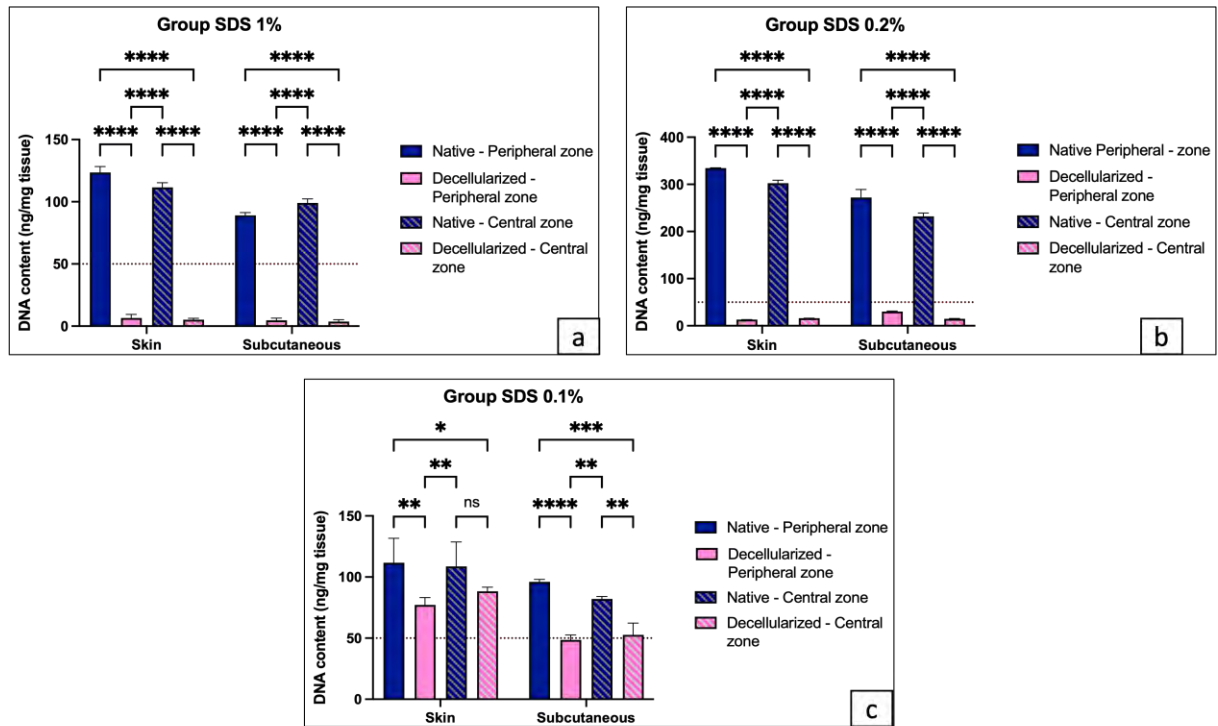


Figure 24. Quantification de l'ADN dans les LFC à la fin du processus de décellularisation dans les différents groupes.

3. Analyses histologiques, immunohistochimiques et en immunofluorescence

La coloration H&E effectuée dans toutes les sous-unités anatomiques n'a identifié aucune coloration basophile indiquant des noyaux cellulaires dans les groupes traités au SDS 1 % et au SDS 0,2 % (Figure 25a & c). Dans le groupe 0,1 %, on a constaté une décellularisation incomplète des lambeaux avec une présence éparse de noyaux (Figure 25b).

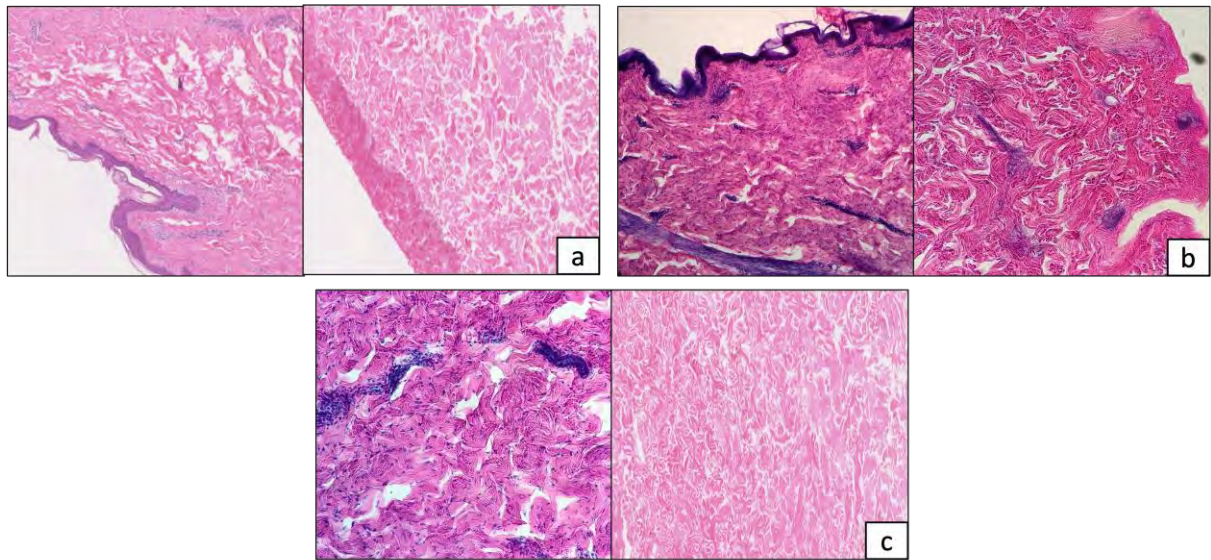


Figure 25. Coupes colorées à l'H&E dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs. a. Groupe traité par du SDS 1%. b. Groupe traité par du SDS 0.1%. c. Groupe traité par du SDS 0.2%.

La composante en GAG était bien préservée par rapport au contrôle natif dans tous les groupes avec absence de différence significative ($p = 0,5252$ dans le groupe 1%, $p = 0,845$ dans le groupe 0,1%, et $p = 0,7464$ dans le groupe 0,2%) (Figure 26). Dans le groupe SDS 1%, nous avons mesuré un total moyen de $1,4073 \pm 0,1158$ ng/mg dans les tissus natifs et $1,3066 \pm 0,0857$ ng/mg dans les tissus décellularisés. Dans le groupe SDS 0,2 %, nous quantifions en moyenne $1,0900 \pm 0,2106$ ng/mg dans les tissus natifs et $1,2875 \pm 0,4129$ ng/mg dans les tissus décellularisés. Dans le groupe SDS 0,1 %, nous retrouvons $2,1211 \pm 0,1319$ ng/mg dans les tissus natifs et $2,070 \pm 0,1440$ ng/mg dans les tissus décellularisés.

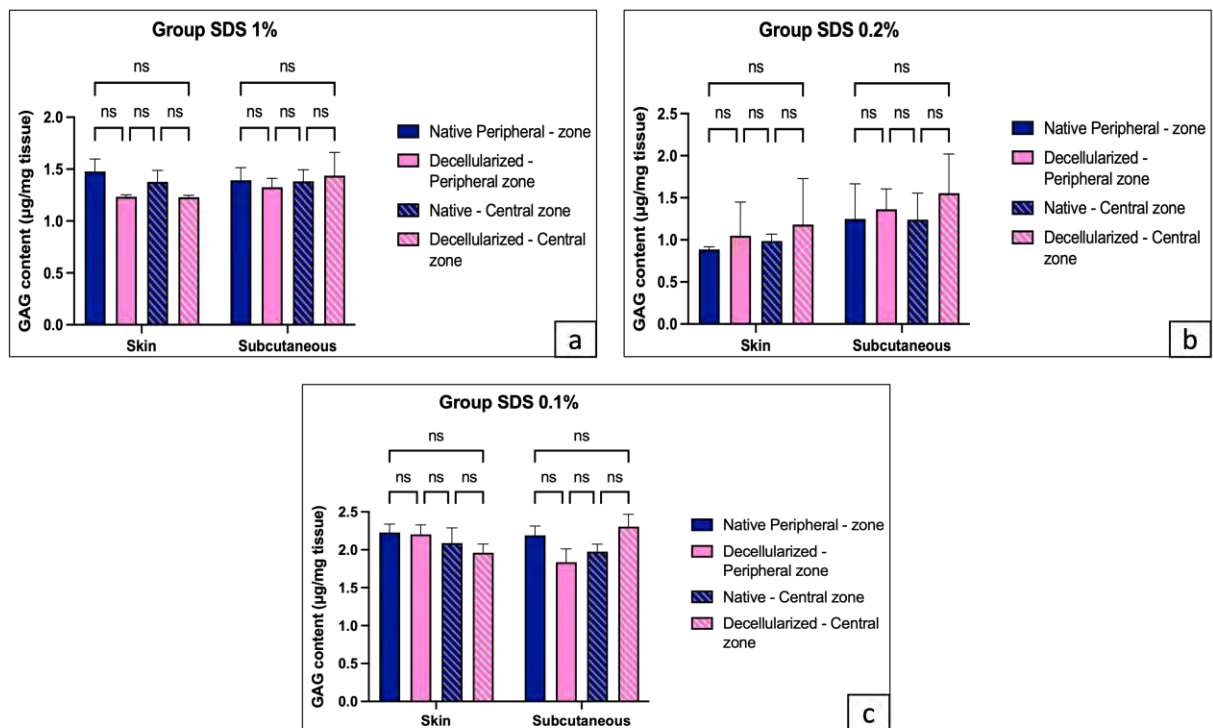


Figure 26. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

Les analyses du compartiment en collagène ont montré une augmentation significative du collagène des échantillons cutanés dans le groupe 1 % ($p = 0,0195$), par rapport aux valeurs sur tissus natifs, avec $111,508 \pm 5,019$ ng/mg au niveau des échantillons cutanés (échantillons centraux + périphériques décellularisés) mais pas de différence dans le tissu sous-cutané (échantillons centraux + périphériques décellularisés) ($p = 0,9754$) avec $59,809 \pm 26,927$ ng/mg. Ces différences n'existaient plus lorsque les échantillons cutanés et sous-cutanés étaient combinés ($p = 0,694$). La concentration de collagène a été plus stable dans les autres groupes. Dans le groupe SDS 0,2 %, il existait une augmentation significative uniquement de certains échantillons au niveau cutané ($p = 0,0498$) avec $116,888 \pm 0,5$ ng/mg et une absence de différence significative dans le tissu sous-cutané ($p = 0,7583$) $52,284 \pm 7,5$ ng/mg. Cette différence n'existait plus lorsque les échantillons cutanés et sous-cutanés étaient combinés ($p = 0,295$). Dans le groupe SDS 0,1%, il n'existait pas de différence significative avec $78,463 \pm 0,185$ ng/mg au niveau cutané ($p = 1001$) et $56,876 \pm 2,2211$ ng/mg dans le tissu sous-cutané ($p = 0,9906$) (Figure 27).

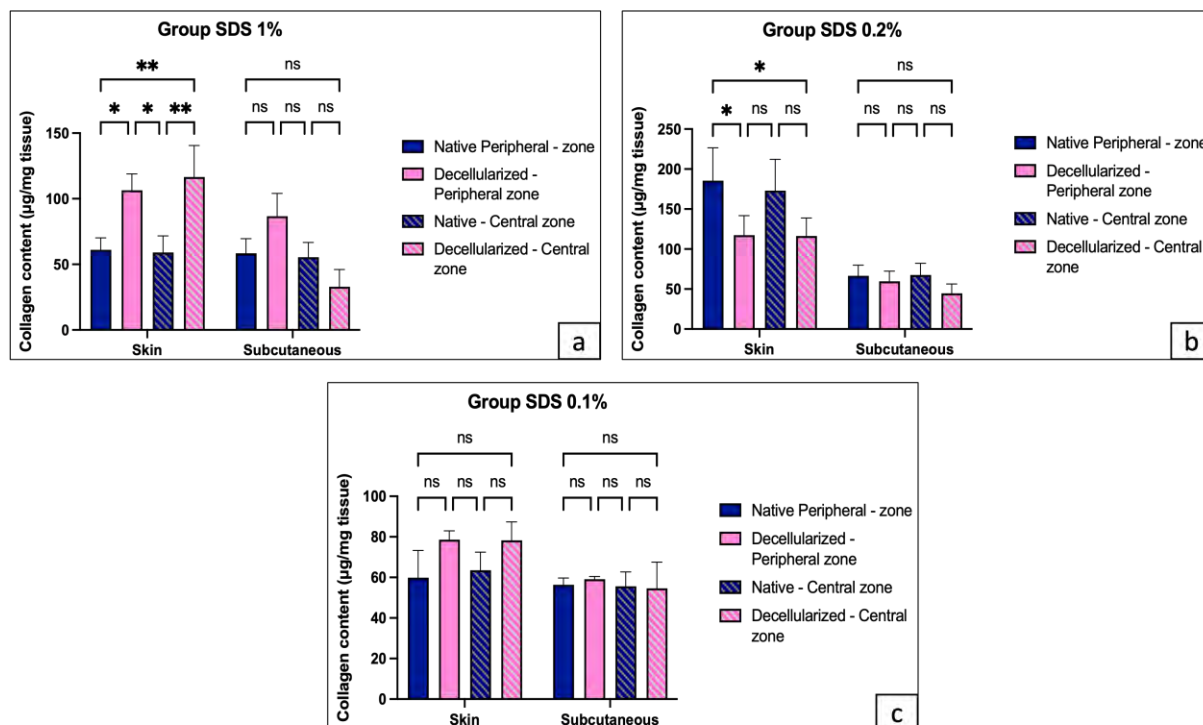


Figure 27. Contenu en collagène dans les LFC décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

4. Évaluation du système vasculaire et morphologique

La perméabilité vasculaire évaluée par imagerie radiographique est représentée à la Figure 28.

L'imagerie radiographique avant la décellularisation était comparable à l'imagerie radiographique après la décellularisation dans les groupes 0,2 % et 0,1 %.

Cependant, dans le groupe 1 %, la microvasculature a été en grande partie détruite (deux lambeaux sur trois).

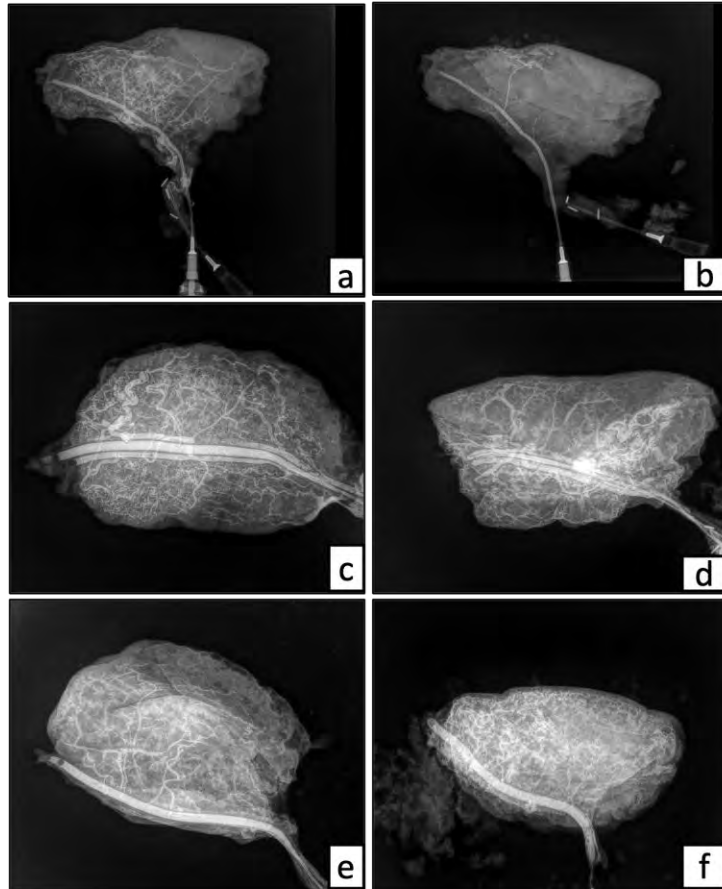


Figure 28. Analyse angiographique dans les LFC décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

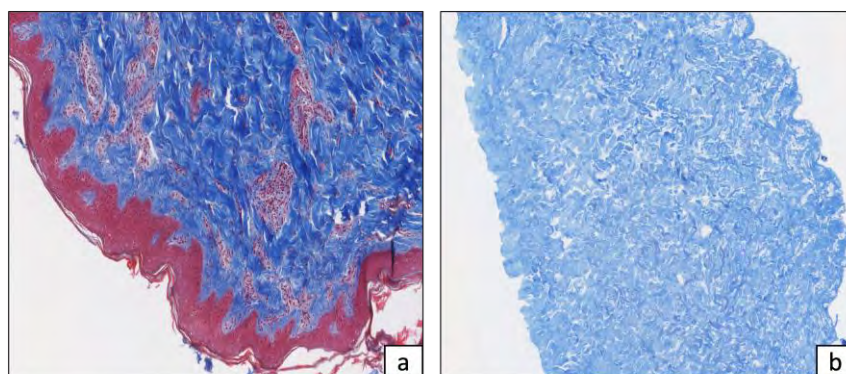
5. Analyse spécifique dans le groupe sélectionné

5.1 Choix du groupe sélectionné

Nous avons sélectionné le groupe SDS 0,2 % que nous avons considéré comme le plus intéressant puisque les lambeaux étaient décellularisés, avec des composants matriciels préservés et un réseau vasculaire intact. Des analyses complémentaires ont été réalisées sur ce groupe.

5.2 Analyse histologique complémentaire

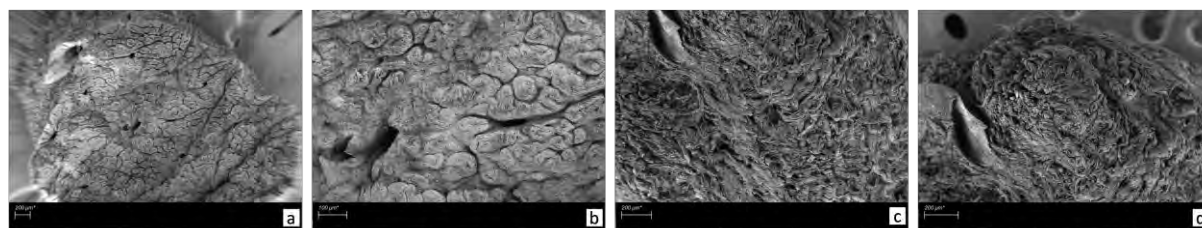
La coloration au MT (Figure 29) montrait un collagène préservé dans le groupe sélectionné et une absence de noyau cellulaire persistant. Cette absence de cellules a été confirmée par une coloration négative de l'antigène MHC-I et au DAPI. La laminine, le VEGF, le TGB-B1 et l'élastine étaient bien préservés. L'analyse de l'épitope alpha-Gal (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) est toujours en cours.



**Figure 29. Coupes des échantillons de lambeaux porcins colorés au MT.
a) avant b) après décellularisation**

5.3 Analyse morphologique complémentaire

Au microscope à balayage, les images révélait des morphologies similaires avant et après la décellularisation (Figure 30).



**Figure 30. Surface des échantillons de lambeaux porcins au microscope à balayage.
a), c) avant décellularisation b),d) après décellularisation**

5.4 Analyse des facteurs de croissance

Il existait une différence significative de la concentration en facteurs de croissance entre les échantillons natifs et décellularisés porcins avec une baisse de la présence de B-NGF (rôle

dans la survie et croissance neuronale) ($p = 0.009$), de l'EGFR (facteur de croissance épidermique) ($p = 0.043$), du PDGF-AA (croissance et division cellulaire) ($p = 0.0002$) et du VEGF-A (impliqué dans l'angiogenèse) ($p = 0.0052$). Cependant, nous notons une augmentation significative de la présence de CSF2 (impliqué dans la production de granulocytes et monocytes) ($p = 0.003$). Il n'existait pas de différence significative de la concentration en facteurs de croissance entre les échantillons natifs et décellularisés porcins pour le FGF4 et le FGF6 (croissance et division cellulaire) (respectivement $p = 0.989$ et $p > 0.9999$), le CSF3, qui stimule la production et libération de granulocytes de cellules souches par la moelle osseuse ($p = 0.9412$), le GDNF, qui joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie neuronales ($p > 0.9999$), l'HB-EGF, impliqué dans la survie, la migration, l'adhérence et la prolifération cellulaire ($p > 0.9999$), l'IGF2, avec ses propriétés mitogènes et régulatrices de croissance ($p > 0.3742$), le NT-4, qui favorise la survie et la croissance des neurones sensoriels ($p = 0.9967$), le PDF-R, qui est impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire et de la division ($p > 0.9999$), le PLGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) ($p = 0.9380$), le TGF- α , TGF-B1, TGF-B2, qui participent à la régulation de la réponse immunitaire (respectivement $p = 0.998$, $p > 0.9999$ et $p = 0.2784$) et les VEGF-R2 et VEGF-D impliqués dans la croissance de l'endothélium vasculaire (respectivement $p = 0.9964$ et $p = 0.4969$). Ces données sont représentées dans la Figure 31.

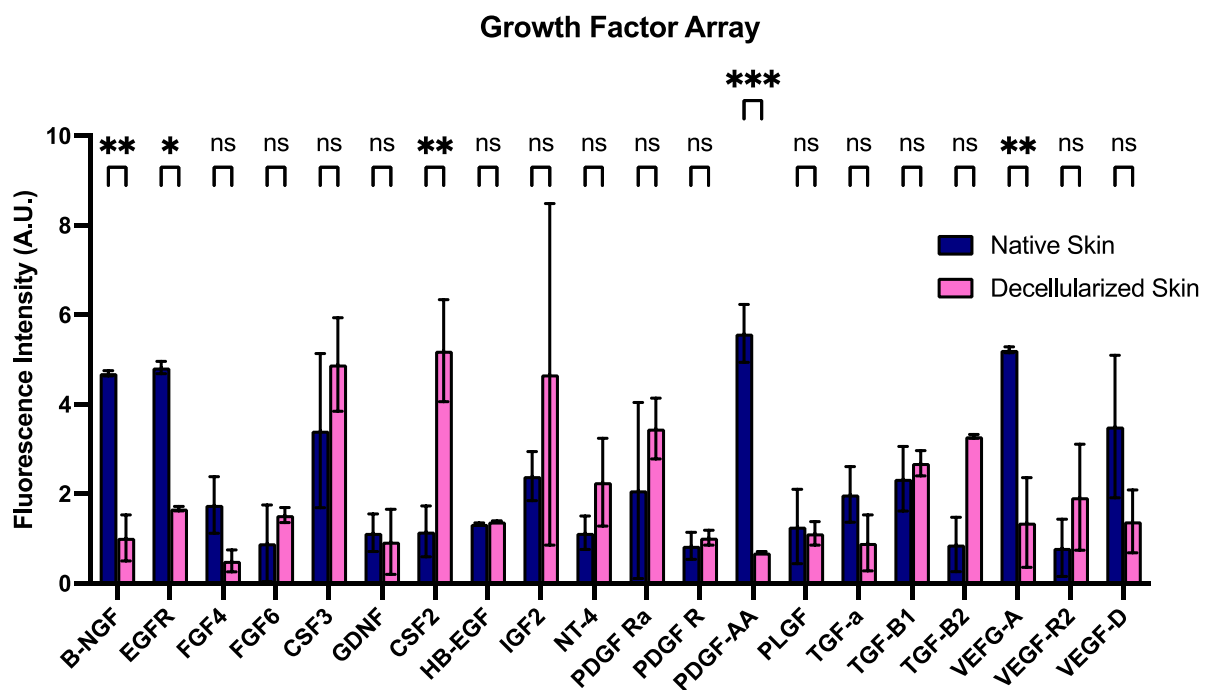


Figure 31. Contenu en collagène dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

6. Recellularisation in vitro

L'attachement et l'infiltration cellulaires étaient visibles dès le premier jour. La viabilité et la prolifération des cellules à la surface des échantillons décellularisés ont été démontrées dans tous les échantillons ensemencés sur la face dermique. Les cellules ont pénétré dans les matrices au cours du temps avec une migration profonde plus importante que dans les greffons de face (Figure 32). Les cellules ensemencées sur des faces épidermiques d'échantillons n'ont pas survécu.

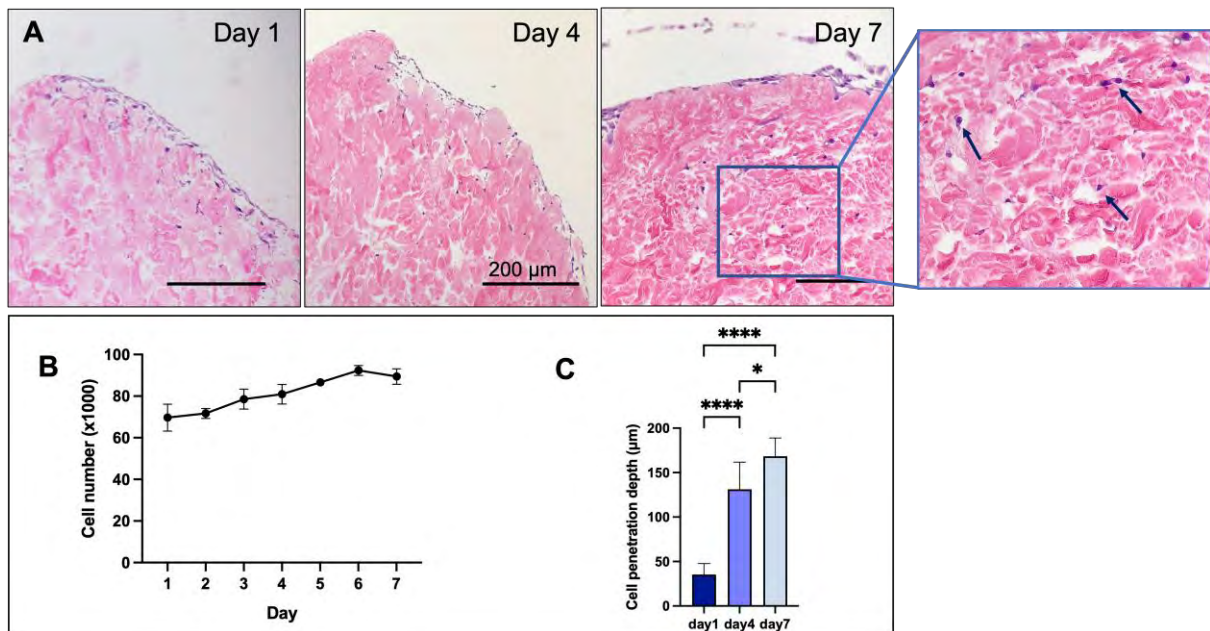


Figure 32. Recellularisation in vitro dans les échantillons de lambeaux porcins acellulaires.
a) Histologie montrant la pénétration cellulaire, b) Activité métabolique cellulaire, c) Pénétration cellulaire par rapport à la surface.

C. Expérience chez l'homme

1. Aspect macroscopique

1.1 Greffon de face et oreilles

- Greffon de face

Sur les 10 cadavres disséqués, 4 greffons ont été traités et analysés. Macroscopiquement, l'aspect était préservé. Des cloques épidermiques sont apparues spontanément dans les premières 24 heures de l'immersion de SDS ; l'épidermolyse était complète et la peau et le muscle sont devenus blanchâtres en quelques jours, avec un contenu lipidique restant. La graisse est restée jaune après la séquence du solvant polaire pour le spécimen traité par isopropanolol, comme dans les faces non traitées avec le solvant (Figure 33, 34).



Figure 33. Dé-épithélialisation au cours du processus de décellularisation.

a. Dé-épithélialisation manuelle à la pince b. Greffon de face à J2 du processus de décellularisation, partiellement dé-épithélialisé



Figure 34. Aspect macroscopique après décellularisation du greffon facial.

a. Face n°1 b. Face n°2 c. Simulation du résultat post-transplantation sur une tête de mannequin

Le greffon de face traité au SDS 0,2% n'apparaissait pas totalement blanchâtre, avec des zones toujours épithélialisées.

- Oreilles humaines

Macroscopiquement, les oreilles et leur cartilage étaient devenus blanchâtres avec un aspect macroscopique préservé (Figure 35).

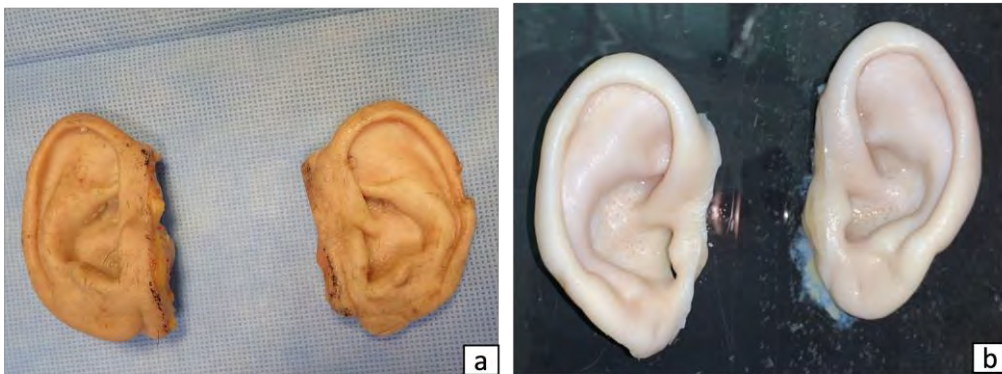


Figure 35. Aspect macroscopique des oreilles prélevées sur cadavre.
a) avant décellularisation b) après décellularisation

1.2 Greffon de bas abdomen

Macroscopiquement, le greffon de bas abdomen était devenu blanchâtre superficiellement, avec un aspect macroscopique préservé. Cependant des zones (zones 7-8, 10-11, 16-19 [annexe 4](#)) au niveau des corps caverneux et des testicules restaient pigmentées (Figure 36).

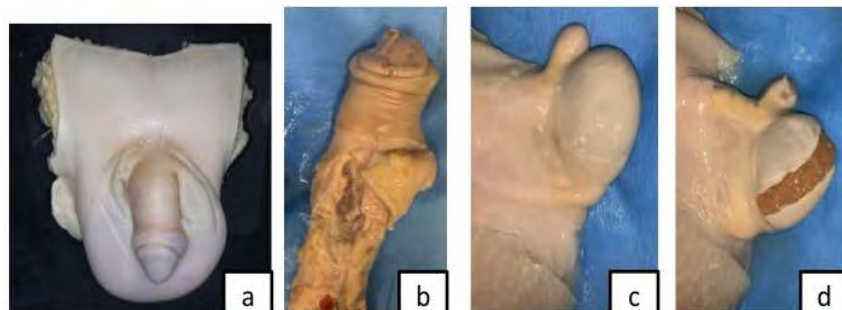


Figure 36. Aspect macroscopique du greffon de bas abdomen après décellularisation.
a. Vue d'ensemble b. Dissection du pénis afin de prélever les échantillons profonds c. Testicule à la fin du processus de décellularisation d. Dissection du testicule afin de prélever les échantillons profonds.

2. Clairance cellulaire et ADN résiduel

Au total, 60 échantillons ont été analysés. Le contenu en ADN était significativement réduit dans tous les tissus décellularisés au SDS 1% ($P < 0,05$) par rapport aux biopsies natives.

2.1 Analyse sur les greffons de faces

▪ *Tissus mous*

La teneur en ADN était inférieure à 50 ng/mg de tissu dans les échantillons décellularisés analysés des 3 faces, dans les zones centrales comme dans les zones périphériques (données des échantillons cutanés et sous-cutanés combinées, $n=12$). Il existait une différence significative dans la contenance en ADN entre les échantillons centraux décellularisés et natifs des faces 1 ($p = 0.002$), 2 ($p = 0.0001$) et 3 ($p < 0.0001$). Il existait une différence significative dans la teneur en ADN entre les échantillons périphériques décellularisés et natifs des faces 1 ($p < 0.0001$), 2 ($p = 0.0001$) et 3 ($p < 0.0001$). Il n'existait pas de différence significative entre la contenance en ADN des échantillons décellularisés en périphérie ou au centre du spécimen des faces 1 ($p = 0.9167$), 2 ($p = 0.9966$) et 3 ($p = 0.9973$). La contenance moyenne en ADN dans tous les échantillons de face natifs combinés était de 117.048 +/- 20.562 ng/mg, et de 6.701 +/- 2.029 ng/mg de tissu dans les échantillons de face décellularisés, soit une diminution de 98.3% de la contenance en ADN (Figure 37).

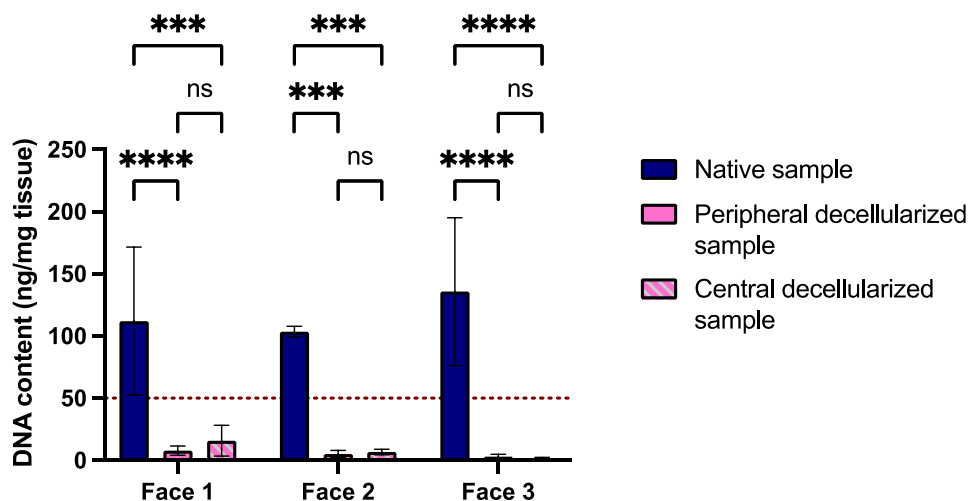


Figure 37. Quantification de l'ADN dans les greffons faciaux à la fin du processus de décellularisation.

Le greffon traité au SDS 0,2% présentait une concentration en ADN supérieure à 50 ng/mg dans les échantillons analysés (n = 4). Aucune autre analyse n'a été effectuée sur ce greffon.

Pour le greffon sur lequel des échantillons ont été prélevés quotidiennement pendant 12 jours (n=84), la teneur en ADN était inférieure à 50 ng/mg de tissu dans les échantillons en cours de processus de décellularisation dès le 5ème jour et homogène dans les zones centrales comme dans les zones périphériques cutanées et sous-cutanées (Figure 38). La contenance moyenne en ADN dans tous les échantillons de face natifs combinés était de 103.006 +/- 1.508 contre 26.353 +/- 0.8075 ng/mg à J5, soit une diminution de 74.4% de la contenance en ADN contre 14.498 +/- 0.738 ng/mg à J12 du processus de décellularisation, soit une diminution de 85.9% de la contenance en ADN.

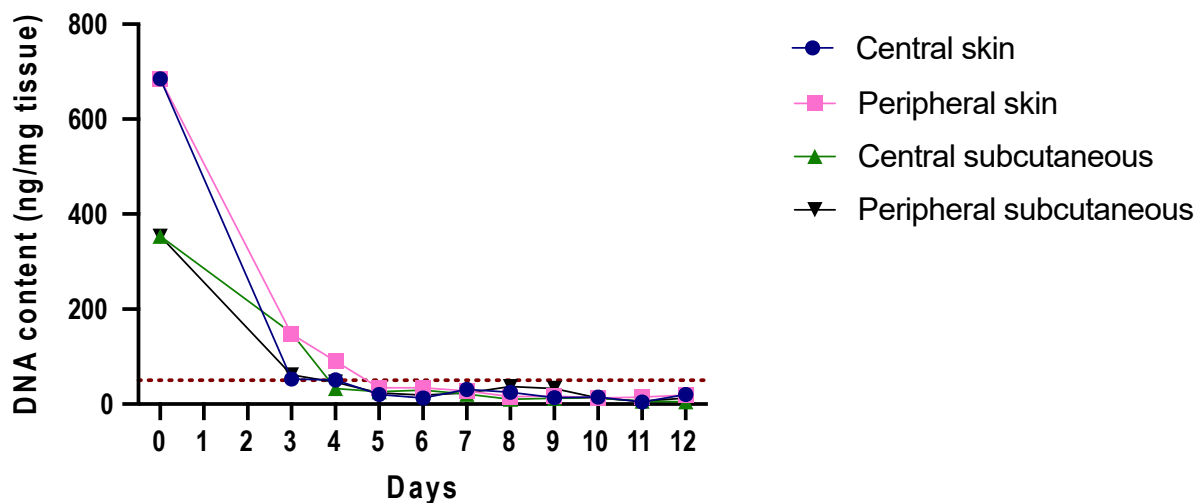


Figure 38. Quantification de l'ADN journalière dans un greffon facial au cours du processus de décellularisation. La concentration est exprimée en ng/mg de poids sec pour la teneur en ADN.

- Cartilage et os

La teneur en ADN était inférieure à 50 ng/mg de tissu dans les échantillons décellularisés analysés des 3 faces (n = 12) sur les prélèvements réalisés au niveau de l'hélix, l'antitragus, la conque et osseux (os propre du nez). Il existait une différence significative dans la teneur en ADN entre les échantillons cartilagineux décellularisés et natifs (p <0.0001). Il existait une différence significative dans la teneur en ADN entre les échantillons osseux décellularisés et natifs (p <0.0001). La contenance moyenne en ADN dans tous les échantillons cartilagineux natifs combinés était de 183.7 +/- 19.5 contre 10.12 +/- 4.008 ng/mg de tissu dans les

échantillons cartilagineux décellularisés, soit une diminution de 94.5 % de la contenance en ADN. La contenance moyenne en ADN dans tous les échantillons osseux natifs combinés était de 172.35 +/- 3.033 contre 11.7 +/- 1.996 ng/mg de tissu dans les échantillons osseux décellularisés, soit une diminution de 93.2 % de la contenance en ADN (Figure 39).

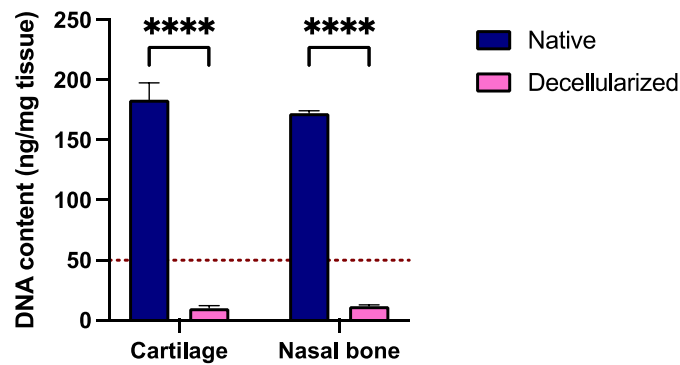


Figure 39. Quantification de la teneur en ADN dans le cartilage et le tissu osseux à la fin du processus de décellularisation.

2.2 Analyse du greffon de bas abdomen

Au total, 54 échantillons ont été analysés (2 échantillons par zone).

La teneur en ADN était inférieure à 50 ng/mg de tissu dans 55.5% des échantillons décellularisés (n = 30/54). Le greffon était donc partiellement décellularisé (Figure 40).

Les échantillons présentant un ADN supérieur à 50 ng/mg (n° 3, 4, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 22) étaient tous dans les zones profondes (annexe 4).

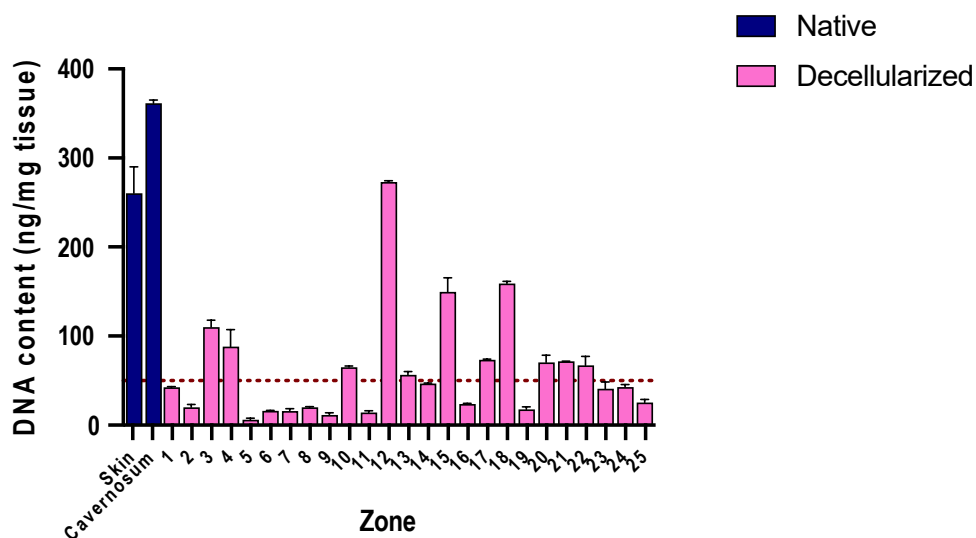


Figure 40. Quantification de la teneur en ADN dans le greffon de bas abdomen à la fin du processus de décellularisation.

3. Analyses histologiques, immunohistochimiques et immunofluorescentes

3.1 Analyse sur les greffons de face

Les colorations à l'H&E montraient l'absence de noyau persistant sur les coupes des échantillons décellularisés et une architecture globale de l'ECM conservée (Figure 41). Les coupes à l'H&E réalisées quotidiennement sur le greffon en cours du processus de décellularisation étaient compatibles avec les analyses ADN, avec une diminution de la présence des noyaux au cours du temps et une disparition totale à J6. Cette absence de cellules a été confirmée par une coloration négative de l'antigène MHC-I et au DAPI. Les coupes colorées au trichrome de Masson ont montré une préservation structurelle du collagène entier (Figure 42) et en particulier du collagène de type IV impliqué dans la préservation de la membrane basale, la jonction dermique, les vaisseaux et les glandes. Pour le muscle, la laminine était bien préservée. Il n'existait pas de différence majeure observée entre les coupes d'échantillons décellularisés colorées par alcian blue, safranin O, anti TGF-B1 ou anti-fibronectine et les coupes natives (Figure 41).

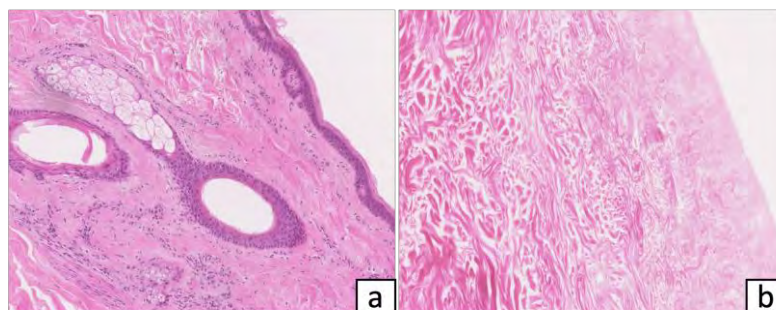


Figure 41. Coupes des échantillons de greffon faciaux acellulaires colorés à l'H&E. a) avant et b) après décellularisation.

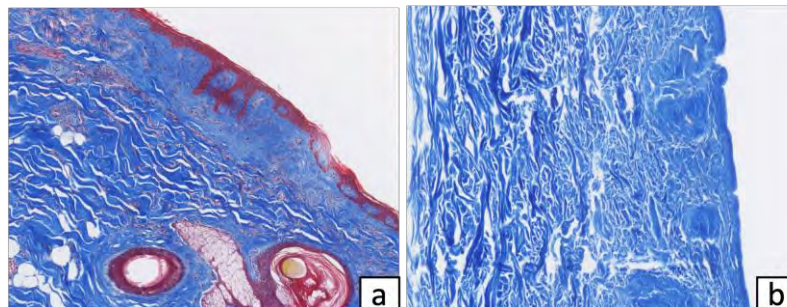


Figure 42. Coupes des échantillons de greffons faciaux acellulaires colorés au MT. a) avant et b) après décellularisation.

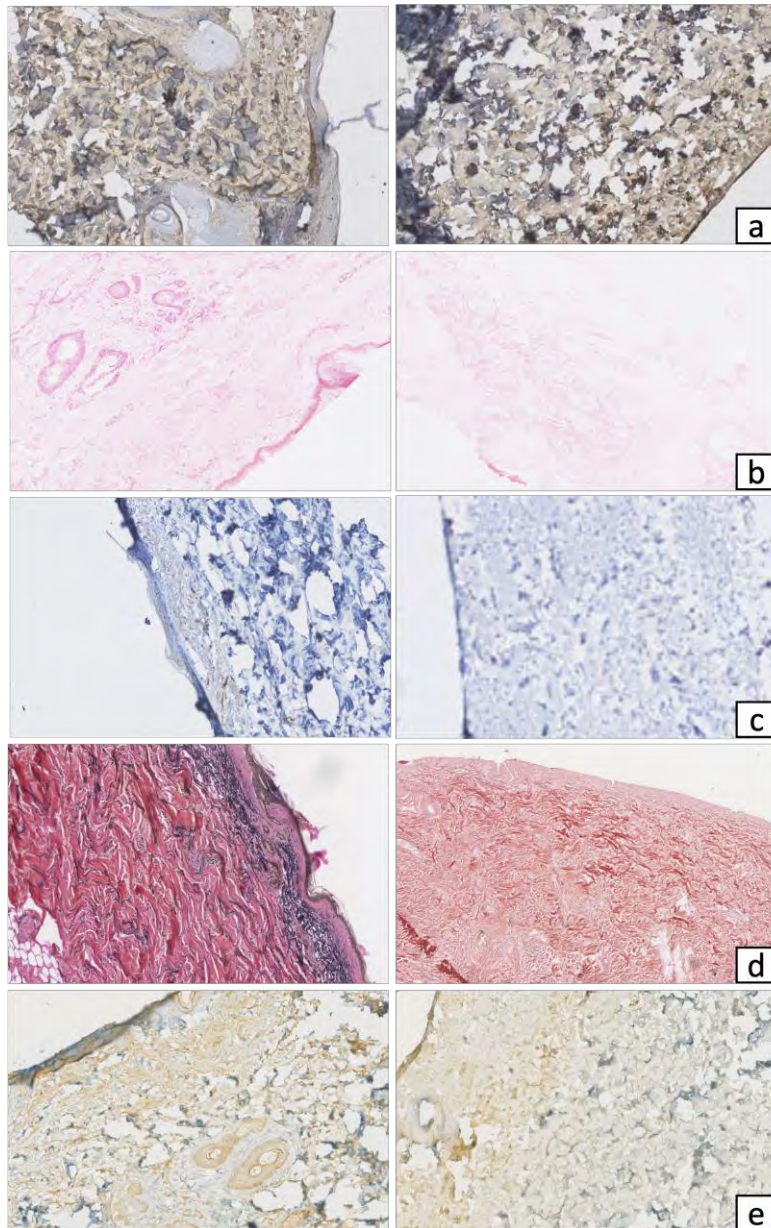


Figure 43. Coupes des échantillons de greffons faciaux traités avec différentes colorations. A gauche : échantillons natifs. A droite : échantillons décellularisés. a) Marquage avec l'anti fibronectine à l'immunofluorescence (évaluation de la fibronectine). b) Marquage au prussien blue (évaluation des protéoglycanes et des mucines de la MEC). c) Marquage au CD-31 à l'immuno-histochimie (marqueur intra-cellulaire). d) Marquage au Miller's elastin (évaluation de l'elastine). e) Marquage avec l'anticorps anti-VEGF (évaluation du facteur de croissance endothélial vasculaire).

En ce qui concerne le contenu principal en protéines ECM (Figure 44), le collagène a été trouvé dans tous les tissus analysés sans différence significative entre les échantillons décellularisés et natifs, toutes localisations confondues ($p = 0.4115$). Cependant, on notait une répartition différente du collagène avec une augmentation significative dans la peau ($p = 0.0005$) mais une diminution significative dans le compartiment sous-cutané ($p = 0.0387$) après décellularisation.

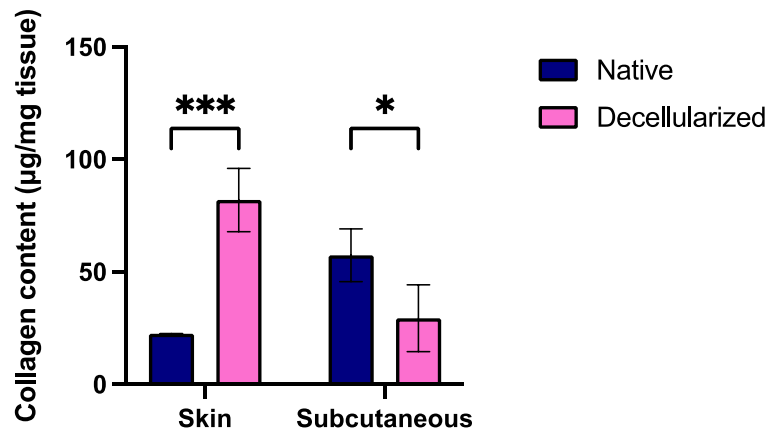


Figure 44. Contenu en collagène dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

Les GAGs (Figure 45) étaient relativement bien conservés dans la peau et la graisse, avec une absence de différence significative entre les tissus natifs et décellularisés, toutes localisations confondues ($p = 0.1236$), au niveau de la peau ($p = 0.691$) et au niveau du secteur sous-cutané ($p = 0.3$).

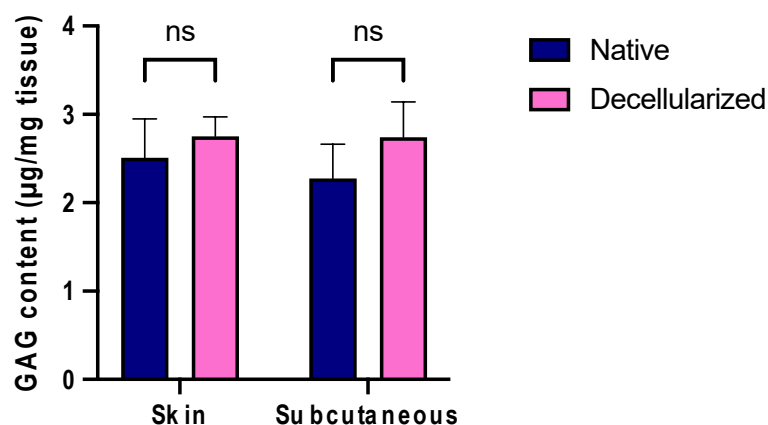


Figure 45. Contenu en GAG dans les greffons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

Il existait une différence significative de la concentration en facteurs de croissance entre les échantillons natifs et décellularisés humains avec une baisse de la présence de B-FGF (rôle dans la croissance fibroblastique) ($p = 0.0009$), de l'EGF ($p = 0.0055$) et des récepteurs à l'EGFR (facteur de croissance épidermique) ($p < 0.0001$) et de l'HB-EGF (rôle dans la cicatrisation) ($p = 0.0031$) et de l'IGFBP-1 (un inhibiteur des actions de l'IGF sur le métabolisme et la croissance) ($p = 0.0228$). Il n'existait pas de différence significative de la concentration entre les échantillons natifs et décellularisés humains pour le FGF6, qui possède un rôle dans la régulation de la prolifération et différenciation cellulaire, l'angiogenèse et la myogenèse ($p > 0.9999$). La contenance en CSF3, qui stimule la production et libération de granulocytes de cellules souches par la moelle osseuse était statistiquement inchangée ($p = 0.5970$). Il en était de même pour le CSF2, qui stimule les cellules souches pour produire des granulocytes et des monocytes, ($p = 0.7115$). L'HGF, qui joue un rôle dans la mobilité et la dispersion des cellules épithéliales et endothéliales, était également retrouvé sans modifications statistique significative ($p = 0.0009$). La contenance en IGFBP2, impliqué dans la signalisation du récepteur de l'IGF-1 du développement, en IGFBP4, qui réduit la prolifération cellulaire tumorale et agit comme un facteur apoptotique, en IGFBP6, qui possède des fonctions de suppression de tumeur, en IGF1R, qui a des propriétés anti-apoptotiques et en IGF2, qui favorise la croissance et la prolifération cellulaires dans de nombreux tissus différents était également statistiquement stable (respectivement, $p = 0.0757$, $p = 0.0009$, $p > 0.9999$, $p > 0.9999$, $p > 0.9999$). Le CSF1R, impliqué dans la production, la différenciation et la fonction des macrophages était retrouvé sans modification significative de son taux ($p > 0.9999$). Finalement, le PDG-Ra et le PDF-R et le TGF-B3, qui sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire et de la division étaient également retrouvés de façon stables ($p = 0.9999$, $p = 0.2414$, $p = 0.9369$) (Figure 46).

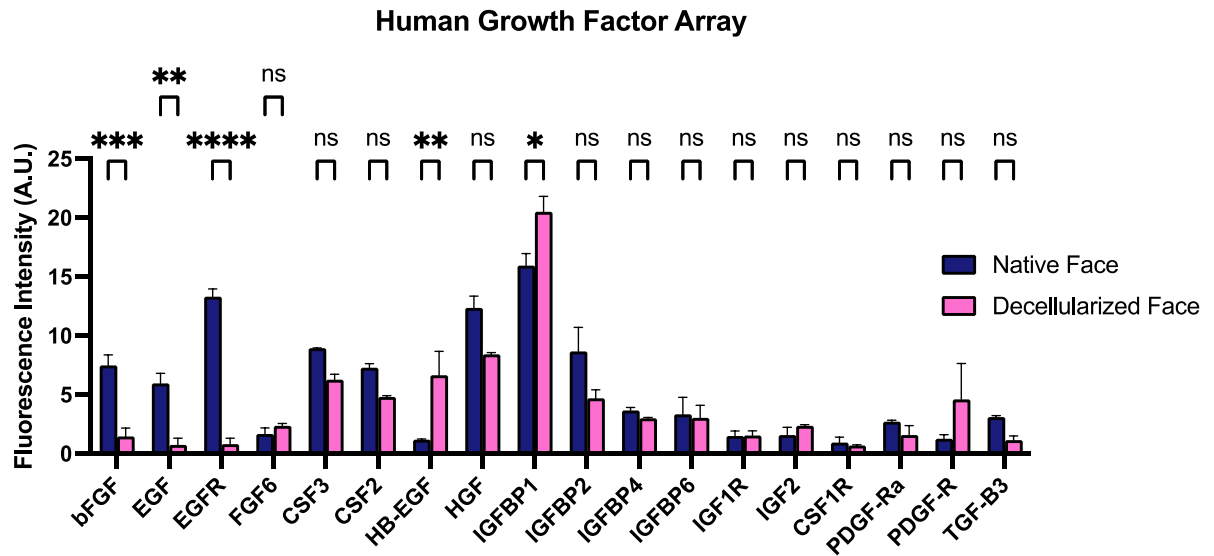


Figure 46. Contenu en facteurs de croissance dans les échantillons décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

3.2 *Analyse du greffon de bas abdomen*

Les colorations à l'H&E montraient la présence de noyaux cellulaires persistant sur les coupes des échantillons décellularisés des zones profondes (annexe 4, zones 3, 4, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 22) et une architecture globale de l'ECM conservée.

Le collagène (Figure 47) était relativement bien conservé, avec une absence de différence significative entre les tissus natifs et décellularisés au niveau de la peau ($p = 0.3785$) et au niveau des corps caverneux ($p = 0.8658$).

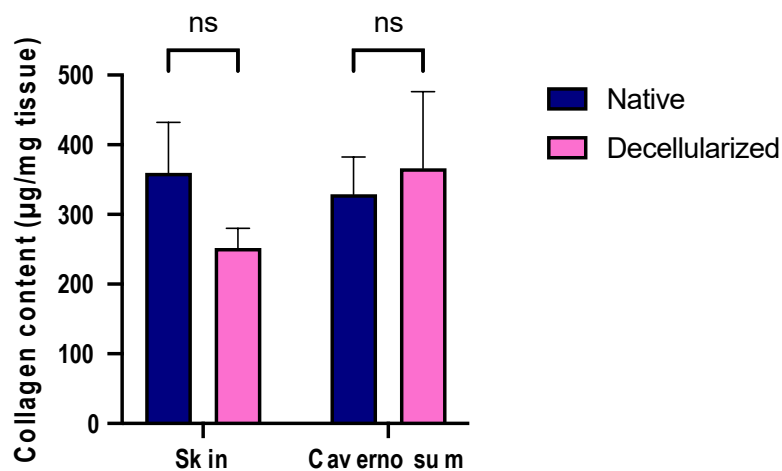


Figure 47. Contenu en collagène dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

Les GAGs (Figure 48) étaient significativement augmentés dans le compartiment sous-cutané décellularisé par rapport au tissu natif ($p = 0.0017$) mais inchangé dans les échantillons de corps caverneux ($p = 0.7576$).

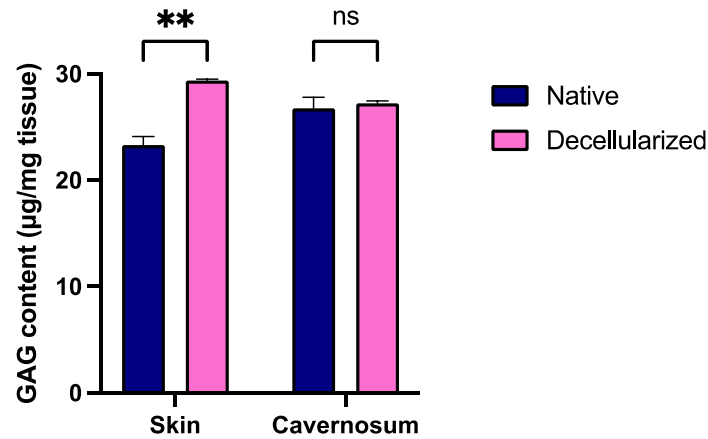


Figure 48. Contenu en GAG dans les greffons de bas abdomen décellularisés par rapport au contenu dans les greffons natifs.

4. Evaluation du réseau vasculaire et morphologique

4.1 Analyse sur les greffons de face

Les angiographies étaient comparables en pré et post-décellularisation (Figure 49).

Cependant, des fuites vasculaires liées au prélèvement sur cadavre, présentes sur l'imagerie pré et post décellularisation, empêchaient l'évaluation de l'intégrité vasculaire.

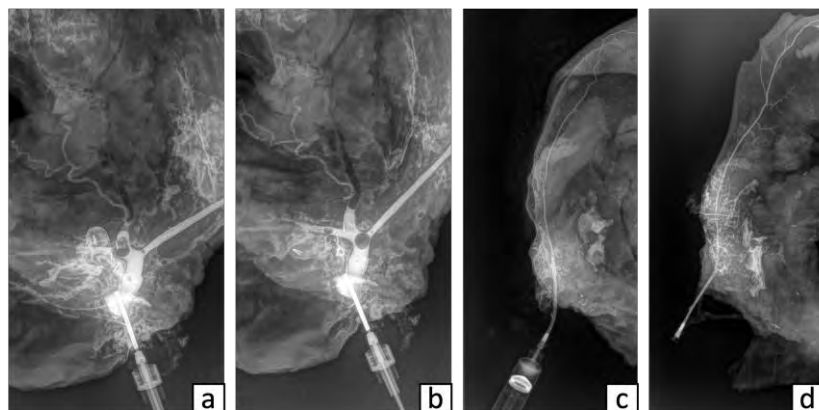
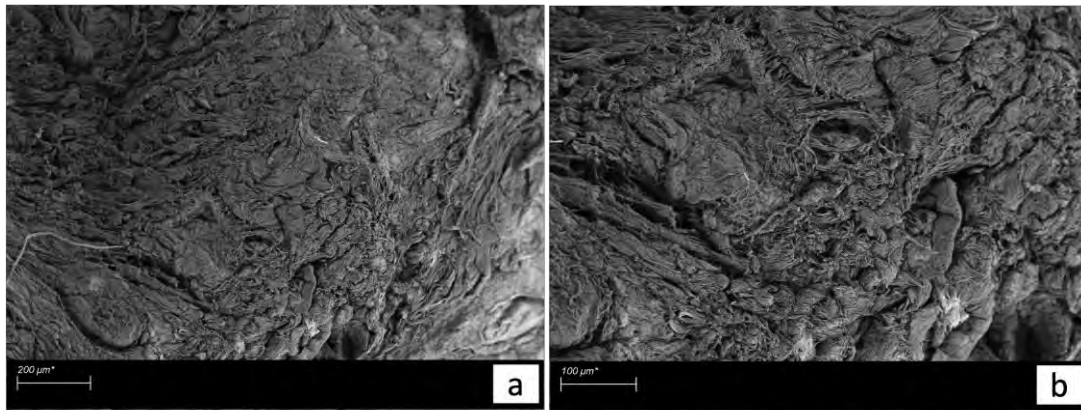


Figure 49. Angiographie des greffons de face.

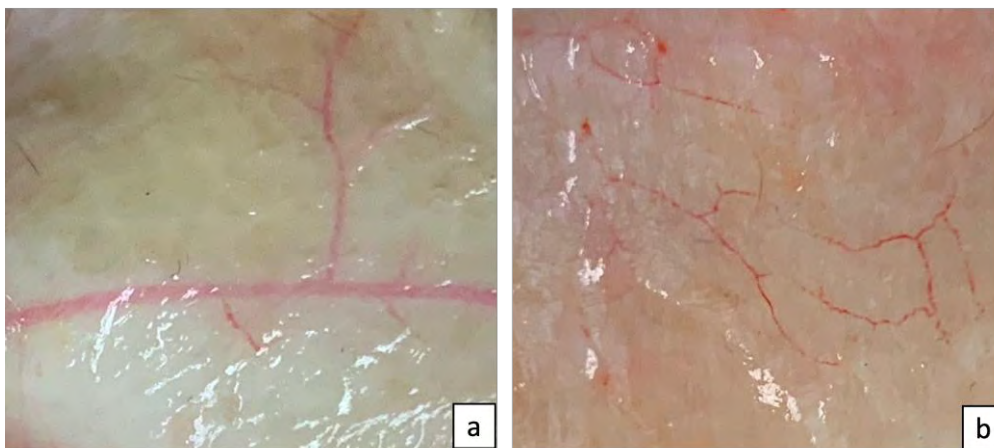
- a) injection par l'artère faciale avant décellularisation
b) injection par l'artère faciale après décellularisation, c) artère temporale superficielle avant décellularisation, d) artère temporale superficielle après décellularisation.

Les images prises à la microscopie à balayage montraient un aspect de la surface des échantillons décellularisés préservé par rapport aux échantillons natifs (Figure 50).



**Figure 50. Surface dermique des échantillons de greffons faciaux au microscope à balayage.
a) avant décellularisation b) après décellularisation.**

Le greffon traité par du microfil montrait une microvasculature préservée de la surface des échantillons décellularisés (Figure 51).



**Figure 51. Injection vasculaire de microfil dans les greffons de faces acellulaires montrant le réseau microvasculaire.
a. Zone frontale b. Zone jugale.**

Les images scannographiques n'ont pas permis d'obtenir une interprétation correcte de la greffe de face (avant et après décellularisation).

4.2 Analyse du greffon de bas abdomen

Les angiographies étaient comparables en pré et post-décellularisation (Figure 52).

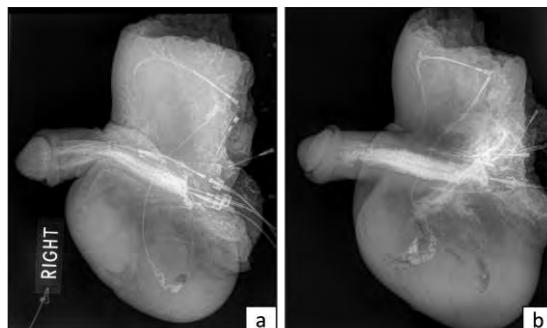


Figure 52. Angiographie du greffon de bas abdomen.
a) avant décellularisation b) après décellularisation

5. Test des propriétés mécaniques

Pour l'ensemble des échantillons natifs ($n = 6$), la valeur la plus élevée de la force ayant été exercée par le mécanisme de traction était de $42.48 \pm 4.18\text{N}$, survenant en moyenne à 105.15 ± 3.20 sec et pour un déplacement moyen de 17.51 ± 1.30 mm. Pour l'ensemble des échantillons décellularisés ($n = 6$), la valeur la plus élevée de la force ayant été exercée par le mécanisme de traction était de 16.25 ± 2.33 N, survenant en moyenne à 91.62 ± 1.33 sec et un déplacement moyen de 15.26 ± 0.54 mm (Figure 53).

Lors de l'analyse entre chaque paire d'échantillons associés (Figure 53c), il existait une différence significative dans la force maximale exerçable uniquement au niveau des échantillons jugaux ($p = 0.0018$), en faveur du tissu natif. Il n'y avait pas de différence significative pour les échantillons frontaux ($p > 0.9999$) et du menton ($p = 0.9987$). Le délai de survenue de la tension maximale exerçable était non significativement différent pour les échantillons jugaux ($p > 0.9999$) et du menton ($p > 0.9999$) mais significativement différents pour les tissus frontaux comparés ($p = 0,0262$), en faveur des tissus natifs. Il n'existait pas de différence significative pour la distance d'extension à laquelle la force maximale exerçable survenait dans les échantillons frontaux ($p = 0.9909$), jugaux ($p = 0.9999$) et mentonniers ($p > 0.9999$).

Lors de l'analyse entre l'ensemble des échantillons natifs avec l'ensemble des échantillons décellularisés (Figure 53d), il existait une différence significative dans la force maximale exerçable en faveur du tissu natif ($p = 0.0013$). Le délai de survenue de la tension maximale exerçable était significativement différent, en faveur du tissu natif ($p = 0.0039$). Il n'existait pas de différence significative pour la distance d'extension à laquelle la force maximale exerçable survenait ($p = 0.9063$).

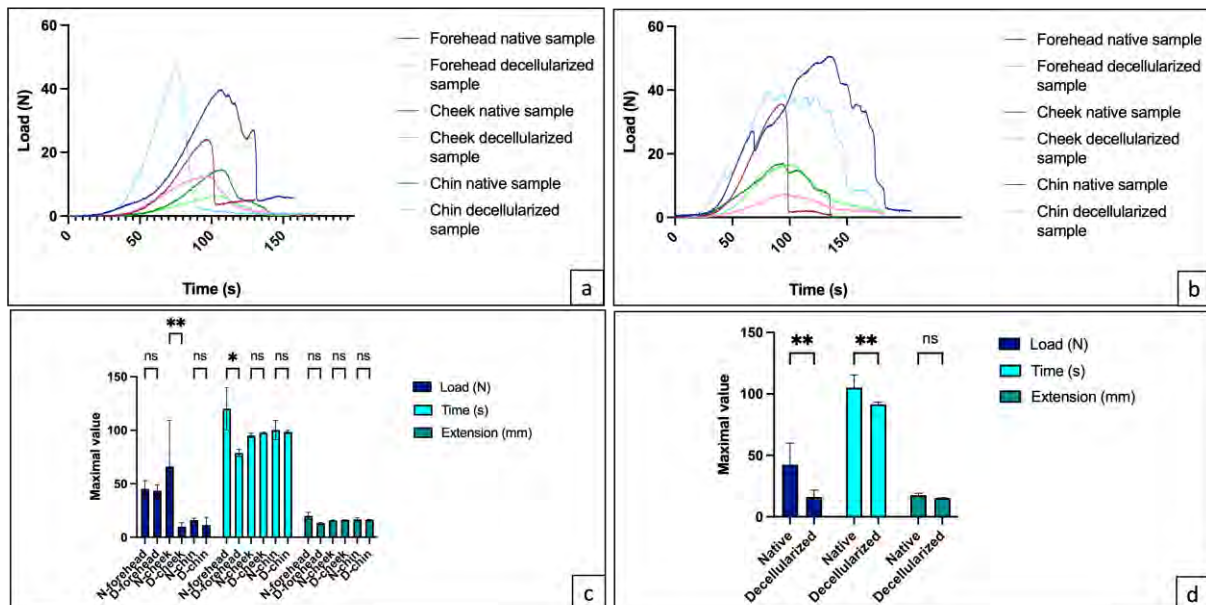


Figure 53. Propriété mécanique au test de traction.

- a) Graphique représentant l'évolution de la force (N) en fonction d'une traction régulière dans le temps (s) dans le premier essai b) et le deuxième essai 2 c) Analyse statistique selon l'emplacement de l'échantillon d) Analyse statistique selon le statut cellulaire de l'échantillon.

6. Recellularisation in vitro

La viabilité, l'attachement et la prolifération des cellules à la surface des échantillons décellularisés ont été démontrées dans tous les échantillonsensemencés sur la face dermique. Les cellules sont restées à la surface des matrices avec une migration profonde limitée, s'appuyant sur l'aspect passif de l'ensemencement cellulaire et sur la haute densité de la MEC. Il existait une augmentation significative de la pénétration cellulaire à J4 ($p < 0.0001$) et à J7 ($p < 0.0001$). Les cellules ensemencées sur des faces épidermiques d'échantillons n'ont pas survécu (Figure 54).

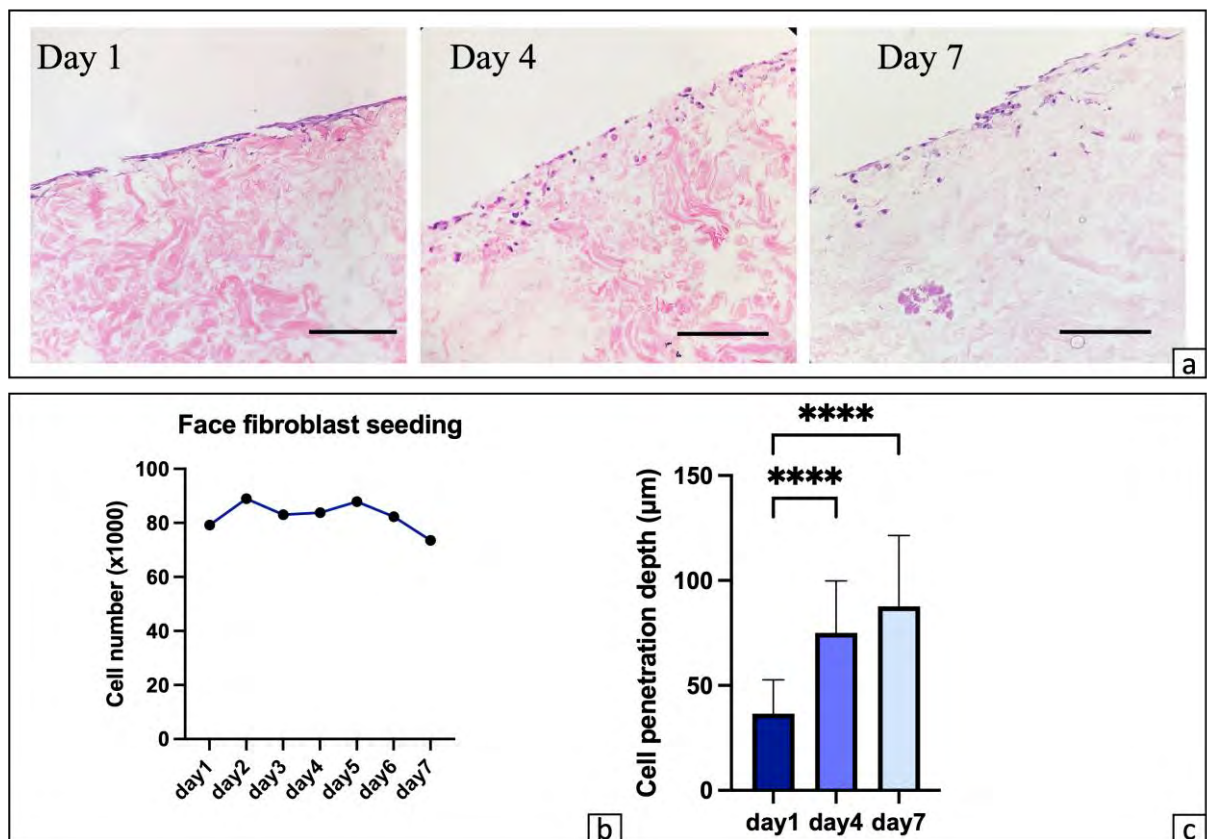


Figure 54. Recellularisation in vitro dans les échantillons de matrice acellulaire faciale.
a) Histologie montrant la pénétration cellulaire b) Activité métabolique cellulaire c) Pénétration cellulaire par rapport à la surface.

D. Biocompatibilité in vivo

1. Clinique

Dans les groupe I, II, III, les souris n'ont pas présenté de troubles cicatriciels ni de signes inflammatoires locaux au cours des 21 jours de l'étude (Figure 55 a,b,c,d).

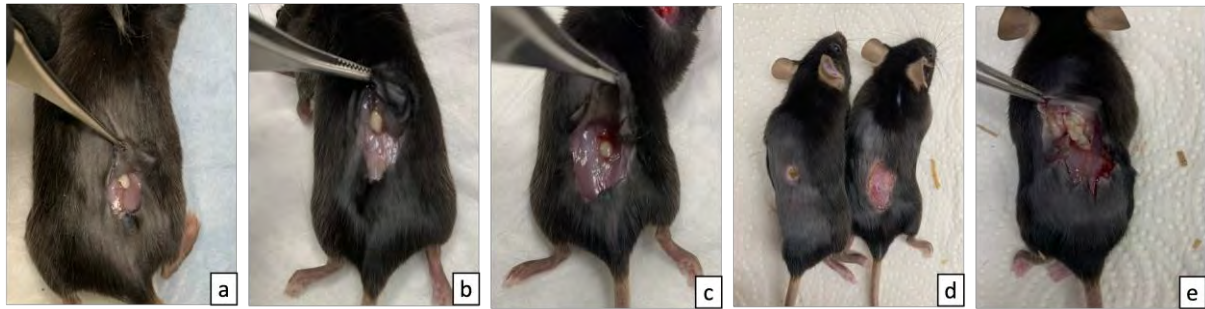


Figure 55. Aspect clinique à la fin de l'étude de biocompatibilité.
a) Groupe I b) Groupe II c) Groupe III d et e) Groupe IV

Dans le groupe IV, les souris ont présenté des troubles cicatriciels et des signes inflammatoires locaux au cours de la deuxième semaine (Figure 55e).

2. Détermination des cellules B

Il n'existait pas de différence significative dans le taux de cellules B présentes et l'expression des Immunoglobulines M et G entre les différents groupes ($P > 0,05$) (Figure 56).

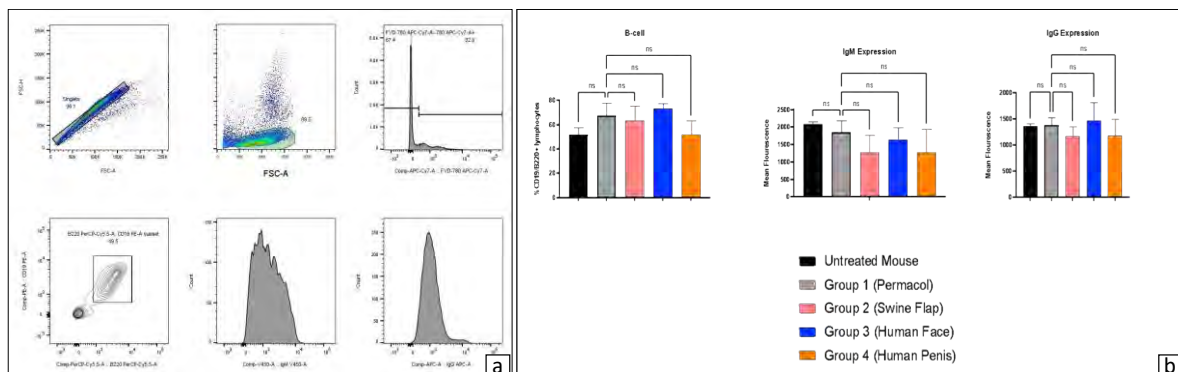


Figure 56. Analyse des cellules lymphocytaires B.
a) Analyse cytométrique b) Analyse graphique

3. Détermination des cellules T

Pour les CD8, il existait une différence significative entre les groupes de souris non traitées et les souris implantées avec du Permacol™ dans le pourcentage de cellules lymphocytaires T à mémoire effectrice et à mémoire centrale ($P < 0,05$).

Pour les CD4, il existait une différence significative ($P < 0,05$) entre les groupes de souris non traitées et les souris implantées avec du Permacol™ dans le pourcentage de cellules lymphocytaires T naïves. Il n'existait pas de différence significative ($P > 0,05$) en ce qui concerne le taux de cellules T entre les groupes de souris implantées avec du Permacol™ et les autres groupes, hormis pour un groupe.

Effectivement, le taux de lymphocytes T à mémoire centrale dans les échantillons de face décellularisée implantée, était significativement plus important que dans le groupe de souris implanté avec du Permacol™ ($P < 0,05$) (Figure 57).

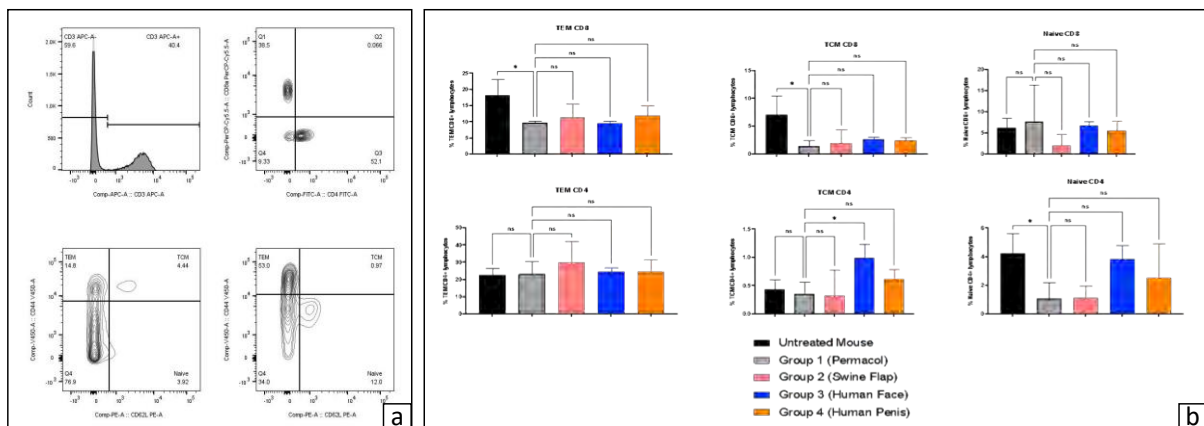


Figure 57. Analyse des cellules lymphocytaires T.
a) Analyse cytométrique b) Analyse graphique

Le traitement des données concernant les analyses histologiques est toujours en cours.

V. Discussion

Actuellement, des matrices biologiques décellularisées sont utilisées pour la réparation de divers tissus, notamment la peau (25), la vessie (26, 27), les valves cardiaques (28, 29) et la greffe vasculaire (30). Plusieurs tissus décellularisés ont reçu l'approbation de la FDA pour une utilisation clinique chez l'Homme, notamment les valves cardiaques porcines (Synergraft® ; Cryolife), le tissu dermique (Alloderm® ; LifeCell) et la vessie porcine (matrice vésicale ; ACell) (31, 32), et sont disponibles dans le commerce. Un certain nombre de substituts de peau et de matrices dermiques ont été produits et commercialisés, mais aucun n'a véritablement fonctionné comme une peau d'épaisseur comprenant un derme et un épiderme. Aucun organe solide ni ATC DE/RE n'a actuellement été réimplanté avec succès chez l'homme (12, 13, 33).

L'objectif de notre étude a donc été d'optimiser la décellularisation de ATC dans le but ultime de réimplanter un jour ces ATC chez l'Homme. Nos protocoles de décellularisation sont basés sur l'utilisation de deux détergents, le Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) à concentration variable et le Triton X-100 1%. Il est intéressant de noter que pour une espèce et un organe donné, le comportement face aux méthodes de décellularisation diffère et plus particulièrement la sensibilité par rapport aux différentes concentrations de détergent testées, comme nous l'avons montré dans notre revue de la littérature (13).

Concernant l'étude sur le rat, nous avons élaboré un modèle de membre inférieur de rat avec un protocole de décellularisation par perfusion de SDS 1 % par le pédicule fémoral, à 1 ml/min. Le modèle de rat est plus accessible en laboratoire et permet une étude plus aisée des processus de DE/RE. Ceci est facilement appréciable par l'analyse des résultats les plus encourageants publiés à ce jour chez le rongeur, comme la réimplantation d'un rein décellularisé puis recellularisé, fonctionnel en 2013 (19) ou la transplantation de lambeaux fascio-cutanés néo-vascularisés et intégrés à 3 mois en 2016 (34). Le modèle de membre partiel de rat que nous avons décrit (35), ne comprenant qu'une partie du membre postérieur de rat, devrait cependant être préféré pour des raisons de commodité post-opératoire et les prochaines études inclueront une étape préalable à la transplantation de re-endothélialisation qui semble incontournable (13).

Concernant l'étude porcine, nous avons montré qu'une concentration de SDS 5 fois inférieure à celle décrite (20) était suffisante pour la décellularisation complète du lambeau. L'utilisation d'un régulateur de pression s'est également avérée être un élément clef dans la bonne préservation du réseau vasculaire. Ce protocole permet ainsi de diminuer l'exposition de la matrice aux détergents ce qui peut optimiser les chances de succès de la recellularisation, comme le montrent les résultats encourageants sur nos manipulations d'ensemencement statique. Le nombre de cellules utilisées était cependant limité dans nos études par les contraintes techniques engendrées. En 2021, des études d'ensemencement dynamique, utilisant des cellules endothéliales, dans le but d'obtenir un alignement et une morphologie optimales de ces cellules ont été réalisées (36). L'ensemencement était réalisé en conditions stériles dans un bioréacteur composé d'une chambre de perfusion remplie de milieu de culture. Ce bioréacteur était placé dans un incubateur. Le système de perfusion était similaire à celui de la décellularisation à l'exception du fait que le circuit était clos avec un système de récupération du milieu dans le bioréacteur qui était ensuite reperfusé dans le LFC. De plus, un oxygénateur à membrane perforée (Affinity Pixie™OxygenationSystem, Medtronic, Dublin, Irlande) a été ajouté au système en amont de la perfusion dans le LFC. Ces lambeaux porcins représentent une alternative intéressante pour la couverture des pertes de substances complexes du corps humain, évitant la morbidité d'un site donneur autologue et les problèmes de disponibilité.

Contrairement aux organes solides (37), la xénotransplantation ne peut pas être appliquée à la face et au pénis, qui est spécifique à l'espèce, et les techniques DE/RE doivent s'appliquer aux modèles humains. De plus, les concordances entre les résultats animaux et humains étant imprédictibles (38), des études chez l'homme sont indispensables, bien que plus complexes sur le plan de la faisabilité. Idéalement, la MEC de face devrait reproduire la morphologie manquante exacte du patient et servir de modèle pour la bio-ingénierie *ex novo* de la nouvelle face à implanter. Comme les technologies synthétiques de pointe (39) n'ont pas encore atteint cette étape, en raison de l'impossibilité de reproduire la complexité du matrisome et du cadre 3D de la MEC humaine innée, les organes humains sont proposés comme source de MEC. Dans notre étude sur les greffons de face, nous avons produit des matrices acellulaires à partir de greffon de face de cadavres humains en utilisant une concentration de SDS à 1% (une concentration de 0,2% ne semble pas suffisante pour la durée du protocole choisie). La méthode d'immersion utilisée a permis d'obtenir avec succès et de

manière homogène une élimination cellulaire complète des cellules des greffons de face, tout en préservant leur MEC. Notre protocole a permis la décellularisation de faces entières par une méthode simple, tout en conservant leur morphologie et en permettant l'adhérence de cellules. Nous n'avons pas utilisé le réseau vasculaire pour distribuer le détergent, à la différence de Duisit et al. (21) qui avait utilisé la perfusion par le pédicule pour décellularisé leur greffon de face. Nous avons ainsi montré que la décellularisation est réalisable sans perfusion pour un organe comme la face mais que cela est plus difficile dans un spécimen complexe et épais comme le bas appareil abdominal. L'immersion seule pourrait permettre d'être moins agressive sur les vaisseaux, en évitant le contact prolongé avec les détergents. Ceci pourrait alors résoudre les problèmes de retour veineux - dans l'hypothèse selon laquelle les vaisseaux sont altérés par la perfusion (20) - et les échecs de transplantation rencontrés par ces auteurs. Aux vues de nos résultats, nous ne recommandons cependant pas cette technique pour un organe épais, comme le bas appareil masculin.

Par ailleurs, si Duisit et al. (21) avaient utilisé un solvant spécifique pour traiter la graisse, nous avons montré que son absence de traitement et la conservation de la couleur jaune de la graisse était concordant avec sa décellularisation.

En 2019, la décellularisation d'un spécimen de pénis humain a permis d'obtenir en 14 jours une matrice acellulaire de pénis complet dans lequel les réseaux vasculaires et la morphologie du tissu natif ont été préservé (40). Dans notre étude, le greffon de bas abdomen humain n'a pas été complètement décellularisé par notre protocole d'immersion et cela laisse supposer qu'une durée d'immersion plus grande que celle utilisée pour une face d'épaisseur limitée est nécessaire pour les organes épais, voir une combinaison avec une courte perfusion pour atteindre les zones très profondes. Effectivement, la décellularisation d'un membre supérieur humain cadavérique complet humain, donc également volumineux et composé de couches multiples avait demandé 60 jours de traitement, soit 2 mois de décellularisation (41). Cette longue exposition au SDS ravive cependant le problème d'altération du greffon par exposition prolongée aux détergents. Des auteurs ont proposé en 2021 (42) de remplacer uniquement les cellules endothéliales du donneur (qui jouent un rôle important dans le rejet du greffon) tout en conservant le reste de l'organe viable et fonctionnel, ce qui est techniquement plus faisable et pourrait permettre de rendre les organes du donneur plus acceptables sur le plan immunologique (génération artificielle d'un chimérisme vasculaire).

La principale limitation de nos études humaines est l'absence de possibilité d'évaluation correcte de la perméabilité vasculaire, du fait des lésions vasculaires lors du prélèvement des

faces, malgré de nombreuses tentatives. L'évaluation scannographique n'a pas été concluante et ne permettait pas de résoudre le problème. Les procédures administratives permettant le prélèvement de face d'un donneur de cœur battant ont donc été mise en place mais aucune proposition de greffon ne nous a été proposée. Ceci est probablement en partie lié à la difficulté psychologique de céder cette partie du corps relative à l'identité par les proches du potentiel donneur en état de mort encéphalique. La recellularisation par injection de cellules sur les échantillons montre l'absence de toxicité de ces matrices acellulaire. Il est important de noter que seul un ensemencement par la face dermique de l'échantillon permettait une viabilité cellulaire. La recellularisation de la greffe complète, par perfusion à l'aide d'un bioréacteur, avant transplantation *in vivo* pourra alors être envisagée, malgré les barrières logistiques, administratives et éthiques qu'elle implique.

Si nous n'avons pas retrouvé de description d'ATC décellularisées par immersion dans notre revue de la littérature, de nombreux autres petits spécimens adaptés à la reconstruction et à la transplantation ont été décellularisés par immersion dans un détergent sans perfusion. Par exemple, Sano H et al. proposent d'utiliser de la graisse humaine décellularisée comme matériau de remplissage tissulaire injectable pour la reconstruction, suggérant que le tissu adipeux acellulaire peut être utile pour améliorer le volume et la forme des tissus mous dans les chirurgies reconstructrices sans présenter de risque de rejet immunitaire (43). De plus, pour relever le défi actuel de la reconstruction du complexe aréolaire et du mamelon (NAC) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, pour laquelle les options sont limitées et les résultats variables, nous avons développé un protocole pour la décellularisation de mamelons de gros animaux (39). En gardant les micro et macro structures du tissu natif intactes, le mamelon décellularisé permettrait la reconstruction du NAC qui ressemble esthétiquement à l'anatomie préopératoire de la patiente.

Concernant l'étude immunologique, nous avons rencontré de nombreux problèmes aux cours de sa réalisation (stérilisation, automutilation des souris en post-opératoire immédiat). Les souris implantées avec des greffons de bas abdomen humain ont toutes présenté un rejet clinique de l'échantillon. Ceci peut être attribué à un problème de stérilisation (absence de stérilisation complète suite à une erreur organisationnelle) ou à un véritable rejet immunitaire avec retentissement biologique non mis en évidence au moment de l'analyse (zones des échantillons de greffons de bas abdomen ayant été choisies aléatoirement

donc potentiellement non décellularisées et immunogéniques). Les résultats sont d'interprétation difficiles même si les résultats préliminaires disponibles de l'étude semblent indiquer une absence de réaction immunologique majeure par rapport au contrôle par la matrice acellulaire commercialisée. La principale limitation de cette étude est la nécessité d'inclure un contrôle positif. Deux autres groupes auraient pu être rajoutés. Un groupe mock, dit « fictif », dans lequel nous réaliserions justes des incisions cutanées, suivies d'une dissection émoussée du tissu sous-cutané, mais sans implantation de matériel et un groupe avec implantation de tissu de greffon natif porcin et humain afin de valider notre méthode. Pour des limitations d'autorisation et de temps, ces groupes d'études n'ont pas encore pu être mis en place. Nous envisageons également d'augmenter le nombre de souris par groupe et la détermination du phénotypage des cellules sanguines en circulation (par l'inclusion de marqueurs de la lignée myéloïde et des colorations intracellulaires des cytokines). Ceci permettra notamment de valider les résultats retrouvés sur la réponse lymphocytaire T avec le Permacol™ (CD4) et les échantillons de faces (CD8).

La technologie DE/RE est une approche prometteuse pour de nombreuses applications d'ingénierie tissulaire/médecine régénérative, notamment la transplantation d'organes solides et l'ATC. Le DE/RE est actuellement la seule méthode permettant de reproduire un ECM 3D naturel. Cependant, en raison de la diversité de chaque tissu, il n'existe pas de méthode standardisée pour le DE/RE et chaque application nécessite une étude individuelle. Néanmoins, compte tenu de l'important potentiel démontré de la DE/RE et de la nouveauté de cette approche, il n'est pas exclu que des matrices d'organes solides et d'ATC soient un jour systématiquement obtenues, cryoconservées, puis mises à disposition pour répondre aux besoins spécifiques des patients en matière de reconstruction, permettant ainsi aux chirurgiens d'accéder à une gamme de matériaux de greffe de taille adaptée, spécifiques aux tissus et facilement disponibles pour réparer rapidement les pertes de substances complexes.

VI. Conclusion et perspectives

L'ensemble de nos résultats montre qu'il existe différentes stratégies de décellularisation selon les espèces de provenance des ATC. Nous avons décrit et optimisé un modèle de membres inférieurs de rats décellularisés, permettant un accès plus aisé à la DE/RE et tenté des transplantations expérimentales en position orthotopique. Cependant, dans cette dernière expérience, nous n'avons pas été en mesure d'établir une perfusabilité vasculaire complète. Les études futures du laboratoire se concentrent davantage sur la régénération du réseau capillaire pour permettre des expériences de transplantation à long terme.

Nous avons également optimisé un protocole pour la génération d'un lambeau porcin en diminuant la concentration de détergent utilisé de 1 % à 0,2 % de SDS. Nous avons analysé en profondeur les composants des matrices acellulaires lors de ces études. Nous avons pu obtenir un bon potentiel régénérateur de nos matrices *in vivo*, en préservant les propriétés biomécaniques et biochimiques de la peau. Nous avons montré la possibilité de recellularisation *in vitro* des matrices acellulaires. Nous avons observé une réponse immunologique semblant favorable à l'intégration bio-matérielle de nos matrices acellulaires dans un modèle animal immunocompétent xénogénique. Nous avons finalement montré que la décellularisation de greffon de face peut se faire par immersion dans des solutions de détergents, en épargnant l'utilisation du réseau vasculaire, qui peut être lésé par l'exposition à une perfusion prolongée de détergents.

La décellularisation des ATC est un domaine en plein essor. La stratégie de recellularisation d'une MEC native pourrait être la condition préalable à la configuration d'un domaine émergent et prometteur, la bio-impression 3D (21). La bio-impression 3D permet de fabriquer un objet physique à partir d'un modèle numérique tridimensionnel, généralement en déposant successivement de nombreuses couches minces d'un matériau (44, 45). La bio-impression 3D dans l'ingénierie tissulaire est apparue comme un outil prometteur pour fabriquer des matrices avec une précision et une exactitude élevées, créant des structures 3D biomimétiques très détaillées (46).

L'un des principaux objectifs du développement des matrices imprimées en 3D est la création de matrices qui ressemblent étroitement aux propriétés du microenvironnement natif du site d'implantation, telles que les propriétés de la MEC, l'agencement de la taille des pores pour permettre la diffusion des nutriments et la migration des cellules, les propriétés mécaniques de

support de charge et le milieu de facteurs de croissance approprié pour la promotion de l'angiogenèse et/ou de l'ostéogenèse (47).

Cette technologie est encore récente et n'est disponible que pour des tissus simples et de petite taille (48-54) en raison de l'absence de vascularisation et parce qu'elle repose sur une pénétration passive des nutriments. La DE/RE nous aidera à optimiser un tissu de bio-impression en comprenant la MEC structurelle native des matrices décellularisées. La structure fine du tissu n'est pas reproductible par bio-impression pour le moment (55-64), et la DE/RE pourrait être la clé pour résoudre ce problème.

Par conséquent, nous pensons que ces deux stratégies ne sont pas antagonistes mais complémentaires (65) et très prometteuses.

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil

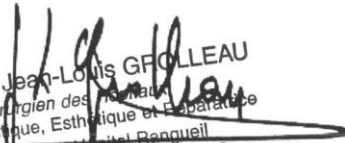
E. SERRANO

24/3/22



Professeur Jean-Louis GROLLEAU

Professeur Jean-Louis GROLLEAU
Chirurgien des Membres
Chirurgie Plastique, Esthétique et Reconstructrice
CHU Toulouse - Hôpital Rangueil
1, avenue Jean Poulhès - TSA 50032
31059 TOULOUSE Cedex 9



VII. Références bibliographiques

1. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
2. Peloso A, Dhal A, Zambon JP, Li P, Orlando G, Atala A, et al. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:107.
3. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9831534.
4. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14(2):213-21.
5. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010;329(5991):538-41.
6. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*. 2011;53(2):604-17.
7. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013;34(28):6760-72.
8. Patil PB, Chougule PB, Kumar VK, Almstrom S, Backdahl H, Banerjee D, et al. Recellularization of acellular human small intestine using bone marrow stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):307-15.
9. Blaudez F, Ivanovski S, Hamlet S, Vaquette C. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. *Methods*. 2020;171:28-40.
10. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011;13:27-53.
11. Dhal A, Brovold, M., Atala, A., & Soker. Principles of Organ Bioengineering. . *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration 2017*.
12. Lupon E, LAG, Goutard M., Cetrulo C.L. Decellularization and Recellularization : An overview. *Cell Therapies in Reconstructive Transplantation. Reconstructive Transplantation and Regenerative Medicine – The Emerging Interface 2021*.
13. Lupon E, Lellouch AG, Acun A, Andrews AR, Oganessian R, Goutard M, et al. Engineering Vascularized Composite Allografts Using Natural Scaffolds: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021.
14. Diaz-Siso JR, Borab ZM, Plana NM, Parent B, Stranix JT, Rodriguez ED. Vascularized Composite Allotransplantation: Alternatives and Catch-22s. *Plast Reconstr Surg*. 2018;142(5):1320-6.
15. Howsare M, Jones CM, Ramirez AM. Immunosuppression maintenance in vascularized composite allotransplantation: what is just right? *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22(5):463-9.
16. Petit F, Minns AB, Dubernard JM, Hettiaratchy S, Lee WP. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery: first clinical applications. *Ann Surg*. 2003;237(1):19-25.
17. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006;368(9531):203-9.

18. Lantieri L, Cholley B, Lemogne C, Guillemain R, Ortonne N, Grimbert P, et al. First human facial retransplantation: 30-month follow-up. *Lancet*. 2020;396(10264):1758-65.
19. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Ott HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*. 2013;19(5):646-51.
20. Jank BJ, Goverman J, Guyette JP, Charest JM, Randolph M, Gaudette GR, et al. Creation of a Bioengineered Skin Flap Scaffold with a Perfusable Vascular Pedicle. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(13-14):696-707.
21. Duisit J, Maistriaux L, Taddeo A, Orlando G, Joris V, Coche E, et al. Bioengineering a Human Face Graft: The Matrix of Identity. *Ann Surg*. 2017;266(5):754-64.
22. White LJ, Taylor AJ, Faulk DM, Keane TJ, Saldin LT, Reing JE, et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomater*. 2017;50:207-19.
23. Friedrich EE, Lanier ST, Niknam-Bienia S, Arenas GA, Rajendran D, Wertheim JA, et al. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(3):e1704-e15.
24. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;883(2):173-7.
25. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation*. 1995;60(1):1-9.
26. Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(12):2353-61.
27. Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005;26(12):1431-5.
28. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, Konig K, Riemann I, Halhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*. 2003;143(3):201-8.
29. Naso F, Gandaglia A. Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years. *Xenotransplantation*. 2018;25(1).
30. Urganci E, Aschacher T, Herbst C, Andreas M, Schlein J, Sandner S, et al. Implantation of a decellularized aortic homograft in a child. *Multimed Man Cardiothorac Surg*. 2020;2020.
31. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-83.
32. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2008;29(15):2378-87.
33. Rajab TK, O'Malley TJ, Tchanchaleishvili V. Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. *Artif Organs*. 2020;44(10):1031-43.
34. Zhang Q, Johnson JA, Dunne LW, Chen Y, Iyyanki T, Wu Y, et al. Decellularized skin/adipose tissue flap matrix for engineering vascularized composite soft tissue flaps. *Acta Biomater*. 2016;35:166-84.
35. Goutard M, Randolph MA, Taveau CB, Lupon E, Lantieri L, Uygun K, et al. Partial Heterotopic Hindlimb Transplantation Model in Rats. *J Vis Exp*. 2021(172).

36. Pozzo V. AA, Lupon E., Lellouch A.G., Oganesyanyan R., Andrews A.R., Lantieri L., Randolph M.A., Cetrulo C.L., Uygun B.E. Reendothelialization of decellularized swine fasciocutaneous flap: a proof-of-concept study. IXA-CTRMS; 2021.
37. Dehoux JP, Gianello P. Xenotransplantation. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2003;68(2 Pt A):21-9.
38. Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, De Vries RBM, et al. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J Transl Med.* 2019;17(1):223.
39. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):312-9.
40. Tan Y, Landford WN, Garza M, Suarez A, Zhou Z, Coon D. Complete Human Penile Scaffold for Composite Tissue Engineering: Organ Decellularization and Characterization. *Sci Rep.* 2019;9(1):16368.
41. Gerli MFM, Guyette JP, Evangelista-Leite D, Ghoshhajra BB, Ott HC. Perfusion decellularization of a human limb: A novel platform for composite tissue engineering and reconstructive surgery. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191497.
42. Cohen S, Partouche S, Gurevich M, Tennak V, Mezhybovsky V, Azarov D, et al. Generation of vascular chimerism within donor organs. *Sci Rep.* 2021;11(1):13437.
43. Sano H, Orbay H, Terashi H, Hyakusoku H, Ogawa R. Acellular adipose matrix as a natural scaffold for tissue engineering. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014;67(1):99-106.
44. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85.
45. Tack P, Victor J, Gemmel P, Annemans L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. *Biomed Eng Online.* 2016;15(1):115.
46. Peltola SM, Melchels FP, Grijpma DW, Kellomaki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann Med.* 2008;40(4):268-80.
47. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem AK. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(12):1742-62.
48. Huang Y, Zhang XF, Gao G, Yonezawa T, Cui X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnol J.* 2017;12(8).
49. Ong CS, Yesantharao P, Huang CY, Mattson G, Boktor J, Fukunishi T, et al. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatr Res.* 2018;83(1-2):223-31.
50. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, et al. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018;71(5):615-23.
51. Liu P, Shen H, Zhi Y, Si J, Shi J, Guo L, et al. 3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;181:1026-34.
52. Di Gesu R, Acharya AP, Jacobs I, Gottardi R. 3D printing for tissue engineering in otolaryngology. *Connect Tissue Res.* 2020;61(2):117-36.
53. Yan WC, Davoodi P, Vijayavenkataraman S, Tian Y, Ng WC, Fuh JYH, et al. 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;132:270-95.
54. Vijayavenkataraman S, Lu WF, Fuh JY. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication.* 2016;8(3):032001.
55. Ng WL, Wang S, Yeong WY, Naing MW. Skin Bioprinting: Impending Reality or Fantasy? *Trends Biotechnol.* 2016;34(9):689-99.
56. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016;34(4):422-34.


57. Cubo N, Garcia M, Del Canizo JF, Velasco D, Jorcano JL. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication*. 2016;9(1):015006.
58. He P, Zhao J, Zhang J, Li B, Gou Z, Gou M, et al. Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns Trauma*. 2018;6:5.
59. Varkey M, Visscher DO, van Zuijlen PPM, Atala A, Yoo JJ. Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? *Burns Trauma*. 2019;7:4.
60. Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(6):473-84.
61. Pourchet LJ, Thepot A, Albouy M, Courtial EJ, Boher A, Blum LJ, et al. Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(4).
62. Wang R, Wang Y, Yao B, Hu T, Li Z, Huang S, et al. Beyond 2D: 3D bioprinting for skin regeneration. *Int Wound J*. 2019;16(1):134-8.
63. Gu BK, Choi DJ, Park SJ, Kim YJ, Kim CH. 3D Bioprinting Technologies for Tissue Engineering Applications. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1078:15-28.
64. Ng WL, Qi JTZ, Yeong WY, Naing MW. Proof-of-concept: 3D bioprinting of pigmented human skin constructs. *Biofabrication*. 2018;10(2):025005.
65. Pati F, Cho DW. Bioprinting of 3D Tissue Models Using Decellularized Extracellular Matrix Bioink. *Methods Mol Biol*. 2017;1612:381-90.

VII. Annexes

Annexe 1 : Checklist du prélèvement de face

1	Marquage des incisions sur la face du donneur (coronal / pré-tragien / peau cervicale latéralement)
2	Incision cervicale pour disséquer les vaisseaux à leur origine
3	Repérage et libération du muscle sternocleidomastoïdien (SCM) pour exposer les vaisseaux
4	Exposition de la veine jugulaire externe (VJE)
6	Dissection de la carotide externe (CE) et du tronc thyrolinguo facial (TLF)
7	Repérage de la division du muscle digastrique
8	Section du ventre postérieur du muscle digastrique
9	Identification du nerf hypoglosse (source de greffe nerveuse si nécessaire)
10	Section du conduit auditif externe
11	Exposition du nerf facial en pré-tragien pour obtenir une longueur maximale
12	Dissection de l'artère maxillaire
13	Ligature de l'artère maxillaire
14	Même dissection du côté controlatéral
15	Incision du cuir chevelu (incision coronale)
16	Libération du cuir chevelu dans un plan sous-périosté
17	Section du nerf supra-orbitaire au ras du foramen supra-orbitaire
19	Section horizontale de la paupière supérieure (avec la quantité maximale de conjonctive)
20	Section du canthus latéral
21	Section de la paupière inférieure (avec la quantité maximale de conjonctive) : une dissection nette à travers le fornix inférieur juste à l'intérieur du rebord orbitaire inférieur permet une dissection à travers les graisses orbitaires
22	Localisation du nerf infra-orbitaire
23	Section du nerf facial et prélèvement de la parotide en longeant le masséter
24	Réalisation des ostéotomies des os propres du nez (OPN)
25	Section du septum nasal longitudinalement
26	Section de la muqueuse du vestibule labial supérieur
27	Section de la muqueuse du vestibule labial inférieur
28	Section du nerf mentonnier au ras du foramen mentonnier
29	Prélèvement de l'ensemble avec la glande sous-mandibulaire en préservant l'artère faciale
30	Connection des plans sur la ligne médiane et au niveau de la cavité buccale, au-dessus du muscle sterno-hyoïdien et omo-hyoïdien +/- veines jugulaires antérieures
31	Ligature des vaisseaux
32	Rinçage du greffon au sérum hépariné

Annexe 2 : Protocole de prélèvement du bas abdomen humain.



IIAM Lower abdominal wall TISSUE

THIS FORM is part of the IIAM Quality Assurance Program. It is the responsibility of each OPO to procure organ according to this Recovery Protocol and to offer full disclosure of physical observations, including but not limited to discoloration, nodules, metastasis, vascular abnormalities, surgical hardware, for each donor organ/tissue procured for medical research. Failure to do so may impact the ability for this donor gift to contribute to the study for which it was intended and may additionally result in modifications to the reimbursement for procurement (as well as ongoing shipping costs). By signing this form, you are acknowledging that the protocol (and disclosure) requirements were followed and met.

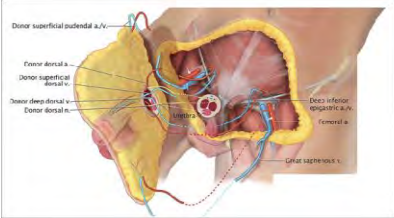
Surgical Recovery Instructions (Including Recovery Diagram):

General principle:

- Under sterile conditions in OR.
- Scrub face with antiseptic solutions (Iodine or Chlorhexidine).
- Please do not remove outer skin on penis.**
- Please recover the penile with bilateral fasciocutaneous flaps, scrotum and the abdominal wall. (see pictures below).

Harvesting process detailed:

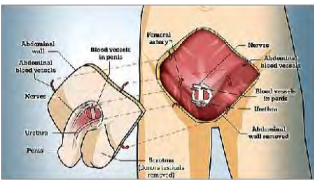
- Make the preoperative drawing of the incision line including the penis, the two lateral flaps (with the external pudendal vessels inside), the scrotum and the abdominal wall.
- Incise the upper border of the drawing (low abdominal wall line) and expose the superficial pudendal vessels entering to the femoral vessels. Make this dissection from lateral to medial.



- Gently dissect away the most distal corporal tissue surrounding both cavernosal arteries to expose approximately 1 cm of vessel length, bilaterally.

4/10/2020

- Expose the superficial dorsal vein, deep dorsal vein, dorsal arteries, and dorsal nerves at the base of the penis in a similar fashion as above, preserving as much length proximally as possible.
- Transect sharply the entire shaft at the base of the scrotum, separating the graft from the donor cadaver.
- Dissect the cavernosal arteries from the surrounding corpora as above.



- Catheterize the dorsal (2), cavernosal (2) and external pudendal (2) arteries and the vein of the penile tissue with a catheter of a size adapted to the size of the vessels, in the least traumatic way possible (around 24-gauge intravenous catheter).

Storage & Packaging Instructions (Including Type of Storage Solution & Amount):

- Rinse the tissue harvested with Normal Saline.
- Using sterile forceps, transfer to a sterile container with Transport Media (DMEM with 50 µg/mL Gentamicin – Provided by IIAM researcher).
- Fill the container with Transport Media (NO LESS THAN 3 volumes of media). Close the container tightly.
- Please label outside of container with UNOS ID #/Tissue Donor #. Store & ship tissue on lots of wet ice.

The penile and abdominal tissue is never in direct contact with the ice.
If there is no transport media and container, the flap should be wrapped in compresses and placed in a plastic bag that is placed on the ice.

Research Synopsis (To be shared with donor's family):

The donation of some lower abdominal tissue of your relative will help people who unfortunately suffer from penile defect.

None of the cells in your loved one's face will be conserved and through a chemical process we have the ability to remove all of them while keeping the organ matrix. We are working on a process that will then allow us to put the cells of the damaged victim back into the matrix and thus make up for this very disabling tissue defect.

This can dramatically improve the lives of hundred of people.

4/10/2020

Annexe 3 : Justification des analyses histologiques réalisées et non réalisées.

Colorations :

Histologie :	Rôle et localisation ?	Justifié pour l'étude ?
Haemotoxylin and Eosin (H&E)	Structure générale des tissus Localisation des noyaux et des protéines extracellulaires.	Oui.
Masson Trichrome	Collagène et préservation des muscles.	Oui.
Alcian blue	Évaluation des protéoglycanes/mucines Substances muqueuses acides : avec échantillon de lèvre et évaluation de la conservation de la lèvre.	Oui.
Safranin O	Évaluation des protéoglycanes : cartilage, mucines et granules de mastocytes.	Oui.
Miller's elastin/alcian	Évaluation des fibres conjonctives élastiques	Oui.
Miller's blue/sirius Red stain	Évaluation du collagène et de l'amyloïde.	Non nécessaire car nous avons déjà la coloration de Masson Trichrome.

Immunohistochimie:

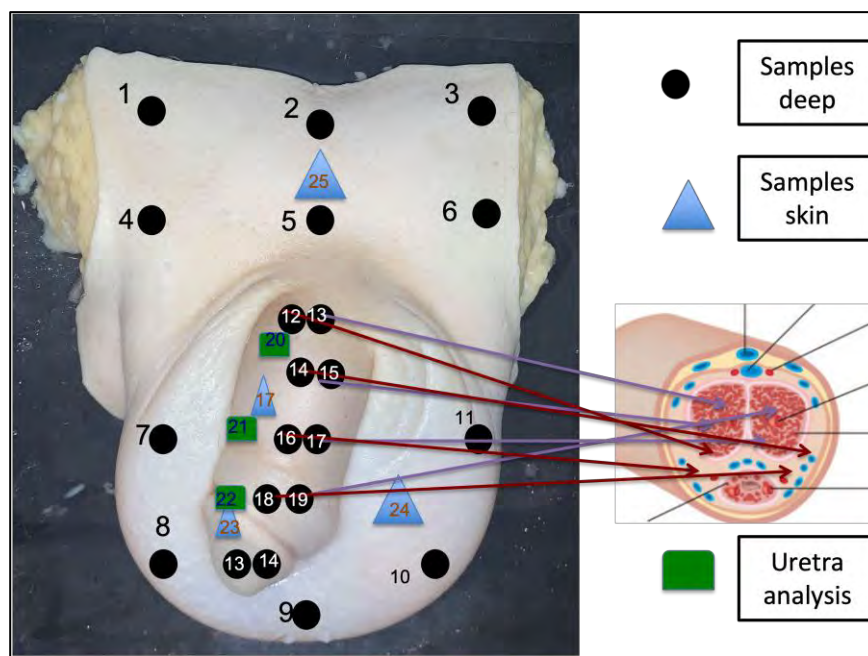
MHC-I	Analyse de la présence de HLA A, B, C après décellularisation. Analyse de la présence de l'antigène MHC-I. Nous espérons qu'elle sera négative.	Oui.
Anti-CD31	Marqueur de cellules endothéliales. Évaluation de la néovascularisation, les matrices ne doivent pas être colorées.	Oui.
Anti-TGF-B1	Préservation du facteur de croissance (Facteur clé du remodelage et de la régénération des tissus, il est donc important qu'il soit encore présent).	Oui.

ImmunoFluorescence:

Anti-collagen IV	Évaluation de l'ECM. Ce type est important car il est le principal composant collagène de la membrane basale. Nous espérons qu'il sera préservé.	Oui.
Anti-laminin	Évaluation de l'ECM. Nous espérons qu'elle sera préservée.	Oui.
DAPI	Contre-coloration nucléaire. Confirmer l'efficacité de notre processus de décellularisation.	Oui.
Anti-myosin et Anti-sarcomeric alpha actinin	Évaluer la préservation de la chaîne lourde de la myosine et de la préservation de l'alpha actinine sarcomérique, composants de l'appareil contractile du muscle squelettique.	Non. Il s'agit de protéines intra cellulaire et si les cellules sont éliminées correctement et que ceci est confirmé par des colorations H&E et DAPI, il n'y aura pas de signal positif dans le tissu décellularisé. Il n'est pas nécessaire de le faire dans le tissu décellularisé.
Anti-neurofilament H	Évaluation des neurofilaments des axones.	
Anti-S100 calcium binding protein B	Présent dans les cellules gliales.	
Anti-Von Willebrand factor	Évaluation du potentiel de coagulation. Glycoprotéine sanguine impliquée dans l'hémostase.	
Anti-fibronectin	Évaluation de la MEC. Nous espérons qu'il sera préservé.	Oui.

Anti-VEGF	Évaluation du facteur de croissance endothélial vasculaire. Nous espérons qu'il sera conservé.	Oui.
-----------	--	------

Annexe 4 : Zones de prélèvement des échantillons pour les analyses histologiques et ADN du greffon de bas abdomen.



Annexe 5 : Liste des financements et des prix

(2019) ARS – Sub-division Toulouse - Année recherche.

(2019) Bourse de la vocation Fondation Marcel Bleustein-Blanchet.

(2020) Bourse BNP Paribas - Upec.

(2020) (Cetrulo/Uygun) 2020/2023

Shriners Hospital for Children-Boston. Recellularization of vascularized engineered scaffolds for facial reconstruction.

(2020) Nominée au prix du forum de la recherche chirurgicale – Académie de chirurgie.

(2021) Approbation d'un Visa 0-1A par le service d'immigration des États-Unis (USCIS).

(2022) Prix des Chirurgiens de l'Avenir 2021 (Upec - Parcours 3R).

Engineering Vascularized Composite Allografts Using Natural Scaffolds: A Systematic Review

Elise Lupon, MD,¹⁻⁴ Alexandre G. Lellouch, MD, MSc,²⁻⁵ Aylin Acun, PhD,^{3,6} Alec R. Andrews, BS,²⁻⁴ Ruben Oganessian, MD,^{3,6} Marion Goutard, MD,²⁻⁵ Corentin B. Taveau, MD,⁵ Laurent A. Lantieri, MD,⁵ Curtis L. Cetrulo, Jr., MD, FACS, FAAP,²⁻⁴ and Basak E. Yugun, PhD^{3,6}

Vascularized composite allotransplantation (VCA) refers to the transplantation of multiple tissues as a functional unit from a deceased donor to a recipient with a severe injury. These grafts serve as potential replacements for traumatic tissue losses. The main problems are the consequences of the long immunosuppressive drugs and the lack of compatible donor. To avoid these limitations, decellularization/recellularization constitutes an attractive approach. The aim of decellularization/recellularization technology is to develop immunogenic free biological substitutes that will restore, maintain, or improve tissue and organ's function. A PubMed search was performed for articles on decellularization and recellularization of composite tissue allografts between February and March 2021, with no restrictions in publication year. The selected reports were evaluated in terms of decellularization protocols, assessment of decellularized grafts, and evaluation of their biocompatibility and repopulation with cells both *in vitro* and *in vivo*. The search resulted in a total of 88 articles. Each article was reviewed, 77 were excluded, and the remaining 11 articles reported decellularization of 12 different vascular composite allografts in humans (4), large animals (3), and small animals (rodents; 5). The decellularization protocol for VCA varies slightly between studies, but majority of the reports employ 1% sodium dodecyl sulfate as the main reagent for decellularization. The immunological response of the decellularized scaffolds remain poorly evaluated. Few authors have been able to attempt the recellularization and transplantation of these scaffolds. Successful transplantation seems to require prior recellularization. Decellularization/recellularization is a promising, growing, and emerging developing research field in vascular composite allotransplantation.

Keywords: decellularization, recellularization, vascularized composite allotransplantation

Impact Statement

Tissue engineering for vascular composite allotransplantation using decellularization and recellularization approach is a fast-growing area of interest in the reconstructive surgery field. This review will be a very useful tool to get a clear overview for researchers interested in this field.

Introduction

VASCULARIZED COMPOSITE ALLOTRANSPLANTATION (VCA) is the transplantation of multiple tissues, such as skin, nerve, muscle, tendon, cartilage, and bone, as a

functional unit (e.g., a hand, or face) and has emerged as a feasible option to restore anatomically complex defects that cannot be addressed by autologous graft reconstruction.¹ The first VCA surgery took place in 1964 with the first hand allotransplantation, but it was in 1999 when the

¹Department of Plastic Surgery, University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

²Vascularized Composite Allotransplantation Laboratory, Center for Transplantation Sciences, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

³Shriners Hospitals for Children-Boston, Boston, Massachusetts, USA.

⁴Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA.

⁵Department of Plastic Surgery, European George Pompidou Hospital, University of Paris, Paris, France.

⁶Center for Engineering in Medicine and Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

first successful immunosuppressive therapy protocol enabled long-term graft acceptance of a vascular composite allograft.² Over the last 2 decades, more than 200 VCAs were performed around the world. Despite the immunosuppressive regimen to prevent graft loss, there is still the risk of acute and chronic rejection. Acute rejection of the VCA, with skin as its primary target, occurs in up to 90% of patients, most of whom experience at least one such episode within the first year posttransplantation and almost 60% develop multiple episodes.³ Furthermore, the complications associated with the life-long and high-dose immunosuppressive therapy make VCA a high-risk procedure posing a significant ethical dilemma regarding this reconstructive procedure.⁴

Tissue engineering offers tools to create alternative tissues for VCA that would potentially serve as an autologous tissue and eliminate the need for immunosuppression, minimizing the risks of this life-changing procedure for patients. One such tool is tissue decellularization and recellularization, an approach that involves removal of native cells from discarded tissue to yield an extracellular matrix (ECM) scaffold and its subsequent repopulation with healthy and patient-derived cells to recreate the tissue microarchitecture.⁵ Decellularization is achieved by treating the tissue or organ with detergents, enzymes, or chemicals either by simple immersion or perfusion through vasculature.⁶ The resulting scaffold is composed of native ECM that has the composition and architecture of the native tissue, which has been proven to be difficult to replicate using bottoms up approaches.⁷

The advantages of a decellularized ECM scaffold are several. First, the vascular architecture of the tissue is preserved in a perfusion decellularized scaffold, which enables perfusion and nutrient delivery to the cells seeded in the scaffolds. The preserved vascular bed also facilitates connection to the blood circulation upon transplantation. Second, the maintenance of ECM components provides tissue-specific biochemical and biomechanical cues, which may facilitate cell attachment and tissue remodeling, and subsequent tissue function upon repopulation with cells.⁵

While tissue decellularization has been used in tissue engineering for preparation of biological scaffolds for dermal, vascular, and small intestinal submucosa tissues, its application as perfusion decellularization in solid organs, such as the liver, heart, and lungs, has attracted much attention during the last two decades.⁸ More recently, the ability to preserve the native tissue vascular bed and the microarchitecture by perfusion decellularization has fueled its exploration in VCA applications. In this systematic review, we provide an insight on the current status of research in engineered VCA grafts using decellularized scaffolds.

Methods

A PubMed search was performed for articles in all languages on decellularization and recellularization of composite tissue allografts, with no restrictions in publication year using the following keywords: “plastic surgery and decellularization,” “plastic surgery and recellularization,” “vascularized composite allotransplantation and decellularization,” “vascularized composite allotransplantation

and recellularization,” “vascularized composite allotransplantation and tissue engineering,” “composite tissue decellularization,” “composite tissue recellularization,” “flap decellularization,” and “flap recellularization.”

Article selection and inclusion/exclusion criteria

Original research articles were selected for review based on the title and abstract. These articles exclusively reported a decellularized specimen that can be used in plastic surgery. Work in the field of orthopedic surgery such as isolated decellularization of bone, tendons, and ligaments as well as decellularization of muscle with pedicle and skin biopsies were excluded from the analysis, as they do not meet the exact definition of VCA. Articles explaining generalities of decellularization and recellularization, without describing the specific decellularization of a specimen were excluded. Non-English publications were excluded.

Data collection

For each publication, we indexed the decellularized specimen, if specified. The decellularization protocol used was detailed (specifying the decellularization method chosen, the agents used, their concentrations, and treatment durations). Results in terms of vasculature and ECM integrity and immunogenicity tests were listed. The attempt at recellularization was specified, including its protocol. Finally, the transplantation of the specimen, if it took place, was noted.

Results

The PubMed search was performed between February and March 2021 using the keywords listed above. The search resulted in a total of 88 articles. Each article was reviewed, 77 were excluded: 50 were out of scope (i.e., review articles), 20 were in the orthopedic field (e.g., tendons, ligaments, muscles, etc.), and 7 involved partial VCA (e.g., skin biopsy, muscle section). The remaining 11 articles reported decellularization of 12 different vascular composite allografts in humans (4), large animals (e.g., pig, nonhuman primate [NHP]; 3), and small animals (rodents; 5) (Fig. 1). The details of each study are given in Table 1.

Briefly, the studies included in this review reported decellularization of rat abdominal fasciocutaneous flaps,^{9,10} rat upper limbs,¹¹ primate upper limbs,¹¹ rat groin skin/adipose tissue flap,¹² porcine fasciocutaneous groin flap,¹³ human lower face and full face,¹⁴ a human ear,¹⁵ a full human cadaveric upper extremity,¹⁶ a full-thickness rat hemiface,¹⁷ a porcine ear,¹⁸ and a whole human penis.¹⁹ These reports were evaluated in terms of decellularization protocols, assessment of decellularized grafts, and evaluation of their biocompatibility and repopulation with cells both *in vitro* and *in vivo*.

Preparation of decellularized VCA scaffolds

Tissue procurement. Tissue procurement technique strongly affects the quality of the decellularized graft as the integrity of the vasculature and overall tissue architecture directly determines the perfusability and the uniformity of the decellularization process. In the publications reviewed, the VCAs from nonhuman primates, swine models, and

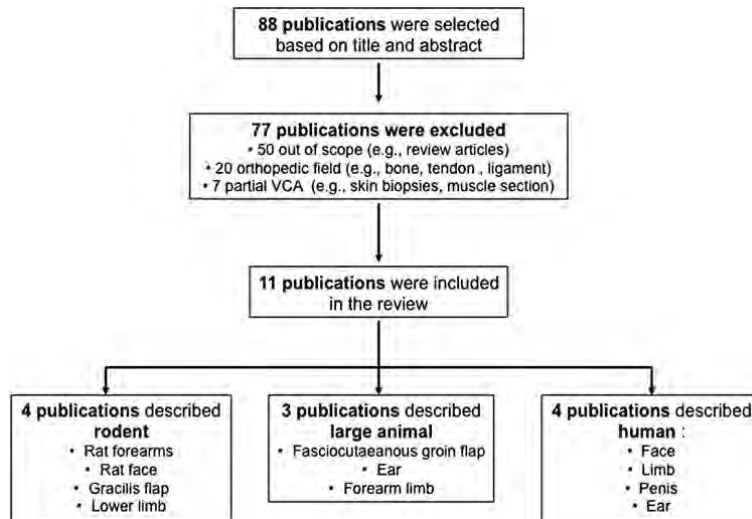


FIG. 1. Flow chart.

rodents were cannulated and decellularized immediately after harvesting, except in Zhang *et al.*¹², where the rat skin/adipose tissue flap was subjected to three freeze/thaw cycles before decellularization.

Human VCAs present challenges for procurement since they are less frequently donated than internal organs due to the significant visual deterioration of the donor body.²⁰ In addition, fresh tissue may not be immediately available for harvesting from brain dead donors. Nonetheless, VCAs have been obtained from deceased donors several days postmortem and were successfully decellularized without significant damage to the gross morphology of the graft.^{14–16} The preservation of the structural integrity postmortem can be attributed to low cellularity of the tissue and high density of the ECM proteins in the particular grafts.

Decellularization protocols. The decellularization protocols for VCAs vary slightly between studies, but the majority of the reports employ 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) as the main reagent for decellularization.^{9,11,13–19} SDS is an ionic detergent and has been widely used in decellularization of other organs.^{21–24} While it is very effective in removing cellular proteins and nucleic acids, SDS may also lead to removal of ECM-associated components, such as growth factors and glycosaminoglycans (GAGs), from the resulting scaffolds.⁵ Commonly, the VCA is exposed to the detergent through perfusion through the pedicle of the graft and decellularization is uniformly achieved throughout the graft. While Duisit *et al.*¹⁷ recommends avoiding decellularization only by immersion in the SDS, no studies have been published showing its ineffectiveness to date. Furthermore, Henderson *et al.* successfully decellularized fourteen abdominal rat fasciocutaneous flaps through incubation in 0.1% sodium azide, 40 IU/mL DNase, and 4% sodium deoxycholate.⁹ Similarly, rat fasciocutaneous flaps were successfully decellularized using

0.25% trypsin-EDTA through incubation without perfusion.¹² In these studies, the incubation periods in detergent were accompanied with agitation to improve the detergent penetration. However, decellularization by agitation is not recommended as the study by Duisit *et al.* reports deterioration of decellularized pig ears due to the trauma inherent in this method.¹⁷

The first indicator of the effective removal of cells from the VCA is the progressive change of its color to a white or even transparent color during decellularization as we have also shown with different VCAs, including human face (Fig. 2A, B), porcine skin (Fig. 2C, D), and rat limbs (Fig. 2D, E). Fat tissue can remain significantly yellow even in the case of effective decellularization. The color change happens within the first few hours to first few days of detergent treatment.⁹ However, complete removal of cells and all cellular materials throughout the VCA requires longer treatment times. The duration of decellularization varies with the surface area of the VCAs, from 7 days for the smallest VCAs (e.g., rodent flap)¹² to 60 days for the most complex (e.g., human arm).¹⁶

The perfusion pressure is a critical parameter to control to avoid damage to the microvascular architecture of the VCAs. The decellularization of human ear, human face, human limb, and porcine ear grafts was achieved by controlling the flow rate of the perfusion to achieve 80 mmHg pressure or less^{14–16,18} throughout the decellularization. The resulting flow rates varied from 0.6 to 8 mL/min, depending on the study. However, some studies reported using higher target pressures, aiming for equal to or less than 200 mmHg throughout the decellularization of rat and primate limbs¹¹ or porcine skin flaps.^{11,13} It was reported that the pressure balance may be difficult to maintain during SDS perfusion due to sudden changes in internal pressures such that it requires very minimal flowrates,¹² showing the importance of constant pressure monitoring throughout the decellularization process.

TABLE 1. SUMMARY OF THE MAIN CHARACTERISTICS OF THE VASCULARIZED COMPOSITE ALLOTRANSPLANTATION DECELLULARIZATION

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	Transplantation	References
Human cadaver: five SF-G one FF-G fresh tissue (4°C, 12–96 h from death)	12 Days MAP <80 mmHg HS (1.5 L) + Ad (10 µM) -> 1% SDS (70 L) -> DW (6 L) -> 1% TT (9 L) -> PBS (30 L) ISO (1 L stirring-bath overnight)-then perfuse (2 L, 12 h)—then ISO 1 L stirring bath overnight -> perfusion DW (1 L) -> perfusion PBS (26 L) Type I bovine DNase + PBS (10 L) perfusion	DNA quantification Fluorescopy (SF-G) Injected CT-Scanner (FF-G) Histology: standard protocols, staining with H&E and MT IHC with MHC-I and anti- CD31, hematoxylin IF: anti-collagen IV, anti- laminin and DAPI ECM analysis: proteins (collagen, GAG, elastin), growth factors, and cytokines	Sterilization: 0.1% peracetic acid Static Disc Cell seeding (14 days): 50 × 10 ⁶ NIH-3T3 dermal fibroblast + 4 × 10 ⁶ C2C12 myoblast progenitor cell lines with 1% FBS + DMEM supplementation Whole lip bioreactor cell seeding: perfusion-bioreactor filled with DMEM, 1% FBS + 70,10 ⁶ C2C12 cells injected into scaffold + 25,10 ⁶ HAEC immersed in MV2 and injected in facial arteries	Reduction DNA 97% Well-preserved vasculature Excellent integration of the graft and vessels in 3D Histology: indicative of cell nuclei, negative MHC-I antigen staining, the cartilage did retain some cells with a negligible impact on DNA content ECM structural preservation ECM content (compared with native tissue): Collagen: high ↑ Elastin: ↓ (except fat, best preserved) GAG: ↓ skin, mucosa, muscle, → fat and cartilage IL-8 and GM-CSF: ↓ SSDF-1α, IL-10, TNF-α, IL6 → Dises: Viability, attachment and proliferation of NIH-3T3 and C2C12 but limited migration Lip bioreactor seeding: C2C12 migrated in matrix (parenchyma +), HAEC viable, attached and homogeneous in vessels but presence in graft (vessels leakage)	Sterilization: 0.1% peracetic acid Decellularized SF-G transplant on one porcine recipient (heterotopic) Facial arteries anastomoses with abdominal aorta and inferior mesenteric artery Reperfusion for 4 h	14
Twelve human ear graft Fresh tissue (4°C, 1–4 days from death)	8.6 Days MAP <80 mmHg HS (1 L) + Ad (10 µM) 4°C -> 1% SDS (88 h, 36.5 L) -> DW (3 h, 1.2 L) -> 1% TT (25 h, 10 L) -> PBS (38 h, 16 L) 100% 2-propanol (4 h, 1 L perfusion) then transferred to stirring bath overnight -> DW (2 h) -> PBS (30 h) Type I bovine DNase + PBS (6 h) -> PBS (12 h)	DNA quantification Fluorescopy Histology: standard protocols, staining with H&E and MT, Alcian Blue, Safranin O, and Miller's Elastin / Alcian, Blue/Sirius Red stain IHC IF: anti-collagen II and IV, DAKO SEM ECM analyses: proteins (collagen, GAG, elastin), growth factors, and cytokines Ball burst test, tensile test Biopsies implanted subcutaneously (decellularized and native ear) on 16 Wistar rats Flow cytometry	Sterilization: 0.1% peracetic acid 24-well plate: 3.6 × 10 ⁷ cells/cm ² rASCs DMEM supplementation CO ₂ incubator (14 days) Vital staining then Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit Whole graft bioreactor cell-seeding: perfusion-bioreactor filled with DMEM, 5% CO ₂ + 30,10 ⁶ HAEC immersed in MV2 and injected through arterial line Analysis of cell viability using live/ dead assay, MTT, CD31, IHC staining	Reduction DNA 97.3% Well-preserved vasculature (fluorescopy): no extravasation Excellent integration of the graft and vessels in 3D Histology: cellular clearance in skin and adnexa, negative MHC-I antigen staining, the cartilage did retain some cells with a negligible impact on DNA content ECM structural and ultrastructure preservation No detergent crystal, porosity of whole biopsy volume ↑ ECM content (compared with native tissue): Collagen: high ↑ Elastin: ↓ skin → cartilage GAG: ↓ skin and cartilage Cytokines: ↓ for all in skin, → fat (except IL-4), ↓ for 22/44 cytokines in cartilage, ↑ TGF-beta1, TGF-beta3 and CXCL5 ↓ Stiffness ↑ maximum engineering stress and ↑ dispersion Homogeneous engraftment of viable rASCs Flow cytometry: no IgG detection In vivo study histology: vascular and cellular infiltration, limited remodeling, CD68 ⁺ macrophage infiltration, poor anti-CD3 response Bioreactor seeding: viable HAEC in superficial and deep part on the endothelial wall of vessels, segmental seeding cover	No	15

TABLE 1. (CONTINUED)

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	Transplantation	References
One full human cadaveric upper extremity Explanted within 24h postmortem and snap frozen for shipment Thaw overnight at 4°C	60 Days MAP <80 mmHg HS (6L) -> DW (40L) -> 1% SDS (30 days) -> 1% TT (15 days) DW (15 days) -> PBS (50L)	DNA quantification Injected CT scanner (omnipaque) Injected micro-CT scanner (microfi) Histology: standard protocols, staining with H&E and MT, Verhoeff's elastic stain, Safranin O IF: anti-myosin, anti-Sarcomeric alpha actinin, anti-laminin, anti-collagen IV, anti-Neurofilament H, anti-S100 calcium-binding protein B, DAPI ECM analysis: proteins (collagen, GAG, elastin) Biochemical assay with StrocI quantitative assay	No	Removal of nuclei from all the tissue types, 4.6-fold reduction in double-strand DNA content Successful perfusion and preservation of the small vessels in the decellularized hand ECM structural preservation (collagenous, elastic fibers) Bone marrow and tendon nuclei removed, bony structure preserved ECM content (compared with native tissue): Collagen: ↓ (soluble > insoluble, muscle ++) Elastin: ↓ GAG: → IF: Reduction in proteoglycan content Muscle tissue: myosin heavy chain and alpha actinin fully removed, Laminin and collagen preserved Nerves: Axons neurofilaments and S100 calcium-binding protein B removed; laminin and collagen IV preserved Skin, vessel: laminin preserved Reduction DNA <50 ng/mg tissue Well-preserved vasculature No nuclei Intact ECM with histologic architecture preservation on H&E and SEM Preservation of key proteins such as collagen-1, laminin, and fibronectin and retention of growth factors VEGF (45%), EGF (57%), and TGF-beta1 (42%) on ELISA Recellularization: Higher expression of VWF, COL1, SM22, and Desmin Formation of microtubules and increased endothelial marker expression in the cavernosa	No	16
One whole-organ human penis	14 Days MAP difficult to control, necessity to decrease flow rate (1 mL/min) 1% SDS -> DW +1% antibiotic/antimycotic Slow mechanical agitation (50rpm) SDS solution changed every 2 days	DNA quantification Micro-CT (microfi) Histology: standard protocols, staining with H&E IHC IF: alpha SMA, anti-collagen I, anti-CD31, anti-laminin, anti-fibronectin, DAPI ELISA kits VEGF, EGF, TGF-beta1 in cavernosa, tunica and urethra SEM ECM analysis: proteins (collagen, laminin, fibronectin), growth factors	Sterilization: PBS +1% antibiotic/antimycotic 300 µm thickness slices of decellularized penis Deposited into Petri dishes Emulsification in medium 30 min, 37°C Semidried at room temperature 30 min (hood) 1 × 10 ⁶ cells/cm ² human adipose-derived stromal vascular cells DMEM supplementation Seeded in T75 flasks After reseeding: analysis of days 14 and 28 Analysis of cell viability using live/dead assay; cells proliferation, IF: differentiation of cells with aSMA+ cells, CD31+ cell in cavernosa Endothelial cells throughout the penis tissue qPCR: ↑ vWF, SM22, desmin	No nuclei Preservation of key proteins such as collagen-1, laminin, and fibronectin and retention of growth factors VEGF (45%), EGF (57%), and TGF-beta1 (42%) on ELISA Recellularization: Higher expression of VWF, COL1, SM22, and Desmin Formation of microtubules and increased endothelial marker expression in the cavernosa	No	19

(continued)

TABLE 1. (CONTINUED)

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	References
A porcine fasciocutaneous groin flap	10 Days MAP <200 mmHg PBS (2h) -> 1% SDS (10 days) -> DW (2L) -> 1% TT (1 day) -> DW (2L) -> PBS (6L) Single pass	DNA quantification Colorimetric assays: elastin, GAGs, insoluble collagen Histology, SEM, IF Biaxial mechanical testing Biocompatibility testing <i>in vitro</i> : 4×10^5 hMSCs in six-well plates Immunological response testing: implantation in xenogenic rats of DeS samples, native samples, Permacol and Aloderm samples, and analysis after 2 weeks Epidermal permeability barrier with biotin applied on native, decellularized, regenerated samples	Reconstruction of epidermis <i>in vitro</i> : Six-well plates Human keratinocyte Cultured 7 days Stratification induction (EpiLife medium, air/liquid interface) Biotin permeability assay Regenerative performance <i>in vivo</i> : 6mm full-thickness skin defect 6mm scaffold sutured on the created skin defect Assessment of cellular infiltration, histology, IF, IHC, immune cell (IF and staining for CD68, CD3) at day 14 Assessment of barrier function Perfused tissue culture 5 days: 40 million HUVECs after 2 h static cell culture	Reduction DNA 77% (455 ng/mg) Histology and SEM: epidermis removal, ultrastructure preserved, dermis, no nuclei, collagen I, III, laminin, elastin Quantification: 98% of insoluble collagen retained 56% of GAGs retained 30% of elastin Same stiffness as native Full biocompatibility of the scaffold compared with plastic culture (control) but different cell morphology Formation of a bioengineered epidermis-like structure (= stratified barrier impermeable to biotin penetration) Recellularization: <i>In vivo</i> immunological response: extensive cellular infiltrate, local inflammation, irregular border between DeS and host, 100% infiltration, neovascularization, tissue morphology retained DeS implantation in defect: Fully integrated graft, neovascularization, surface covered by regenerated epidermis, barrier function Reduction DNA 91.3%, residual cell groups in cartilage No nuclei Intact ECM with histologic architecture preservation on H&E and SEM; epidermis loss Architectural preservation of ECM-associated proteins SEM: Dense fibrous matrix and reticular fibers and preservation of functional structure (dermal papilla) Angio-CT: Well-preserved vasculature, no leakage <i>In vivo</i> test: No SLA antigen markers in DeS No production of anti-donor SLA specific antibodies at 1 month Implantation well tolerated No inflammatory processes Repopulation of the DeS Sign of revascularization Recellularization: growth of three different types of cells Cos-7 homogeneous distribution and proliferation Fat formation at day 14 Bioreactor: yellowish aspect, increased lipid NIH-3T3: 94% cell engraftment, important amount of living cells, homogeneous distribution (extra and intravascular) but poor overall cell density Mechanical testing: Cartilage: no difference between decellularized and native tissue Skin: elastic modulus ↓ in DeS	13
A Porcine ear	No mention of duration MAP <80 mmHg HS + Ad (1L) -> 1% SDS (44.5L) -> DW (2L) -> 1% TT (3.5L) -> PBS (28L) Type I bovine DNase (1L) -> PBS (2.5L)	DNA quantification GAGs, elastin, collagen quantification Histology: standard protocols, MT, Safranin O (proteoglycans), staining with H&E IHC: Hematoxylin, anti-TGF-β1 IF: anti-SLA Iε, anti-collagen IV, anti-CD31, anti-laminin, anti-fibronectin, anti-van Willebrand factor, anti-VEGF, DAPI SEM Mechanical testing (Young's modulus) <i>In vivo</i> allocompatibility testing (DeS in swine pouch for 30 days) and screen anti-SLA Iε-Ic alloantibodies Angio-CT	Sterilization: 0.1% peracetic acid+PBS perfusion Static Disc Cell-seeding (9 days): 2.6×10^6 cos-7 progenitor cell lines (fibroblastic) with 1% FBS + DMEM supplementation 10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% PBS CO ₂ bioreactor Histology: H&E, anti-Ki67, IHC staining 1.5×10^5 green fluorescent-positive pBM-MSCs + PM or ADM days 15 and 25: histology and GFP visualization (IF) Whole ear bioreactor cell-seeding (2 weeks): PM perfusion-bioreactor + $16,10^6$ pBM-MSCs cells injected into arterial inlet IHC: collagen I, DAPI Engraftment assessment: $70,10^6$ NIH-3T3 cells seeded At day 10: cell count, vital treatment (Live/Dead), H&E	One decell ear replantation orthotopically in an adult pig End-to-side anastomosis with common carotid artery and internal jugular vein of the recipient After clamp release: permeability despite endothelial layer missing, no leak, color similar to normal ear Flow within the acellular graft for 3h: thrombosis (euthanasia) Histology: cellular engraftment, tissue preservation	18

(continued)

TABLE 1. (CONTINUED)

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	Transplantation	References
Rat upper limbs	Around 7 days MAP: 20–185 mmHg % Difficulty to control PBS (5 mL) -> 1% SDS (50h) -> DW (1h) -> 1% TT (1h) -> PBS + Streptomycin (124h) Sterile condition	Microtomography (bone morphology, mineral density) pDXA assessment: bone mineral density bone mineral content Mechanical testing of bone: Radii assessment Bending stiffness Modulus of elasticity Bending strength Fracture energy Passive tension tendon testing LC-MS/MS proteomic matrix analysis Histology: MT, H&E or Russel-Movat's Pentachrome % IHC % Isometric force measurement: days 14–16 of <i>in vitro</i> culture % Morphometric measurement of myofibers %	Bioreactor cell-seeding: (21 days) % Days 0–3: perfusion of DeS with C2C12 growth medium % From day 3: Addition of 3% horse serum and EGM 2 BulletKit™ Standard culture condition Closed circuit system %—medium perfusion—bioreactor filled with DMEM, 1% FBS+cells (HUVECs first, then C ₂ C ₁₂ and fibroblasts) % From day 6: electrical stimulation (improve the formation of functional muscle) Two different seeding strategies: % day 0: 5 × 10 ⁶ HUVEC cells suspended in ECG media perfused through DeS brachial artery day 2: 10 × 10 ⁶ C ₂ C ₁₂ cells (myoblast) + % 0.5 × 10 ⁶ mouse embryonic fibroblasts % day 0: 10 × 10 ⁶ HUVECs through 20 injections % day 2: triculture injection (HUVECs+embryonic fibroblast+C ₂ C ₁₂) % Media: low-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 2% HEPES, VEGF, hydrocortisone, rhFGF-B, rhEGF, R3-IGF, ascorbic acid, and penicillin (100 IU/mL) %	Reduction DNA 90% % Preserved endomysial sheets % Microtomographic imaging: Complete preservation of 3D composite tissue architecture with decreased volume and signal intensity in soft tissues but maintained cortical geometry and tissue mineral density of bone tissue % pDXA: no significant effect of decellularization on mechanical, mineral, or geometric bone characteristics % Microtomographic angiography: presence of perfusable vascular channels throughout the entire graft flowing from larger to smaller vessels % Passive mechanical testing: Functional preservation of the entire skeletal muscular apparatus with intact osteolead junctions and maintained stability and full range of motion in joints of wrist, and digits % Preservation of collagens and GAGs (40%) within the muscle ECM % Histology & IHC: decellularization of all tissue compartments % Recellularization: % Trough vascular infusion: not suitable for muscle repopulation marginally distribution of myoblasts into muscle ECM with the majority of cells retained in the vascular conduit % Injection of the cells into the muscle ECM (surgical microscope): good engraftment and muscle-like tissue formation, BUT mechanical trauma -> ECM structure disruption, disturbing microcirculation, and cell integration into the matrix = areas of cell apoptosis at the injection site % Removal of cellular material in: bone tissue compartments % muscle % tendons % skin and subcutaneous tissue % neurovascular bundles % Preservation of ECM ultrastructure	Orthotopic limb transplantation onto isogenic SD rat % Anastomoses with cuff between graft brachial vessels and recipient axillary vessels, the brachial plexus approximated end-to-end % Outcome: permeability and functional (electrical stimulation) %	11
Primate upper limbs	Around 7 days MAP: 70 mmHg PBS (5 mL) -> 1% SDS (50h) -> DW (1h) -> 1% TT (1h) -> PBS+Streptomycin (124h)	Standard histology	No	Removal of cellular material in: bone tissue compartments % muscle % tendons % skin and subcutaneous tissue % neurovascular bundles % Preservation of ECM ultrastructure	No	11

(continued)

TABLE I. (CONTINUED)

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	Transplantation	References
Seven full-thickness rat hemiface	Two different protocols (room temperature): Perfusion through ECA (four grafts) around 5 days MAP <100 mmHg Perfusion flow 2–4 mL/min of: -> HS (1 h, 15 UJ/mL) -> 1% SDS (100 h) -> PBS (24 h) Mechanical agitation (three grafts) Around 9 days Medium speed Immersion of: HS (1 h, 15 UJ/mL) -> 1% SDS (140 h) -> PBS (72 h)	DNA quantification (kit) Fluorescopy Histology: standard protocols, staining with H&E and MT, Sirius Red, Safranin O IF: collagen I, DAPI Micro-Angio-CT injected	Sterilization: 0.1% peracetic acid+PBS perfusion Seeding on 1 cm ² Des (7 days): 5 × 10 ⁶ hASCs Dermal and internal surface 24-well plate Media: DMEM + 10% FBS + 1% Glutamine + 1% penicillin/streptomycin (changed every 2 days) Histology: Vital Live/dead staining IF with anti-collagen I & DAPI	Decellularization in both groups, except cartilage in the agitation-treated group: Perfusion group: Reduction DNA 91.5%, Faster, ear and nose morphology intact Agitation group: Reduction DNA 86.7%, slower, auricular tears, remaining chondrocytes and cells in dermis Well-preserved ECM (histology) Preserved vascular tree of the Des in both groups Seeded cells viable and well distributed in both groups: Well distributed Migration in the ECM	No	17
50 Rats abdominal fasciocutaneous flap	Five different protocols: Flush PBS+HS (15 min) at 0.2 mL/min before, then: Control Agitation in 1% SDS 72h + DW (15 min) + 1% TT (30 min) + PBS (1 h) Perfusion 1% SDS + Agitation in 1% SDS 12h + DW (15 min) + 1% TT (30 min) + PBS (1 h) Perfusion 1% SDS + Agitation SDS 1% 24h + DW (15 min) + 1% TT (30 min) + PBS (1 h) Perfusion 1% SDS + agitation in 1% SDS 72h + DW (15 min) + 1% TT (30 min) + PBS (1 h) Incubation 0.1% Sodium azide, 4% sodium deoxycholate	DNA quantification Gross morphology (photo) Histology: staining with H&E and MT, Verhoeff's Van Gieson stain. Microvasculature network perfusion (PBS +0.5% Evans blue dye)	No	White, almost transparent morphology, except in control, agitation-alone group, and perfusion+agitation 12h Reduction DNA in all groups but decellularization effective only after 24h of perfusion+agitation: Control: 1.53 µg/mg Agitation in SDS 72h: 0.55 µg/mg → Perfusion+agitation in SDS 12h: 0.52 µg/mg → Perfusion+agitation in SDS 24h: 0.23 µg/mg (85% removed) ↓ Perfusion+agitation in SDS 72h: 0.17 µg/mg (89% removed) ↓ Integrity of ECM (collagen and elastin) preserved None of the flaps maintained physiologic vascular integrity, no outflow	No	10
14 Abdominal Fasciocutaneous flap	Incubation 0.1% Sodium azide, 4% sodium deoxycholate	Gross examination Histology: orcein (elastin) and H&E (nuclei) staining Spectrophotometry (residual DNA) Peristaltic perfusion of the pedicle inflow with PBS at 200 µL/min (80 mmHg)	No	<ul style="list-style-type: none"> • Shape preserved • Removal of cellular all constituents • Reduced DNA to 4.04 µg/µL DNA • Persistence of relevant ECM proteins (elastin) • ECM of vessel walls intact • Circuit patency/efflux of PBS from outflow channel for 6 h 	No	9

(continued)

TABLE 1. (CONTINUED)

Specimen/delay	Decellularization protocol	Scaffold assessment	Recellularization	Outcome	Transplantation	References
Rat groin skin/adipose tissue flap (2×4 cm ²) Frozen -80° then thawed at room temperature (three cycles)	7 Days Two times: UW (24h) → 0.5 M NaCl (4h) → 1 M NaCl (4h) → UW (12h) 0.25% try/eed acid (2h/37°C) → DW (1h) Isopropanol (12h)+agitation 1% TT (48h) → PBS (24h)	DNA quantification (DNA assay kit) Histology: H&E, DAPI IHC: anti-VEGF, anti-bFGF, anti-MHC-I, anti-laminin GAG content (assay kit) SEM Porosity measurement (ethanol displacement) CT (microfili)	Sterilization: 70% ethanol then PBS Cell culture: hASC HUVEC Seeding on DeS (7 days) 2×10 ⁶ HUVECs in 200 µL of medium into the artery and vein 1×10 ⁶ hASCs +2×10 ⁵ HUVECs in 1 mL of growth medium injected in 10 sites into the DeS Analysis: Anti-CD31 anti-IgG, DAPI Live/Dead Viability Kit	Vessels intact and microcirculatory network well preserved No nuclei Reduction DNA content 0.04 (dermis) and 0.05 (fat pad) µg/mg DNA/dry Oil and MHC-1 removed Collagen, blood vessels, and nerves retained Laminin distributed in the vessels, nerves, and nanofibrous bFGF and VEGF and nanofibrous retained Growth factors retained but move their location SEM: no cells 3D porous structures in the fat pad due to cell removal	DeS into 15 nude rats for 3 months Three groups: A: cell-seeded DeS implanted with microsurgery B: cell-seeded DeS implanted without microsurgery C: DeS alone implanted without microsurgery Analysis: H&E, MT, anti-HuNu, anti-CD31, anti-SMA, anti-CD68, anti-CD163, anti-CD80 Neovascularization and constructive remodeling: predominant infiltration of M2 macrophages and significant adipose tissue formation at 3 months	12

↑, Significant increase; ↓, significant decrease; →, no difference; 3D, three-dimensional; Ad, adenosine; ADM, adipose differentiating medium; bFGF, basic fibroblast growth factor; CT, computed tomography; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DeS, decellularized scaffold; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DW, deionized water; ECA, external carotid artery; ECM, extracellular matrix; EGM, endothelial cell growth media; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PBS, fetal bovine serum; FF-G, full face graft; GAG, glycosaminoglycan; H&E, Hematoxylin and Eosin; HAEC, human aortic endothelial cells; hASCs, human adipose-derived stem cells; hMSCs, human mesenchymal stem cells; HS, heparinized saline; HuNu, human cell nuclei; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; IF, immunofluorescence; IgG, immunoglobulin G; IHC, immunohistochemistry; MAP, mean arterial pressure; MHC-I, major histocompatibility complex class I; MT, Masson's Trichrome; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; pBM-MSCs, porcine bone marrow mesenchymal stem cells; PBS, phosphate-buffered saline; pDXA, peripheral dual-energy X-ray absorptiometry; PM, proliferating medium; qPCR, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; rASCs, rat adipose-derived stem cells; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, scanning electron microscopy; SF-G, segmental lower face grafts; SLA, swine leukocyte antigen; SMA, smooth muscle actin; try/eed acid, trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid; TT, Triton X-100; UW, Ultrapure Water.

Duisit *et al.* reported an additional step post-decellularization, which is defatting and it involves removal of the fat tissue from the VCA. Contrary to solid organs, fat tissue is an independent anatomical and functional compartment in the face and its removal was justified.²⁵ The defatting step is achieved by treating the VCA with a polar solvent, 2-propanol, initially described for isolated adipose tissue decellularization.^{26,27} However, perfusion with 2-propanol led to an increase in vascular resistance of the VCA, and defatting by an overnight incubation in 2-propanol, rather than perfusion, was shown more suitable.^{14,15}

At the end of the decellularization protocol, the scaffolds were usually stored at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% penicillin/streptomycin until further use in all the reports reviewed in this study.

Scaffold assessment

Removal of cells. The main objective of decellularization is to remove all cellular material from the tissue and the removal of cells and nucleic acids should be confirmed both qualitatively and quantitatively. The efficiency of the decellularization protocol will play an important role in the modulation of the host response. Since ECM molecules are highly conserved among species, immune reaction will mainly depend on the presence of cellular material.²⁸ Insufficient removal of cellular material can elicit an inflammatory response and can negatively influence or even terminate the regeneration process. Thus, one method to determine the decellularization efficacy is to detect the remaining DNA presence with quantitative DNA content assay.

It has been widely accepted that the following criteria should be satisfied for successful tissue decellularization: less than 50 ng double-stranded DNA (dsDNA) per mg ECM dry weight, less than 200 bp DNA fragment length, and clear lack of visible nuclear material in tissue sections stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or Hematoxylin and Eosin (H&E) in histological sections.²⁹ While H&E staining indicates removal of cells and gives an overview of tissue architecture, it is not a precise method to assess the decellularization efficiency. Lack of staining of histological sections using a DNA-binding dye such as DAPI and/or quantification of extracted DNA from decellularized tissue with such dyes yield a more accurate measure of removal of nuclear material of the cells. Based on these criteria, all studies reviewed here demonstrated decellularization of the VCA, except two out of five protocols tested on abdominal fasciocutaneous flap (failure with the short agitation in SDS for 12 and 72 h). In addition to removal of nuclear material, it is critical to demonstrate the removal of cellular proteins from the decellularized tissue to confidently report decellularization efficiency.³⁰ Accordingly, the absence of cellular proteins after decellularization was also confirmed by negative staining for myosin, alpha-actinin sarcomere, neurofilament H, and S100 calcium-binding protein B (in muscle) by immunohistochemical staining of the decellularized VCA. Large specimens are more difficult to evaluate and require multiple samples from different locations to confirm the decellularization.¹⁴

Preservation of ECM. ECM is a complex nonliving biomaterial, secreted by the cells and has numerous roles in determining cellular behavior. It is composed of proteins, proteoglycans, and GAGs, which constitute the structure of the tissue while providing the biochemical signals that facilitate cell engraftment, viability, and function of the tissue. It plays vital roles in maintaining the native-like environment for the cells both *in vivo* and *in vitro*.³¹ ECM harbors growth factors and has tissue-specific mechanical properties to regulate dynamic cellular behaviors, such as proliferation and migration, influencing rapid growth of the cells.³² Therefore, the goal of successful decellularization is to remove all cellular material while preserving the ECM composition and architecture to the maximum extent possible.

Depending on the type of detergent used, the impact on the ECM of the tissue can be different.⁶ Surfactant agents, such as Triton X-100, SDS, and sodium deoxycholate cause disarrangement of the phospholipid cell membrane, thereby lysing cells. SDS is an ionic detergent excellent in removing both cytoplasmic and nuclear material but have the tendency to disturb the native architecture of the tissue by disrupting protein-protein interactions and damaging signaling proteins. As it is cytotoxic, it must be thoroughly washed after the decellularization process. Triton X-100 is a non-ionic detergent described to cause minimal damage to the tissue structure and it acts by mainly disrupting lipid-lipid and lipid-protein interactions rather than protein-protein interactions.³³ It is ineffective on its own, therefore it is often used in combination with other agent such as SDS^{10,11,13,15,16,18} or trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid.¹² Sodium deoxycholate is an ionic surfactant, less damaging, and cytotoxic to tissue compared with SDS. It causes DNA agglutination and therefore is commonly used in combination with nucleases, as for rat abdominal fasciocutaneous flap decellularization.¹⁰

Mechanical agitation is also used as a means of facilitation of decellularization. The mechanical agitation lyses cells and destroys cell-matrix adhesive proteins. This approach was tested in two studies,^{11,18} but showed a risk of disturbing the structural architecture of the ECM. In addition, enzymes are also used to achieve decellularization. The enzymes break down the nucleic acids and proteins. In one study by Duisit *et al.*¹⁸ DNase was used on porcine ear decellularization in combination with SDS (1%) treatment. The acid agents (such as trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid) act by solubilization of the cell membrane and nuclear material as their intrinsic charge properties are highly corrosive and strongly oxidizing nature, used in combination with other methods, as Triton X-100.¹² Otherwise, it is known to increase ECM stiffness.³⁴

The specific ECM components of the decellularized VCA were evaluated qualitatively by histology/immunohistochemistry (IHC) and quantitatively by biochemical or antibody-based assays, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Major ECM components analyzed through histology included total collagen (with Masson Trichrome or Miller's Blue and Sirius Red stain), GAGs (with Alcian Blue or Safranin O), and elastin (with Miller's Elastin/Alcian staining). Immunohistochemical staining confirmed the preservation of basement membrane proteins, such as collagen IV, laminin, and fibronectin. Growth factors, chemokines, and cytokines (e.g., VEGF, TGF- β 1 GM-

CSF; SDF-1 α , TNF- α , IL-8, IL-10, and IL-6) retained on the decellularized VCA were determined through IHC and ELISA-based microarrays.^{14,15,19}

The majority of studies, using a protocol including 1% SDS and 1% Triton X-100, reported increased total collagen content, and decreased elastin, GAGs, and growth factor contents after decellularization.^{11,13–16,19} However, this result was dependent on the tissue component analyzed; for example, decellularized cartilage showed a significant increase in specific growth factors,¹⁵ and the fat tissue showed higher preserved elastin¹⁴ and cytokines.¹⁵ Elastin is a key component of the ECM that provides the elasticity of the tissue and is important in load-bearing tissues, such as the skin and the cartilage, where mechanical energy is required to be stored. Although elastin was found to be present in all tissues analyzed, it was found to be decreased after decellularization. The decrease was found to be 30% by Jank *et al.*¹³ Three of these studies reported the resilience of the grafts after decellularization^{13,15,18} and mostly found a decrease in elasticity as a result. Elastin was only lowered in the skin compartment but not in the cartilage in decellularized human ears.¹⁵ Another ECM component is collagen that contributes to the mechanical strength of the tissue and is the main component of cartilage, ligaments, tendons, bone, and teeth. The total amount of collagen was analyzed in all the included studies^{9–19} and was found to be preserved or increased, except in decellularized human cadaveric upper extremity.¹⁶ Type I collagen is by far the most abundant protein in all vertebrates. It assembles into fibers that form the structural and mechanical scaffold. It has been analyzed in five studies.^{12,13,15,17,19} Collagen type II allows cartilage to entrap the proteoglycan aggregate as well as provide tensile strength to the tissue and it was reported to be present in decellularized human ears.¹⁵ Collagen type IV, a component of the basement membrane, plays an essential role in cell adhesion, migration, differentiation, and growth. While it was found to be a slightly decreased amount of soluble collagen in the muscles, the impact of this decrease cannot be concluded because the decellularized scaffolds were not recellularized.¹⁶

GAGs are another group of ECM constituents that play a crucial role in the cell signaling process, including regulation of cell growth, proliferation, promotion of cell adhesion, anticoagulation, and wound repair. It was analyzed in many of the included studies^{9,11–16,18,19} and was described “preserved.” However, it was retained at only 40% on rat upper limbs,¹¹ 56% on porcine fasciocutaneous groin flap,¹³ and it was significantly decreased in the skin and cartilage of the human ear scaffold.¹⁵ This decrease in GAGs does not seem to impact the major functions of the GAG-related ECM since recellularization was successful, with cell attachment and proliferation of cells in the studies that have tried it.^{11–15,18,19} Laminins are an important and biologically active part of the basal lamina, influencing cell differentiation, migration, and adhesion was found preserved in four studies.^{11,12,14,19} Fibronectin, which has a role in cell adhesion, growth, migration, and differentiation, was tested in decellularized porcine ears and human penile grafts.^{18,19} It was preserved with a good adhesion of the transferred cells during the recellularization of these scaffolds.

Cytokines are small glycoproteins produced by a number of cell types, predominantly leukocytes that regulate immunity, inflammation, and hematopoiesis and have been

found lowered in decellularized human face and human ear grafts.^{14,15} Treatment of human face grafts¹⁴ with 1% SDS and 1% Triton X-100 caused a decrease in IL-8 and GM-CSF, but SDF-1 α , IL-10, TNF- α , and IL-6 contents were stable. In decellularized human ear grafts,¹⁵ cytokines were all reduced in skin, stable in fat (except IL-4), and decreased for 22/44 cytokines in cartilage. Thus, it is necessary to consider the possibility that the decrease of specific cytokines could have been at the reason of the good integration of the *in vivo* study results as described later.

Growth factors played an important role in promoting cellular differentiation and cell division and showed heterogeneous results in the studies that analyzed this component. In the study regarding human ear scaffolds,¹⁵ the authors found an increase of TGF- β 1, TGF- β 3, and CXCL5 content. The study with the decellularized human penile,¹⁹ reported retention of growth factors VEGF (45%), EGF (57%), and TGF- β 1 (42%) on ELISA. The cavernosa and urethra had the significantly highest level for all three growth factors compared with the tunica. Interestingly, cells formed small clusters in the cavernosa and urethra parts when they proceed with recellularization, with tubelike structure formation observed in the cavernosa region. That can be explained by the increased presence of these growth factors at these sites. On rat groin skin/adipose tissue flap,¹² basic fibroblast growth factor (bFGF) and VEGF, which play important roles in angiogenesis and neovascularization, were analyzed. These growth factors were retained after decellularization, along vessels, nerves, and nanofibrous structures, indicating a preangiogenic property.

Further analysis of the components using mass spectrometry is necessary to ensure the exact effect of detergents on the preservation of the ECM components.³⁵ However, the initial composition after decellularization might not be so crucial since once the cells are seeded, they secrete their own ECM and remodel the scaffold.³⁶

The structural integrity and general morphology of decellularized VCA scaffolds were assessed through scanning electron microscopy (SEM) of whole-organ human penile tissue,¹⁹ human ear grafts,¹⁵ rat groin skin/adipose tissue flap,¹² porcine fasciocutaneous groin flap,¹⁸ and porcine ear sample.¹⁸ SEM images of these decellularized scaffolds revealed the characteristic porous structure of the scaffold generated left behind after removal of the cells. The stromal layers were easily identifiable. The ECM structure appeared intact in the SEM images on these four tissue types. In particular, Duisit *et al.* pointed out the dense fibrous matrix and reticular fibers and the preservation of functional structure (dermal papilla) in decellularized porcine ear samples.¹⁸ None of the studies performed transmission electron microscopy to assess deeper the ultrastructural properties of the scaffolds.

Vascular integrity. Integrity of the vascular bed in decellularized VCA is critical for the success of downstream repopulation and the transplantation of the engineered grafts. The vascular architecture of the decellularized VCAs was evaluated through contrast-enhanced computed tomography (CT) and micro-CT (with microfil),^{12,16,19} microtomography,¹¹ fluoroscopy,^{14,15} perfusion of PBS or PBS with 0.5% Evans Blue dye.⁹ Microscopic architecture of decellularized VCA was visualized through SEM.^{12,15} Each study reports the preservation of macrovasculature in the

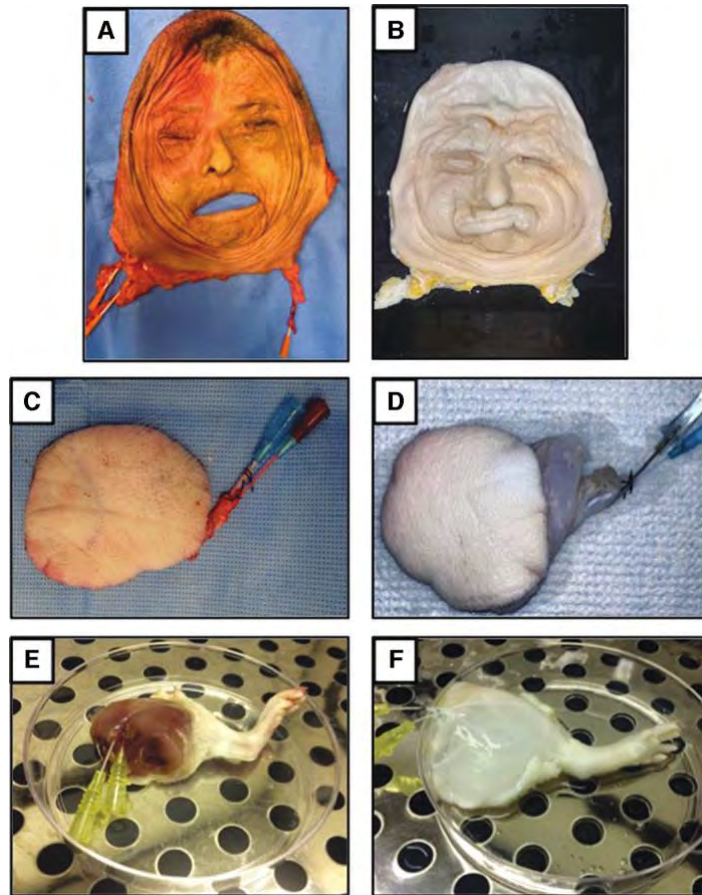


FIG. 2. Example of decellularization of different VCAs. Human face grafts (A) before decellularization and (B) after decellularization. Inguinal Swine Flap (C) before decellularization and (D) after decellularization. Rat hind limb (E) before decellularization and (F) after decellularization. VCA, vascularized composite allotransplantation. Color images are available online.

4×10^6 C2C12 myoblast progenitor cells.¹⁴ Jank *et al.* first injected 10×10^6 HUVECs on day 0 in 20 injections, followed by injection of HUVECs, mouse embryonic fibroblasts, and C2C12 on day 2.¹¹ To re-endothelialize the decellularized rat groin flaps, Zhang *et al.* injected 2×10^5 HUVECs in 200 μ L medium into the artery and vein followed by 1×10^6 hASCs and 2×10^5 HUVECs into 10 different sites throughout the flaps.¹²

In a slightly different approach, *in vivo* recellularization through implantation was reported for porcine ear scaffolds.¹⁸ The authors noted that the scaffolds were infiltrated with a significant number of cells with signs of vascularization. Similarly, decellularized human ear scaffolds displayed vascular infiltration upon subcutaneous implantation.¹⁵ The repopulation of implanted VCA scaffolds was also observed by Jank *et al.* when a 6-mm decellularized skin flap scaffold was sutured in a full-thickness skin defect in a rat model.¹³ When the implants were tested for cellular infiltration through histology, and IHC 14 days after implantation, the scaffolds were found to have extensive cellular infiltration, local inflammation (CD68⁺ and CD3⁺ by IHC), and neovascularization. The

tissue morphology was retained. Altogether, the results indicated a fully integrated graft, with neovascularization, and a fully regenerated epidermis with an efficient barrier function.

Evaluation of recellularized VCAs. The recellularized VCAs were assessed for cell engraftment through histology (H&E or DAPI staining) and quantification of cells through image analysis of stained sections.^{12,15,17} The cell proliferation was tested through reduction of the tetrazolium dye MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] by viable cells,¹⁵ live/dead assay based on Calcein AM/Ethidium Homodimer-1 staining^{12,15,17,19} and/or through Ki67 staining for proliferating cells.¹⁸ The recellularized VCAs were also stained through IHC and assayed through quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction (qPCR) for collagen (ECM), von Willebrand factor, CD31 (endothelial cells), SM22, and desmin (smooth muscle cells) for evaluation of cellular distribution and to confirm the presence of the cells.^{12,15,17,18} Jank *et al.* attempted to reconstruct an epidermis *in vitro* by cultivating human keratinocytes on decellularized skin flaps during a 7-

day culture. The epidermal stratification was induced by raising the scaffold seeded with cells to an air/liquid interface. Successful formation of an epidermal layer was reported as confirmed by biotin permeability assay.¹³

Some limitations of various recellularization protocols have been noted. Although the attachment and proliferation of cells within the scaffolds was shown, the cell density was found to be low.¹⁵ Migration of cells within scaffolds was only observed with fibroblasts seeded statically but not in perfusion seeded cells.¹⁴ Jank *et al.* reported that recellularization through vascular infusion was not suitable for muscle repopulation because of the marginal distribution of myoblasts into muscle ECM with the majority of cells being retained in the vascular conduit.¹¹ When the same group injected cells into the muscle ECM (with a surgical microscope), they found good engraftment of cells and muscle-like tissue formation but also observed local mechanical disruption of the matrix due to the injection pressure. They also noted that the microcirculation was disturbed with areas of cell apoptosis near the injection site.¹³ Endothelialization of the vascular bed was achieved in vessels down to 300 μm , but microvasculature and capillary beds with much smaller vascular diameters (6 μm) were not endothelialized.¹³

Transplantation. Five studies attempted transplantation of decellularized and/or recellularized VCAs in animals (Table 1).^{11–15} Systemic transplantation involved the anastomotic connection of the scaffold's vessels with those of the recipient (manual or with cuff). The operations were performed under general anesthesia. The transplantations were often orthotopic,^{11–13,18} but could be performed heterotopically.¹⁴ In two of the reports, a recellularized VCA was transplanted; a porcine skip flap reendothelialized with HUVECs¹³ and a rat flap scaffold recellularized with HUVECs and hASCs.¹² Duisit *et al.*^{14,18} and Jank *et al.*¹¹ transplanted decellularized VCAs without the addition of cells.

The transplantation of VCAs were mostly terminated by vascular thrombosis with no immediate venous return,¹³ at 3 h,¹⁵ at 4 h¹⁴ posttransplantation. Only one study reported long-term survival of the engineered VCA after transplantation.¹² The study was ended at 3 months for analysis of the recellularized grafts through histology and IHC, which showed neovascularization and a constructive remodeling with predominant infiltration of M2 macrophages along with significant adipose tissue formation within the scaffold.

Discussion

VCAs are complex tissues used to restore anatomically complex defects that cannot be addressed by autologous graft reconstruction and are an emerging feasible tool in reconstructive surgery.^{38,39} Biological scaffolds, which are composed of decellularized extracellular matrices, have long been in use in plastic surgery to repair various tissues, including the skin.⁴⁰ In addition, several such scaffolds have received FDA approval for clinical use in humans, including decellularized dermal tissue (Alloderm[®]; LifeCell) and decellularized porcine bladder (bladder matrix; ACell) for wound healing.^{41,42} Although quite a few skin substitutes and dermal matrices have been produced and commercial-

ized, none has truly functioned as full-thickness skin. Indeed, VCAs differ from these commercially available scaffolds by their structural complexity, which poses a real challenge in the need to functionally replace multiple tissue types in a single unit and the need for transplantation with microsurgical anastomoses. To date, no decellularized and/or recellularized VCA has been successfully transplanted in humans⁴³ and only one study reports successful transplantation of an engineered VCA in a rat.¹² In this systematic literature review, we analyzed 11 reports of VCA decellularization and recellularization that differ in the type of VCA and its origin. We compared the reports in terms of scaffold preparation methods, recellularization methodologies, and their transplantation.

The decellularization protocols differ depending on the tissue origin and size, but in general decellularization is effectively achieved using a strong ionic detergent, SDS. The duration of exposure to the detergents is determined by the size of the VCA such that larger tissues require longer exposure times. Exposing the tissue to mechanical forces such as perfusion or gentle agitation during the detergent treatment aids in the effectiveness of cell removal. However, the mechanical forces applied during decellularization should not be too aggressive to preserve the components of the ECM.⁴⁴ Indeed, the preservation of ECM proteins plays an essential role in maintaining the mechanical properties of the decellularized scaffold and facilitates appropriate tissue integration.⁴⁵

An ideal decellularization protocol should not disrupt the vascular architecture of the VCA, which is necessary for the successful perfusion of the engineered grafts and would enable better recellularization and transplantation outcomes. The maintenance of an intact vasculature is one of the biggest challenges in whole-organ engineering. A functional vasculature facilitates the delivery of oxygen and nutrients to the different cells throughout the bioengineered tissue and is essential to maintain the viability of the developing tissue *in vitro* and *in vivo*. A lack of vascularity leads to metabolically inactive cells and necrotic tissue. Therefore, obtaining a scaffold with an intact and functional vasculature is critical for successful organ engineering.⁴⁶ Compared with the vessels of solid organs, the vasculature present in the dermis of a VCAs is thinner⁴⁷ and exceptional care must be taken to avoid damage to the microcapillaries. High concentrations of detergents and high perfusion pressures can lead to the destruction of the microvasculature.¹⁴ Maintaining a maximum pressure of 80 mmHg during detergent perfusion was found to be ideal for VCA decellularization.

The characterization of decellularized ECM scaffolds has been focused on confirming the removal cells and DNA and preservation of ECM components by histological and biochemical assays. Most studies report successful decellularization with minimal removal of ECM components. A very limited number of studies examine the removal of the detergents from the final decellularized graft.²⁴ A final extensive washing step with deionized water and phosphate-buffered saline is required to ensure the removal of the chemical agents. In addition to removal of remaining detergents and nuclear material, the removal of cellular proteins abundantly found in the native tissue should also be confirmed through IHC or western blots.⁴⁸ One limitation of

the studies reviewed here is that the immunological response to the decellularized VCA scaffolds has been poorly studied. This is concerning because the skin is the most immunogenic organ of the human body⁴⁹ and the nonimmunogenicity of the decellularized skin should be established before further evaluations.

Recellularization is challenging with composite tissues like VCA because it requires repopulation with multiple cell types in different compartments to form a complex cellular architecture.⁴⁶ The large number of cells needed to regenerate the clinical size complex tissues also represents a major hurdle on the path toward successful recellularization *in vitro*.⁵⁰ Adult tissue stem cells, such as the ASCs and MSCs, are considered to hold great potential in repopulating the engineered VCA due to their potential to generate the different cell types. In addition, these stem cells not only directly participate in mesenchymal tissue regeneration but also modulate the host immune response to the engineered constructs.^{12,51–56} Indeed, Zhang *et al.* advocates that hASCs and decellularized skin flaps worked synergistically to activate M2 macrophage polarization and provide a proregenerative environment for adipose tissue formation.¹² Other cell types that have not been tested so far in VCA repopulation are lymphatic endothelial cells, which hold great promise to engineer functional lymphatic vessels in hydrogel-based skin implants,⁵⁷ and induced pluripotent stem cells, which allows for generating patient-specific engineered VCA with minimal to no immunological rejection.⁵⁷ Regarding the methodology of scaffold repopulation, it will be necessary to make further assessments to understand whether static seeding or dynamic perfusion is more effective. Perfusion pressure is critical to distribute the cells into the tissue in dynamic seeding such that the perfusion pressure should be high enough to force the cells to go into the extravascular space but moderate enough not to create ECM damage. Likewise, static seeding through multiple injections of cells into the tissue may achieve uniform distribution of the cells in anatomically correct positions, but it has been reported that injection causes localized ECM damage. It is expected that partial recellularization *ex vivo* (e.g., endothelialization and skin repopulation) followed by maturation *in vivo* would achieve a functional graft upon transplantation since a VCA does not need to be fully functional before implantation unlike solid organs, such as kidney, liver, heart, and lung.

Conclusion

The decellularization of VCAs is a growing, emerging field. The immunological response of the decellularized scaffolds remains poorly evaluated. Few authors have attempted the recellularization and transplantation of these scaffolds, highlighting the difficulty of obtaining a scaffold that has been decellularized and properly recellularized. Establishing of standardized assays with well-defined endpoints is necessary for accurate estimation of the quality and success of the engineered grafts. Overall, although results so far are promising, successful use of VCAs in clinic will require more extensive evaluation of immunological response to decellularized scaffolds following decellularization, effective re-endothelialization, and complete recellularization with multiple cell types.

Disclosure Statement

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Funding Information

This work was supported by Shriners Hospitals for Children, grants number 85127 (B.E.U. and C.L.C.) and number 84702 (A.A.).

References

1. Diaz-Siso, J.R., Borab, Z.M., Plana, N.M., *et al.* Vascularized composite allotransplantation: alternatives and catch-22s. *Plast Reconstr Surg* **142**, 1320, 2018.
2. Dubernard, J.M., Owen, E., Herzberg, G., *et al.* Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet* **353**, 1315, 1999.
3. Petruzzo, P., and Dubernard, J.M. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. *Clin Transpl* **247**, 2011.
4. Howsare, M., Jones, C.M., and Ramirez, A.M. Immunosuppression maintenance in vascularized composite allotransplantation: what is just right? *Curr Opin Organ Transplant* **22**, 463, 2017.
5. Badylak, S.F., Taylor, D., and Uygun, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* **13**, 27, 2011.
6. Gilpin, A., and Yang, Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int* **2017**, 9831534, 2017.
7. Uygun, B.E., Yarmush, M.L., and Uygun, K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 738, 2012.
8. Acun, A., Oganessian, R., and Uygun, B.E. Liver bioengineering: promise, pitfalls, and hurdles to overcome. *Curr Transplant Rep* **6**, 119, 2019.
9. Henderson, P.W., Nagineni, V.V., Harper, A., *et al.* Development of an acellular bioengineered matrix with a dominant vascular pedicle. *J Surg Res* **164**, 1, 2010.
10. Qu, J., Van Hogezaand, R.M., Zhao, C., Kuo, B.J., and Carlsen, B.T. Decellularization of a fasciocutaneous flap for use as a perfusable scaffold. *Ann Plast Surg* **75**, 112, 2015.
11. Jank, B.J., Xiong, L., Moser, P.T., *et al.* Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft. *Biomaterials* **61**, 246, 2015.
12. Zhang, Q., Johnson, J.A., Dunne, L.W., *et al.* Decellularized skin/adipose tissue flap matrix for engineering vascularized composite soft tissue flaps. *Acta Biomater* **35**, 166, 2016.
13. Jank, B.J., Goverman, J., Guyette, J.P., *et al.* Creation of a bioengineered skin flap scaffold with a perfusable vascular pedicle. *Tissue Eng Part A* **23**, 696, 2017.
14. Duisit, J., Maistriaux, L., Taddeo, A., *et al.* Bioengineering a human face graft: the matrix of identity. *Ann Surg* **266**, 754, 2017.
15. Duisit, J., Amiel, H., Wuthrich, T., *et al.* Perfusion-decellularization of human ear grafts enables ECM-based scaffolds for auricular vascularized composite tissue engineering. *Acta Biomater* **73**, 339, 2018.
16. Gerli, M.F.M., Guyette, J.P., Evangelista-Leite, D., Ghoshhajra, B.B., and Ott, H.C. Perfusion decellularization

- of a human limb: a novel platform for composite tissue engineering and reconstructive surgery. *PLoS One* **13**, e0191497, 2018.
17. Duisit, J., Amiel, H., Orlando, G., *et al.* Face graft scaffold production in a rat model. *Plast Reconstr Surg* **141**, 95, 2018.
 18. Duisit, J., Orlando, G., Debluts, D., *et al.* Decellularization of the porcine ear generates a biocompatible, non-immunogenic extracellular matrix platform for face subunit bioengineering. *Ann Surg* **267**, 1191, 2018.
 19. Tan, Y., Landford, W.N., Garza, M., *et al.* Complete human penile scaffold for composite tissue engineering: organ decellularization and characterization. *Sci Rep* **9**, 16368, 2019.
 20. McDiarmid, S.V., and Azari, K.K. Donor-related issues in hand transplantation. *Hand Clin* **27**, 545, 2011.
 21. Ott, H.C., Clippinger, B., Conrad, C., *et al.* Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* **16**, 927, 2010.
 22. Peloso, A., Petrosyan, A., Da Sacco, S., *et al.* Renal extracellular matrix scaffolds from discarded kidneys maintain glomerular morphometry and vascular resilience and retains critical growth factors. *Transplantation* **99**, 1807, 2015.
 23. Peloso, A., Urbani, L., Cravedi, P., *et al.* The human pancreas as a source of protologenic extracellular matrix scaffold for a new-generation bioartificial endocrine pancreas. *Ann Surg* **264**, 169, 2016.
 24. Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* **16**, 814, 2010.
 25. Rohrich, R.J., and Pessa, J.E. The fat compartments of the face: anatomy and clinical implications for cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* **119**, 2219, 2007.
 26. Flynn, L.E. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* **31**, 4715, 2010.
 27. Porzionato, A., Sfriso, M.M., Macchi, V., *et al.* Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine. *Eur J Histochem* **57**, e4, 2013.
 28. Badylak, S.F. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. *Ann Biomed Eng* **42**, 1517, 2014.
 29. Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233, 2011.
 30. Philips, C., Cornelissen, M., and Carriel, V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *J Neural Eng* **15**, 021003, 2018.
 31. Rijal, G. The decellularized extracellular matrix in regenerative medicine. *Regen Med* **12**, 475, 2017.
 32. Chaudhuri, O., Koshy, S.T., Branco da Cunha, C., *et al.* Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater* **13**, 970, 2014.
 33. Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 105, 2004.
 34. Garcia-Gareta, E., Abduldaiem, Y., Sawadkar, P., *et al.* Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. *J Tissue Eng* **11**:1–18, 2041731420942903, 2020.
 35. Acun, A., Oganesyan, R., Uygun, K., *et al.* Liver donor age affects hepatocyte function through age-dependent changes in decellularized liver matrix. *Biomaterials* **270**, 120689, 2021.
 36. Li, Q., Chang, Z., Oliveira, G., *et al.* Protein turnover during in vitro tissue engineering. *Biomaterials* **81**, 104, 2016.
 37. McPherson, T.B., Liang, H., Record, R.D., and Badylak, S.F. Galalpha(1,3)Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng* **6**, 233, 2000.
 38. Cetrulo, C.L., Jr., Ng, Z.Y., Winograd, J.M., and Eberlin, K.R. The advent of vascularized composite allotransplantation. *Clin Plast Surg* **44**, 425, 2017.
 39. Chim, H., Amer, H., Mardini, S., and Moran, S.L. Vascularized composite allotransplant in the realm of regenerative plastic surgery. *Mayo Clin Proc* **89**, 1009, 2014.
 40. Livesey, S.A., Herndon, D.N., Hollyoak, M.A., Atkinson, Y.H., and Nag, A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* **60**, 1, 1995.
 41. Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675, 2006.
 42. Yang, Q., Peng, J., Guo, Q., *et al.* A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **29**, 2378, 2008.
 43. Rajab, T.K., O'Malley, T.J., and Tehantchaleishvili, V. Decellularized scaffolds for tissue engineering: current status and future perspective. *Artif Organs* **44**, 1031, 2020.
 44. Freedman, B.R., Bade, N.D., Riggin, C.N., *et al.* The (dys)functional extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 3153, 2015.
 45. Chan, B.P., and Leong, K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* **17** Suppl 4, 467, 2008.
 46. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A., and Kaplan, D.L. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **15**, 353, 2009.
 47. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* **12**, 390, 2002.
 48. Geerts, S., Ozer, S., Jaramillo, M., Yarmush, M.L., and Uygun, B.E. Nondestructive methods for monitoring cell removal during rat liver decellularization. *Tissue Eng Part C Methods* **22**, 671, 2016.
 49. Shimada, S., and Katz, S.I. The skin as an immunologic organ. *Arch Pathol Lab Med* **112**, 231, 1988.
 50. Pellegata, A.F., Tedeschi, A.M., and De Coppi, P. Whole organ tissue vascularization: engineering the tree to develop the fruits. *Front Bioeng Biotechnol* **6**, 56, 2018.
 51. Brown, B.N., Valentin, J.E., Stewart-Akers, A.M., McCabe, G.P., and Badylak, S.F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* **30**, 1482, 2009.

52. Faulk, D.M., Londono, R., Wolf, M.T., *et al.* ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. *Biomaterials* **35**, 8585, 2014.
53. Fishman, J.M., Lowdell, M.W., Urbani, L., *et al.* Immunomodulatory effect of a decellularized skeletal muscle scaffold in a discordant xenotransplantation model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14360, 2013.
54. Hanson, S.E., King, S.N., Kim, J., *et al.* The effect of mesenchymal stromal cell-hyaluronic acid hydrogel constructs on immunophenotype of macrophages. *Tissue Eng Part A* **17**, 2463, 2011.
55. King, S.N., Hanson, S.E., Chen, X., *et al.* In vitro characterization of macrophage interaction with mesenchymal stromal cell-hyaluronan hydrogel constructs. *J Biomed Mater Res A* **102**, 890, 2014.
56. Valles, G., Bensiamar, F., Crespo, L., *et al.* Topographical cues regulate the crosstalk between MSCs and macrophages. *Biomaterials* **37**, 124, 2015.
57. Marino, D., Luginbuhl, J., Scola, S., Meuli, M., and Reichmann, E. Bioengineering dermo-epidermal skin grafts with blood and lymphatic capillaries. *Sci Transl Med* **6**, 221ra14, 2014.

Address correspondence to:

Basak E. Uygun, PhD
Shriners Hospitals for Children-Boston
51 Blossom St
Boston, MA 02114
USA

E-mail: buygun@mgh.harvard.edu

Received: May 13, 2021

Accepted: June 18, 2021

Online Publication Date: October 22, 2021

Décellularisation et recellularisation des allogreffes de tissus composites : état des lieux et nouveaux concepts

RESUMÉ EN FRANÇAIS :

Introduction : La décellularisation puis recellularisation est une alternative prometteuse pour recouvrir les pertes de substances complexes en surmontant le rejet immunitaire qui limite les allogreffes de tissus composites. Cependant, dans des précédentes études, la transplantation *in vivo* a échoué dû à des méthodes de décellularisation agressives, conduisant à des dégradations de la matrice acellulaire.

Méthode : Nous avons développé et optimisé des protocoles de décellularisation sur différents modèles de rats, porcins et humains basés sur l'utilisation du Sodium Dodecyl Sulfate. Nous avons analysé en détail la préservation des constituants de la matrice extra-cellulaire et vasculaire et caractérisé leur potentiel *in vitro* et *in vivo*.

Résultat : Nous avons élaboré un protocole de décellularisation de membres postérieurs de rongeur, avec tentative de transplantation *in vivo*. Nous avons optimisé le protocole de décellularisation de lambeau fascio-cutané porcine par perfusion en divisant par 5 la quantité de détergents nécessaire. Nous avons décrit un nouveau protocole de décellularisation de greffon facial humain par simple imbibition dans du SDS 1%. Ces deux derniers modèles de matrices acellulaires sont biocompatibles *in vivo* et autorisent la viabilité de cellules ensemencées.

Conclusion : Nos méthodes de décellularisation, plus préservatrices, permettront de faciliter les étapes ultérieures de recellularisation avant transplantation *in vivo*.

TITRE EN ANGLAIS : Decellularization and recellularization of composite tissue allografts: current status and new concepts

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : decellularization, recellularization, vascularized composite allotransplantation, regenerative medicine, scaffold, tissue engineering

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
Vascularized Composite Allotransplantation Laboratory
Massachusetts General Hospital,
55 Blossom Street – Boston, MA 02114, USA

Directeur de thèse : Dr. Alexandre G. Lellouch