

La transplantation trachéale sans immunosuppression. Etude expérimentale sur modèle lagomorphe

Tracheal transplantation without immunosuppressive therapy in a rabbit model

A Wurtz [1,2], I Hysi [1,2], E Kipnis [3], P Fayoux [4], MC Copin [5], C Zawadzki [2,6], R Jashari [7], T Hubert [2], A Ung [2], P Ramon [8], B Jude [2,6]

1. Clinique de chirurgie cardiaque et thoracique - CHU de Lille.
2. Université de Lille Nord de France - UDSL - IFR 114 - EA 2693 - Faculté de Médecine - Lille.
3. Service de réanimation chirurgicale - CHU de Lille.
4. Pôle enfant - service de chirurgie ORL - CHU de Lille.
5. Institut de pathologie - CHU de Lille.
6. Institut d'hématologie-transfusion - CHU de Lille.
7. European Homograft Bank - Brussels - Belgium.
8. Département de pneumologie - CHU de Lille.

Mots clés

- ◆ Allogreffe
- ◆ Modèle animal
- ◆ Rejet immunologique
- ◆ Trachée
- ◆ Transplantation

Résumé

Objectifs. La transplantation trachéale soulève deux problèmes : l'absence de pédicule vasculaire individualisé, qui autoriserait une revascularisation immédiate du greffon et le rejet immunologique rendant nécessaire une immunosuppression, contre-indiquée en cancérologie. Pour résoudre ces problèmes, et compte tenu du rôle essentiel joué par l'épithélium respiratoire dans le rejet, nous avons expérimenté l'allogreffe trachéale dénudée d'épithélium et cryopréservée.

Méthodes. Onze lapins New Zealand femelles furent donneurs de trachée laquelle fut dénudée de son épithélium et cryopréservée. Lors de la première phase (transplantation hétérotopique), 13 lapins mâles ont reçu des segments longs de trachée (10/12 anneaux), avec ou sans tuteur interne, enveloppés dans un lambeau de fascia latéro-thoracique. Puis, 14 transplantations orthotopiques ont été effectuées : 3 avec des segments longs, après revascularisation fasciale hétérotopique et 11 en un temps, de segments moyens (6/8 anneaux) ou courts (4/5 anneaux), revascularisés *in situ* par les muscles sous hyoïdiens. Un suivi bronchoscopique a été effectué. Aucun traitement immunosuppresseur n'a été administré.

Résultats. Après transplantation hétérotopique, les greffons avec tuteur ont gardé une morphologie satisfaisante, jusqu'à J91. Après transplantation orthotopique, quatre animaux ont été sacrifiés de J33 à J220. La survie des autres a varié de zéro à 47 jours (moyenne $19,6 \pm 16,7$). En dehors des trois animaux décédés de complications lors de la deuxième phase, les greffons avaient une rigidité satisfaisante et étaient revascularisés. Microscopiquement, la néo angiogenèse était présente et l'inflammation variable, mais dépourvue de lymphocytes. Les événements apoptotiques évoquaient un rejet *a minima*. Les anneaux cartilagineux se calcifiaient progressivement, assurant la rigidité des greffons. Après transplantation orthotopique, des degrés variables de prolifération endoluminale fibroblastique provenant de la lamina propria étaient observés, s'organisant en fibrose collagène après 45 jours. La régénération épithéliale était constante. Finalement, la fibrose de la lamina propria a entraîné une sténose critique, essentiellement chez les animaux ayant reçus des greffons longs et moyens.

Conclusion. Nous avons démontré la revascularisation, la tolérance immunitaire et la conservation des qualités biomécaniques de l'allogreffe trachéale dénudée d'épithélium et cryopréservée en hétérotopie, ainsi que la faisabilité de la transplantation trachéale orthotopique sans immunosuppression avec ce greffon. Des investigations dans une espèce de grande taille sont nécessaires avant d'envisager des applications cliniques.

Keywords

- ◆ Animal model
- ◆ Allograft
- ◆ Immune rejection
- ◆ Trachea
- ◆ Transplantation

Abstract

Objectives: Tracheal transplantation raises 2 major issues: the lack of an individualized vascular pedicle, which impedes immediate revascularization of the graft, as in solid organ transplantation, and immune rejection with the need for immunosuppressive therapy, strictly contraindicated in malignancies. Given that respiratory epithelium plays an essential role in the immune response of tracheal allografts, we have investigated the epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft in a rabbit model.

Methods: Eleven adult female New Zealand rabbits served as donors of tracheas that were denuded of their epithelium and then cryopreserved. During the first phase of the study, 13 males were used as recipients. Following graft wrap using a lateral thoracic fascial flap, long allograft segments (10/12 tracheal rings) were implanted under the skin. During the second phase of the study, tracheal transplantation was performed in 14 male recipients receiving: (i) long allograft segment with prior heterotopic revascularization; (ii) average allograft segment (6-8 tracheal rings) or (iii) short allograft segment (4-5 tracheal rings), with single-stage orthotopic

Correspondance :

Alain Wurtz, Clinique de chirurgie cardiaque et thoracique
CHU de Lille - F59037 Lille Cedex.

Tel : +33 3 20 44 45 59 - Fax : +33 3 20 44 48 90 - E-mail : alain.wurtz@chru-lille.fr

Disponible en ligne sur www.academie-chirurgie.fr

1634-0647 - © 2014 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

DOI : 10.14607/emem.2015.2.119

revascularization by graft wrap with the strap muscles. Bronchoscopic follow-up was performed. No immunosuppressive therapy was administered.

Results: After heterotopic transplantation allografts displayed satisfactory tubular morphology up to Day 91 provided that an endoluminal tube was inserted. After orthotopic transplantation, four animals were sacrificed from Day 33 to Day 220. The survival time of other recipients was 0 to 47 days (mean $19.6 \pm 16.7.3$ days). Aside from 3 animals that died from complications, all allograft segments had satisfactory stiffness, were well vascularized, showed varying levels of neoangiogenesis and inflammatory infiltration devoid of lymphocytes, and showed evidence of only low levels of apoptosis suggestive of minimal rejection. Cartilage rings exhibited calcification deposits increasing over time, ensuring graft stiffness. After orthotopic transplantation, varying degrees of fibroblastic proliferation originating from the lamina propria was observed in the lumen of allografts and evolved over time into collagenized fibrosis in animals surviving over 45 days. Epithelial regeneration was constantly observed. Intense fibroblastic proliferation led to stenosis mainly in animals receiving long and average allograft segments.

Conclusion: We have demonstrated satisfactory neoangiogenesis, immune tolerance and strain abilities of the epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft in heterotopy despite the absence of immunosuppressive drugs, and then the feasibility of orthotopic transplantation with such allografts. Similar studies need, however, to be conducted in bigger mammals before considering clinical applications.

La première solution qui vient à l'esprit pour assurer un remplacement circonférentiel étendu de la trachée est la transplantation trachéale (TT). Malgré un succès clinique initial, pour lequel on ne dispose que d'un recul de 9 semaines (1), la TT a été longtemps considérée comme vouée à l'échec du fait de la nécrose, de la sténose ou de la malacie du greffon (2), conséquences d'une interaction entre les phénomènes d'ischémie et de rejet. La TT pose, en effet, deux problèmes majeurs :

- l'absence de pédicule vasculaire individualisé, qui autoriserait une revascularisation immédiate du greffon, comme dans une transplantation d'organe plein ;
- la nécessité d'une immunosuppression, une contrainte thérapeutique lourde ; et qui, par ailleurs, est formellement contre indiquée en cancérologie.

Une stratégie déjà utilisée en clinique consiste à revasculariser un segment d'allogreffe trachéale en hétérotopie dans le fascia ante brachial, puis à le réimplanter en orthotopie comme un lambeau libre, en le revascularisant par anastomoses microchirurgicales aux vaisseaux du cou. Cependant cette technique comporte plusieurs limitations majeures :

- elle n'autorise pas la réalisation de remplacements trachéaux circonférentiels, du fait de la nécrose membraneuse lors de la phase initiale d'ischémie qui précède la néoangiogenèse du greffon ;
- la persistance de la sécrétion muqueuse en hétérotopie oblige à marsupialiser le greffon à la peau sur toute sa longueur, avec le risque infectieux que cela entraîne ;
- une immunosuppression de quelques semaines est nécessaire avant transplantation, ce qui, en principe, devrait limiter les indications aux pathologies bénignes (essentiellement les sténoses) (3,4).

En conséquence, nous nous sommes orientés vers une voie de recherche novatrice basée sur un double constat :

- la cryopréservation contribue à réduire le rejet immunologique de l'allogreffe trachéale (5,6) ;
- l'épithélium respiratoire est le principal vecteur de ce rejet, par l'intermédiaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe II, alors qu'à l'opposé, le cartilage trachéal est particulièrement bien toléré (6).

Compte tenu de notre expérience antérieure des modèles lagomorphes dans le domaine du remplacement trachéal (7,8), nous avons conduit deux séries d'expérimentations sur ce type de modèle, visant à apprécier la revascularisation, la tolérance immunitaire et les propriétés biomécaniques de l'allogreffe trachéale désépithélialisée et cryopréservée (ATDC), après transplantation en hétérotopie, puis en orthotopie, et en l'absence de traitement immunosuppresseur (9,10).

Matériel et méthodes

Notre protocole de recherche (N° : CEEA 09212) a été approuvé par le Comité d'éthique en expérimentation animale Nord-Pas de Calais. Il a été conduit selon les règles de l'expérimentation animale, édictées par le Ministère de l'agriculture de l'agro-alimentaire et de la forêt.

Animaux

Trente-huit lapins blancs New Zealand (NZ), pesant de 3170 à 4575 g (CEGAV [SCC], La Passerie, Saint-Mars-d'Egrenne, France) ont été utilisés pour les deux phases de l'étude. Ils ont été hébergés en cages individuelles au Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE) du CHU de Lille.

Prélèvement, désépithélialisation et cryopréservation des allogreffes trachéales

Onze lapins femelles NZ ont servi de donneurs. Après prémédication par injection intramusculaire de ketamine (50mg/kg) et de xylazine (2,5mg/kg), les animaux ont été euthanasiés par injection intracardiaque de T61 (Intervet, Beaucousé, France). Chaque trachée a été prélevée en totalité par voie cervicale et transmédiastinale. La muqueuse a été abrasée par frottement dur et répété à l'aide d'un tampon monté introduit dans la lumière trachéale, afin d'obtenir une trachée désépithélialisée. Puis chaque greffon a été immergé dans une solution d'incubation (+4° à +8°) contenant un cocktail d'antibiotiques dilué dans 50 ml de milieu 199 de Hanks, et transféré à European Homograft Bank (Brussels, Belgium). Après une phase d'incubation de 48h au total, et après avoir été placé dans un milieu de cryoprotection (diméthyl sulfoxyde - DMSO - dans la solution de Hanks 199), chaque greffon a été cryopréservé puis stocké entre -150° et -180°. Avant usage, chaque greffon a été décongelé et rincé au sérum physiologique à +4°.

Anesthésie des receveurs

Le protocole d'anesthésie des 27 lapins NZ mâles a comporté une prémédication, comme précisé ci-dessus ; puis le maintien d'une anesthésie en ventilation spontanée, par inhalation au masque d'un mélange d'isoflurane (2 %) et d'oxygène (60 %).

Technique opératoire

Préparation des greffons trachéaux

Les allogreffes trachéales décongelées étaient divisées en segments longs (10/12 anneaux), moyens (6/8 anneaux) ou courts (4/5 anneaux) ; le plus distal était adressé en routine

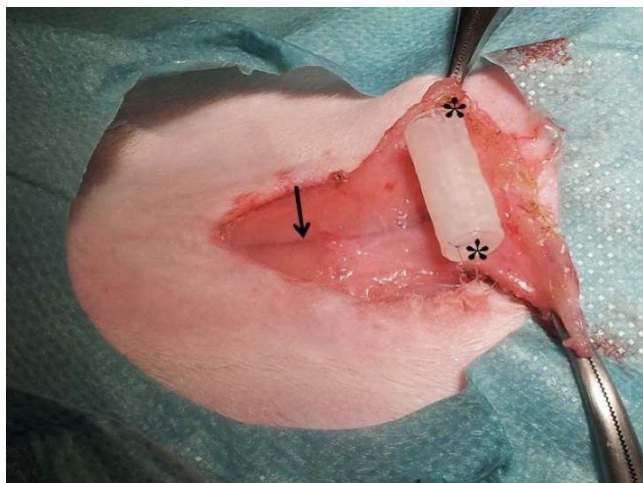


Figure 1. Vue opératoire. Présentation du segment d'allogreffe trachéale désépithérialisée et cryopréservée sur le lambeau de fascia latéro thoracique, avec son pédicule vasculaire (flèche). Le greffon est fixé à chaque extrémité du tuteur endoluminal par un point de suture (étoiles), afin de le maintenir à sa morphologie et longueur initiales.



Figure 2. Vue opératoire. Transplantation trachéale orthotopique en 1 temps d'un greffon court. Après résection adéquate de la trachée native, le segment d'allogreffe trachéale désépithérialisée et cryopréservée est interposé grâce à deux sutures circonférentielles au monofil non résorbable (en vue de repérage des anastomoses en bronchoscopie et sur pièce anatomique).

au laboratoire, afin de vérifier le caractère effectif de la désépithérialisation.

Lors de la phase de transplantation en hétérotopie, les quatre premiers segments trachéaux longs ont été utilisés en l'état. Compte tenu des résultats observés (rétraction progressive des greffons), nous avons ensuite mis en place un tuteur interne en polyéthylène 16f, fixé à chaque extrémité par un point de PDS II 6/0 (Ethicon France, Issy Les Moulineaux, France), de façon à maintenir le segment trachéal à sa morphologie et longueur initiales (Fig 1). Lors des TTs orthotopiques, des segments longs, moyens et courts ont été utilisés, des travaux antérieurs effectués sur modèles canins ayant démontré que le succès, ou l'échec, de la revascularisation des greffons était étroitement dépendant de leur longueur (11,12).

Transplantation trachéale hétérotopique

Elle a consisté en l'enveloppement de chaque segment d'ATDC dans une structure richement vascularisée, le fascia superficialis latéro-thoracique (7,8). Une incision basithoracique de 5 cm à gauche de la crête mamelonnaire du receveur autorisait la préparation d'un lambeau de fascia latéro-thoracique quadrangulaire, à charnière crâniale, axé sur son pédicule naissant des vaisseaux sub claviers (Fig 1). Chaque greffon était enveloppé de manière circonférentielle avec l'extrémité libre du lambeau, qui était suturé à lui-même par un surjet continu, ou des points séparés de PDS II 6/0. Enfin la peau était refermée à points séparés.

Transplantation trachéale orthotopique en 2 et 1 temps

Les greffons longs ont été d'abord revascularisés en hétérotopie dans le fascia, comme cela vient d'être décrit (TT en 2 temps). Après une période de 14 jours, l'incision basithoracique était reprise, le greffon était mobilisé par incision du fascia en direction crâniale, de part et d'autre de son pédicule vasculaire. Puis le larynx et la trachée étaient exposés par cervicotomie médiane. Un tunnel sous cutané entre les deux incisions autorisait le transfert du greffon enveloppé de fascia au cou, par retournement sur l'axe du lambeau. Après résection d'un segment de trachée à partir du troisième ou quatrième anneau, sur une longueur de 20 mm (résection de 8-10 anneaux), la TT était faite en ventilation spontanée, à trachée ouverte (8,13). Les anastomoses proximale et distale, entre greffon et trachée native, ont été faites par 6 à 7 points séparés de monofil non résorbable : Prolène 6/0 (Ethicon

France, Issy Les Moulineaux, France) autorisant ainsi un repérage des zones d'anastomose en bronchoscopie et/ou sur pièce anatomique. Les deux incisions, thoracique et cervicale, étaient refermées en un plan.

Après résection adéquate de la trachée native, les segments d'ATDC moyens et courts ont été interposés (TT en 1 temps, sans revascularisation hétérotopique préalable) par une double suture circonférentielle comme préalablement décrit (Fig 2). Avant fermeture cutanée, les muscles sous hyoïdiens étaient suturés étroitement au contact du fût laryngo-trachéal, afin d'assurer la néo angiogenèse *in situ* du greffon (14).

Suivi des animaux

Après une surveillance de 3 heures, les lapins retournaient dans leur cage, où nourriture et boisson étaient à leur disposition.

En post opératoire, 2 injections de Buprenorphine (0,05 mg/kg) étaient administrées à titre antalgique à J1, et un traitement additionnel par patch de Durogésic 25 µg/cm² après TT orthotopique. L'antibioprophylaxie a consisté en l'administration d'Enrofloxacin, 25 mg/jour IM, pendant 5 jours. Les animaux ne recevaient pas de traitement immunosuppresseur. Le suivi des groupes d'animaux a été clinique, et aussi endoscopique lors de la deuxième phase de l'étude. Les examens ont été conduits à l'optique rigide, sous anesthésie générale et ventilation spontanée. Ils ont tous été enregistrés en vidéo. Les examens programmés ont recherché des signes de régénération épithéliale et de néo angiogenèse, caractérisés par un aspect rosé de la lumière trachéale et la visualisation de néo vaisseaux. Des gestes interventionnels de désobstruction ou de dilatation à la pince porte optique, au tampon de coton imprégné d'un corticoïde à action locale (Budénoside 1 mg, 2 ml dilué dans 10 ml de sérum physiologique) ont été effectués à la demande, en fonction du contexte clinique.

Après enveloppement fascial isolé, les animaux ont été euthanasiés de manière programmée. Après TT orthotopique, ils ont été suivis jusqu'au décès, ou ont été euthanasiés.

Evaluation macroscopique des greffons

Après prélèvement du segment d'ATDC et de son fascia d'enveloppement, ou du fût laryngo-trachéal après TT orthoto-

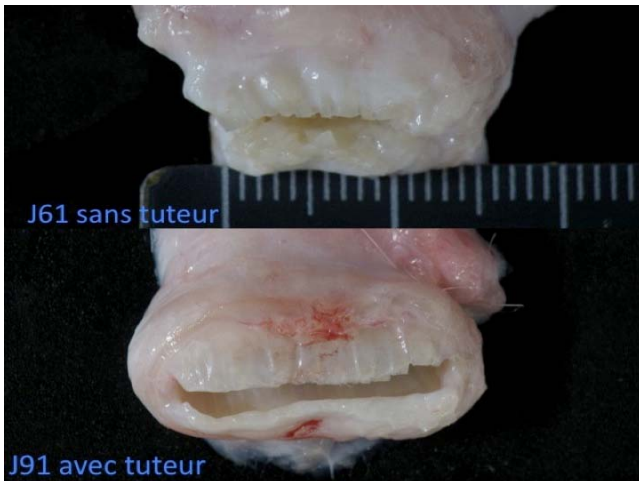


Figure 3. Transplantation hétérotopique. Aspect macroscopique de greffons fendus longitudinalement. En haut, un greffon enveloppé de son fascia sans tuteur interne, et prélevé à J61 (lapin 7) : il est rétracté, avec chevauchement des anneaux cartilagineux. En bas, un greffon enveloppé avec tuteur interne et prélevé à J91 (lapin 13) : la structure trachéale est préservée, avec des anneaux cartilagineux régulièrement espacés.

rique, l'apparence et la consistance de chaque greffon ont été évaluées par compression manuelle, mais sans étude biomécanique formelle. Puis la pièce était fendue longitudinalement afin d'apprécier l'aspect de la face luminale du greffon.

Etude histologique

Après 24 à 48 heures de fixation par le formol tamponné à 4 %, des sections transversales et longitudinales des greffons ont été incluses dans la paraffine. Les blocs ont été coupés à 3- μ m d'épaisseur et colorés à l'hématoxyline-eosine-safran (HES), pour examen microscopique. Une attention particulière a été portée au degré d'infiltration lymphocytaire, et à la recherche de signes de néo angiogenèse. Pour le cartilage, l'ischémie, puis la perte de viabilité étaient caractérisées par l'évanescence des chondrocytes, et une perte de l'affinité tinctoriale des protéoglycanes de la matrice extracellulaire. L'apparition de dépôts calciques a été évalué comme décrit par ailleurs (8) :

- +, calcification centrale inférieure à 10 % de la surface cartilagineuse
- ++, 10-50 %
- +++, supérieure à 50 %.

La fibrose jeune (cellulaire) ou organisée (fibres de collagène organisées en trousseaux) de la lamina propria ont également été évaluées ; ainsi que la régénération épithéliale sur un mode métaplasique ou bien différencié, après implantation orthotopique des greffons.

Détection des cellules en apoptose

L'apoptose cellulaire est un marqueur de rejet chronique *a minima* (15). Elle peut être également consécutive à l'ischémie initiale du greffon. La recherche d'événements apoptotiques a été effectuée avec le kit APOSTAIN (Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France) sur les segments d'ATDC, après enveloppement fascial isolé (transplantation hétérotopique), et après TT orthotopique en 1 temps. Le nombre de cellules apoptotiques au niveau du cartilage et de l'ensemble lamina propria/tissu péri cartilagineux a été apprécié de manière semi quantitative avec l'anticorps murin monoclonal (clone F7-26, Abcam, Cambridge, MA). Cet anticorps est spécifique de l'ADN fragmenté simple brin, qui est un marqueur spécifique du processus d'apoptose.

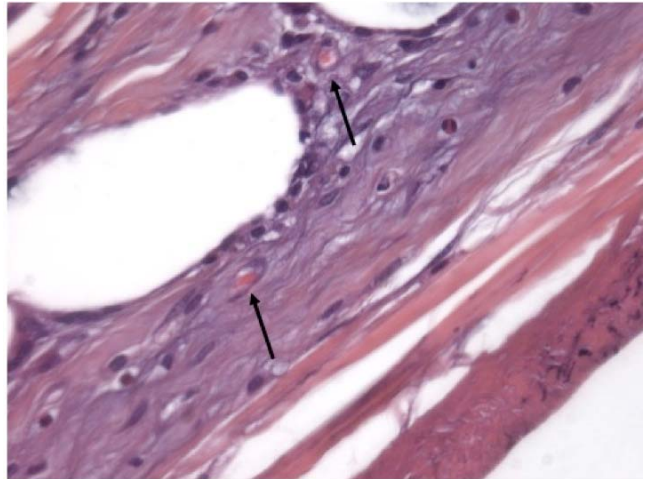


Figure 4. Examen histologique d'un greffon à J7 après TT hétérotopique (lapin 1). Des néo vaisseaux sont déjà présents dans la lamina propria (petites flèches). (HES x400).

Résultats

Transplantation trachéale en hétérotopie

Après enveloppement fascial isolé de segments longs d'ATDC, il n'y a eu ni complication ni mortalité chez les lapins opérés. Ils ont été euthanasiés de J7 à J91 (Tableau I).

Evaluation macroscopique des segments trachéaux

Les segments d'ATDC enveloppés sans tuteur interne gardaient leur morphologie tubulée normale jusqu'à J19. Puis de J28 à J61 on observait une rétraction longitudinale entraînant un chevauchement des anneaux cartilagineux ; et circonférentielle réduisant significativement la lumière des greffons (Fig 3). Toutefois il n'existait pas de prolifération tissulaire endoluminale, la surface interne restant pâle et lisse. Cette altération de la structure tubulée des greffons nous a conduits à réduire à quatre le nombre d'animaux opérés dans ce premier groupe. A l'opposé, grâce au tuteur, la morphologie des neuf autres greffons restait satisfaisante jusqu'à J91, avec des

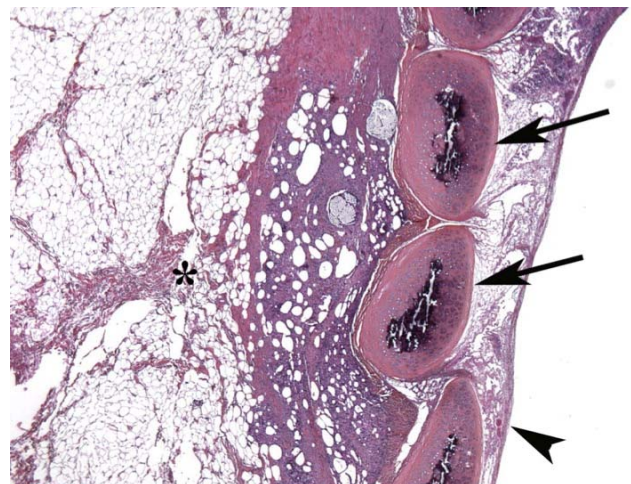


Figure 5. Examen histologique en coupe transversale d'un greffon à J14 après TT hétérotopique (lapin 2). Absence d'inflammation significative. Le fascia d'enveloppement est repéré par l'étoile. Les anneaux cartilagineux sont viables, avec une calcification centrale. La lamina propria n'est pas épaissie ; un néo vaisseau est repéré par la tête de flèche. (HES x25).

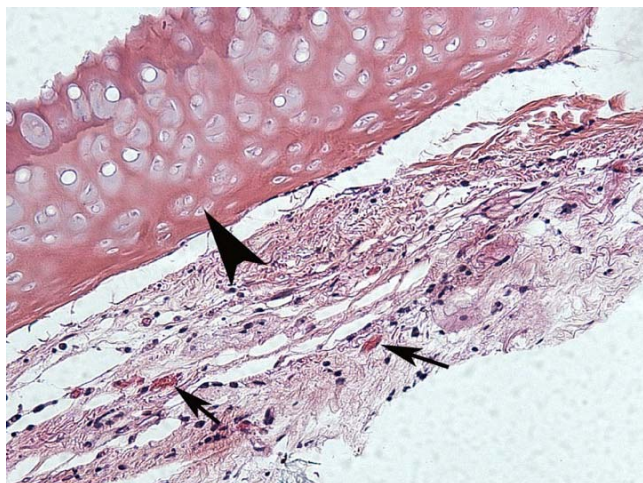


Figure 6. Examen histologique en coupe transversale d'un greffon à J61 après TT hétérotopique (lapin 11). Le cartilage a perdu de sa vitalité en périphérie (tête de flèche). Fibrose organisée de la lamina propria, qui est modérément épaissie. Présence, en son sein, de nombreux néo vaisseaux (petites flèches). (HES x400).

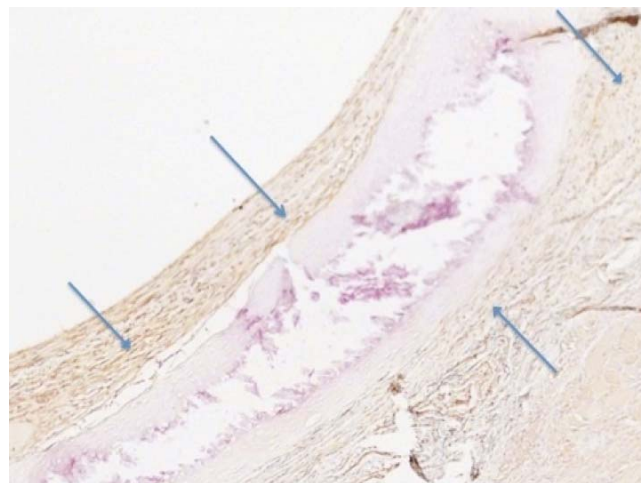


Figure 7. Immunomarquage par APOSTAIN sur un greffon prélevé à J42 après TT hétérotopique (lapin 8) montrant des cellules en apoptose, marquées en brun, au niveau de la lamina propria et du tissu péri cartilagineux (petites flèches). Absence de marquage au niveau du cartilage.

anneaux cartilagineux de morphologie normale et régulièrement espacés (Fig 3).

Etude histologique

L'ensemble des segments d'ATDC enveloppés avec ou sans tuteur interne avaient un aspect similaire : les greffons entourés du fascia présentaient des signes de néo angiogenèse sous forme de capillaires néoformés apparaissant d'abord au niveau de la lamina propria dès le septième jour (Fig 4). Il existait une infiltration inflammatoire de faible intensité, principalement composée d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages. L'infiltration lymphocytaire était minime, sauf à proximité d'une inclusion épithéliale située dans la lamina propria chez les lapins 3 et 5 ; ou d'un îlot épithélial résiduel chez le lapin 7. Les anneaux cartilagineux étaient le siège de dépôts calciques centraux (Fig 5). Après un mois, les calcifications s'accroissaient et on observait une évanescence des chondrocytes en périphérie du cartilage. Quant à la lamina propria, elle était le siège d'une fibrose organisée progressive entraînant un épaississement modéré, n'oblitérant pas la lumière, y compris au niveau des greffons enveloppés sans tuteur interne (Fig 6).

Détection des cellules en apoptose

De rares cellules cartilagineuses en apoptose n'ont été observées qu'en phase précoce, chez le lapin 1 sacrifié à J7. Au niveau de la lamina propria et du tissu péri cartilagineux, les

événements apoptotiques étaient plus intenses, caractérisés par un marquage en brun (Fig 7), avec une distribution dans le temps en courbe de Gauss (pic à J20) (Tableau I).

Transplantation trachéale orthotopique en 2 et 1 temps

Après TT orthotopique, la survie des animaux a varié de 0 à 47 jours (moyenne 19,6 ± 16,7 jours) et quatre ont été euthanasiés de manière programmée. Bien que présentés avec l'ensemble des résultats dans le Tableau II, les résultats des animaux ayant présenté un décès fortuit dans les 24h (lapin 17), ou une complication suppurée (lapins 19 et 20), ne seront pas inclus dans l'analyse et seront discutés avec les limites de l'étude.

Evaluation macroscopique

L'ensemble des greffons présentait une rigidité et une revascularisation satisfaisantes indépendamment de leur longueur ou du mode de revascularisation, hétérotopique ou orthotopique. Des sténoses en sablier, très comparables aux sténoses post intubation, sont survenues plus ou moins précocement, chez les animaux transplantés avec des segments longs et moyens, alors qu'une seule, tardive, était observée chez les sept animaux transplantés avec des segments courts (Fig 8). Finalement, quatre animaux de ce groupe ont été euthanasiés

Lapin	Tuteur endoluminal	Date du sacrifice	Ilot épithélial résiduel	Cartilage Ischémie/ Calcification	Inflammation	Infiltration lymphocytaire	Néo angiogenèse	Apoptose lamina propria et TPC
1	+	J7	-	-	-	-	+	+
2	-	J14	+	-	+	+/-*	+	++
3	+	J15	-	50 %	+	-	+	++
4	-	J19	+	-	+	+/-*	+	+
5	+	J20	-	10 %	+	-	+	+++
6	-	J28	-	50 %	++	-	+	++
7	+	J29	+	-	+	+/-*	+	+
8	+	J42	-	50 %	++	-	+	++
9	+	J51	-	80 %	++	-	+	+
10	+	J54	-	90 %	++	-	+	+
11	-	J61	-	90 %	++	-	+	+
12	+	J88	-	100 %	++	-	+	+
13	+	J91	-	100 %	++	-	+	+

*Infiltrat lymphocytaire entourant un îlot d'épithélium résiduel ; TPC : Tissu péri cartilagineux.

Tableau I. Données des 13 lapins mâles opérés de transplantation hétérotopique d'un segment d'allogreffe trachéale désépithérialisée et cryopreservée.



Figure 8. Transplantation orthotopique en un temps. Aspect macroscopique à J47 (lapin 25) après section longitudinale de la voie aérienne centrale : greffon bien réépipithélié et revascularisé et siège d'une sténose en sablier.

et présentaient une voie aérienne perméable (Fig 9) (Tableau II).

Suivi bronchoscopique

Le nombre d'examen a été en moyenne de quatre par animal (extrêmes 2 - 18). Trente-cinq étaient systématiques et 17 étaient des bronchoscopies interventionnelles : 11 aspirations de sécrétions ou de dépôts de fibrine ; 6 dilatations de sténose et/ou traitement de granulomes par application au tampon d'un corticoïde local (Budesonide).

Tous les greffons observés précocement (4/6 jours) avaient un aspect blanchâtre. Au niveau des greffons moyens et à partir du 10/12 jour, apparaissaient des signes de revascularisation/réépipithéliation sous forme de plages rosées et de néo vaisseaux. Des sténoses de 30 à 40 % se développaient par la suite, d'évolution défavorable malgré les dilatations. Au niveau des greffons courts, les signes de revascularisation/réépipithéliation étaient plus précoces (Fig 10). Des sténoses modérées ont été observées, traitées efficacement par dilatations, chez trois des quatre animaux euthanasiés. Seul le lapin 26, sacrifié à J101, n'a eu besoin d'aucune dilatation de son greffon.

Etude histologique

Les signes de néo angiogenèse étaient présents au niveau de tous les greffons indépendamment du mode de revascularisation

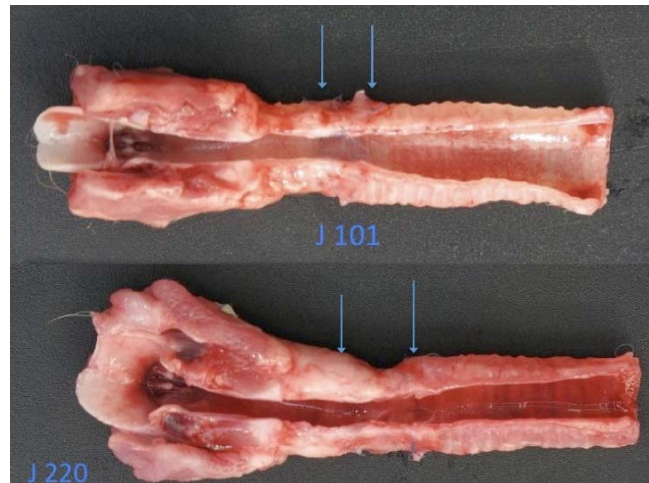


Figure 9. Transplantation orthotopique en un temps. Aspect macroscopique à J101 (lapin 26) et J220 (lapin 27), après section longitudinale de la voie aérienne centrale. Les greffons (repérés par les flèches) sont perméables, bien revascularisés et réépipithéliés.

(hétérotopique ou *in situ*). L'infiltration inflammatoire était d'intensité variable, principalement composée d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages mais sans lymphocyte, témoignant de la bonne tolérance immunitaire des greffons. Une prolifération endoluminale fibroblastique, ayant pour point de départ la lamina propria, était observée. Elle était intense et précoce au niveau des greffons longs, oblitérant la lumière (Fig 11). Plus tard elle évoluait vers une fibrose organisée avec épaissement plus ou moins marqué de la lamina propria. Des calcifications centrales apparaissaient au niveau des cartilages, tandis que, en périphérie, on observait une évanescence des chondrocytes, comme dans la phase précédente. La régénération épithéliale était constamment observée à partir du 8/9 jour, sur un mode métaplasique ou bien différenciée (Fig 12).

Détection des cellules en apoptose

Chez le lapin 17, décédé dans les 24h, quelques cellules en apoptose étaient vues en périphérie du cartilage (Fig 13). Au niveau de la lamina propria et du tissu péri cartilagineux, les événements apoptotiques étaient également observés, mais

Lapin	Anneaux trachéaux (groupe)	Bronchoscopie (n) systématique/interventionnelle	Date du décès (cause) / Date du sacrifice	Néo angiogenèse	Cartilage ischémie/calcifcation	Fibrose Lamina propria	Régénération Epithelium	Inflammation non spécifique/ lymphocytaire	Apoptose lamina propria et TPC
14	12 (long, RVH)	-/-	J3 (sténose)	+++	-/-	Minime		+++/-	*
15	10 (long, RVH)	-/-	J8 (sténose)	+	-/+	Jeune	métaplasique	++/-	*
16	12 (long, RVH)	-/-	J9 (sténose)	+	-/++	Jeune	-	+++/-	*
17	8 (moyen)	-/-	J0 (fortuit)	-	-/-	-	-	-/-	++
18	6 (moyen)	1/1	J16 (sténose)	+++	30%/+	Jeune	métaplasique	+++/-	Minime
19	7 (moyen)	-/2	J26 (sténose)	+	100%/+++	Jeune	métaplasique	-/-	+
20	6 (moyen)	2/1	J48 (sténose)	+	80%/+++	Organisée	métaplasique	+/-	Minime
21	5 (court)	1/1	J19 (suppuration)	+++	90%/+++	Jeune	-	+++/-	+
22	5 (court)	-/3	J20 (suppuration)	+++	100%/+++	Jeune	métaplasique	+++/-	+
23	4 (court)	1/3	J33 (sacrifice)	+	100%/+++	Jeune	différencié	++/-	+
24	4 (court)	2/2	J39 (sacrifice)	+	100%/+++	Jeune	différencié	++/-	+
25	4 (court)	5/-	J47 (sténose)	+++	90%/+++	Jeune	métaplasique	+/-	+
26	4 (court)	9/1	J101 (sacrifice)	+	60%/++	Organisée	différencié	+/-	Minime
27	4 (court)	14/3	J220 (sacrifice)	+	100%/+++	Organisée	métaplasique	-/-	-

*RVH : Revascularisation hétérotopique avant transplantation orthotopique ; TPC : Tissu péri cartilagineux ; - : Pas d'étude.

Tableau II. Données des 14 lapins mâles opérés de transplantation orthotopique d'un segment d'allogreffe trachéale désépithéliée et cryopreservée.



Figure 10. Evolution endoscopique chez le lapin 26, euthanasié à J101. De haut en bas et de gauche à droite, aspects à J6 (greffon encore blanchâtre), J13 (granulome sur la berge postéro gauche de l'anastomose proximale), J35, J47, J59, J90 (revascularisation évidente du greffon avec visibilité des néo vaisseaux ; perméabilité persistante).

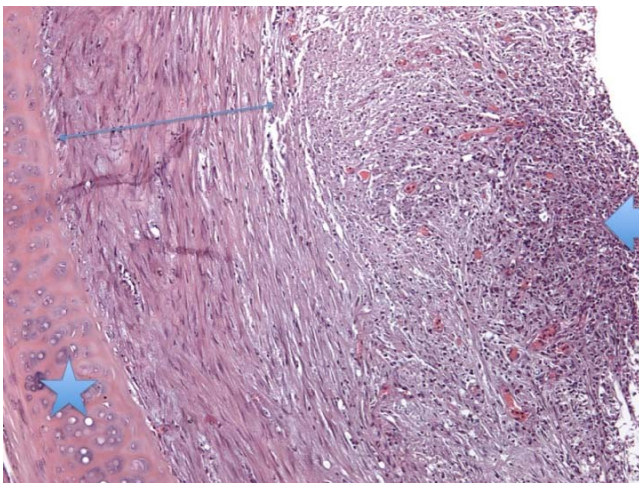


Figure 11. Examen histologique en coupe transversale d'un greffon à J9, après TT orthotopique en 2 temps (lapin 16). La lumière du greffon est envahie par une prolifération endoluminale fibroblastique riche en néo vaisseaux (grosse flèche), commençant à s'organiser en trousseaux de fibres de collagène (double flèche). Cartilage viable (étoile). (HES x200).

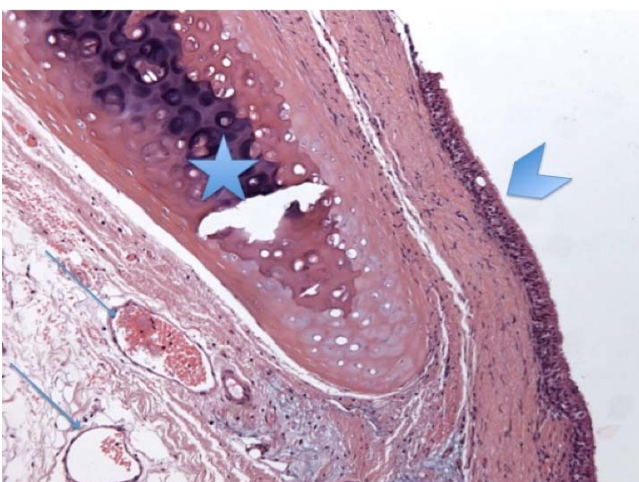


Figure 12. Examen histologique en coupe transversale d'un greffon court, à J101 après TT orthotopique en 1 temps (lapin 26). La revascularisation est évidente (petites flèches). Calcification centrale du cartilage (étoile). Fibrose de la lamina propria, mais sans épaissement. Régénération épithéliale sur un mode différencié (tête de flèche). (HES x200).

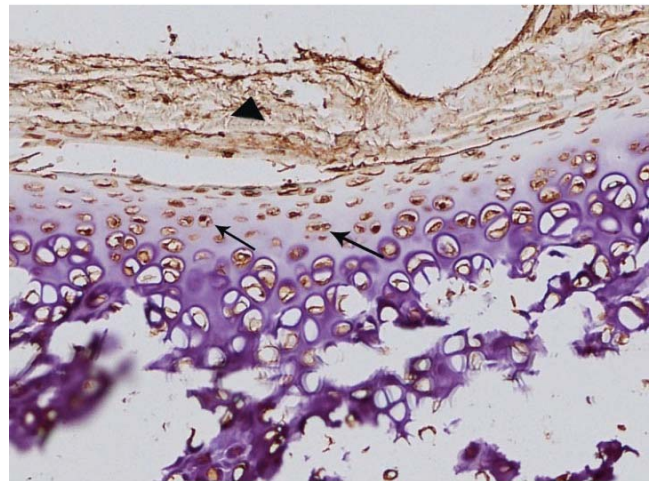


Figure 13. Immunomarquage par APOSTAIN sur un greffon prélevé chez un lapin décédé dans les 24h après TT orthotopique (lapin 17). La présence de chondrocytes en apoptose en périphérie du cartilage (petites flèches) est évocatrice d'une ischémie initiale du greffon. La lamina propria est repérée par la tête de flèche.

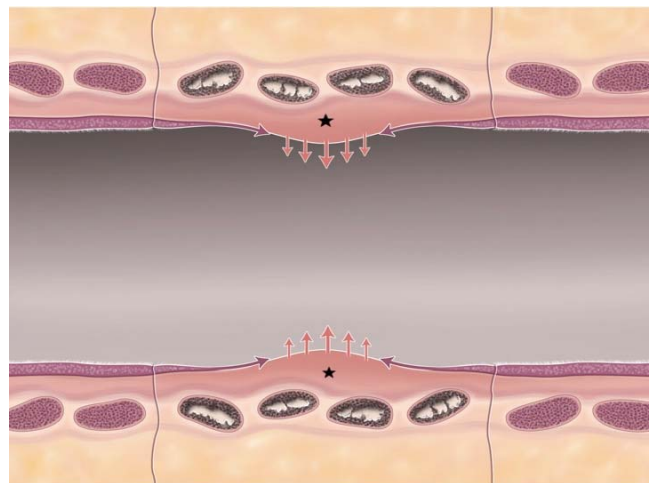


Figure 14. Représentation schématique de la « compétition » entre la prolifération fibroblastique et la régénération épithéliale. Le schéma représente, en coupe longitudinale, un greffon de 4 anneaux (partiellement calcifiés) interposé entre les 2 segments de la trachée native. Les flèches roses représentent la prolifération fibroblastique provenant de la lamina propria (étoiles), ayant tendance à obturer la lumière du greffon. Elle est contenue par la réépithélialisation concomitante du greffon provenant des deux extrémités anastomosées de la trachée native et représentée par les flèches violettes.

d'intensité moindre que lors de la phase précédente de transplantation en hétérotopie.

Discussion

Les résultats des remplacements trachéaux par allogreffe aortique chez l'homme, intéressants en terme de survie à long terme (16-18), mais anatomiquement décevants en terme de « trachéalisation » des greffons (absence de développement d'anneaux cartilagineux), nous ont conduit à changer de modèle expérimental. Chez notre modèle lagomorphe, la transplantation hétérotopique puis orthotopique de segments d'ATDC a montré que la néo angiogenèse, les propriétés biomécaniques et la tolérance immunitaire des greffons étaient satisfaisantes, quel que soit leur longueur et leur mode de revascularisation. Cependant, des différences de comportement des greffons, en hétérotopie et orthotopie, ont été observées. Il est bien connu que l'épithélium respiratoire est le principal vecteur du rejet immunologique des allo-

Auteurs (année)	Nombre de lapins	Mortalité per opératoire	Mortalité à 3 semaines
Delaere <i>et al.</i> (1995) (13)	15	-	8
Dodge-Khatami <i>et al.</i> (2003) (24)	7	-	3*
Tanaka <i>et al.</i> (2003) (14)	7	-	2
Weidenbecher <i>et al.</i> (2009) (23)	6	-	4
Shi <i>et al.</i> (2009) (22)	15	-	5
Seguin <i>et al.</i> (2013) (25)	34	2	4
Wurtz <i>et al.</i> (2013) (8)	10	1	3
Hysi <i>et al.</i> (2015) (10)	14	-	7

* euthanasie pour détresse respiratoire aiguë.

Tableau III. Résultats des transplantations et remplacements trachéaux sur des modèles lagomorphes.

greffes, mais par ailleurs ce même épithélium constitue une barrière contre l'infection et son absence est un facteur de risque de suppuration du greffon en orthotopie (2), comme observé chez deux de nos animaux.

Une autre constatation de notre étude est que, contrairement à ce qui était observé en hétérotopie, il y a, après TT orthotopique, un risque réel de prolifération endoluminale fibroblastique provenant de la lamina propria. Elle pourrait être en relation avec l'environnement plus inflammatoire, du fait de la contamination par la flore oro-pharyngo-trachéale (8). Pour autant, la régénération épithéliale, en contenant la prolifération endoluminale fibroblastique, joue un rôle essentiel dans le maintien de la perméabilité des allogreffes (19,20). Chez notre modèle, cette régénération provenait des deux extrémités de la trachée native anastomosées au greffon et, de ce fait, était d'autant plus lente à s'établir que le segment d'ATDC était plus long. Ainsi, cette « compétition » entre la régénération épithéliale d'une part, et la prolifération endoluminale fibroblastique d'autre part (Fig 14), pourrait être à l'origine du développement des sténoses létales essentiellement après transplantation de segments longs et moyens, et dont la précocité de survenue était directement proportionnelle à la longueur des greffons (Tableau II).

Delaere *et al.*, qui avaient précédemment étudié la TT chez le lapin, avaient observé un rejet aigu des allogreffes dans leur groupe contrôle (sans immunosuppression), caractérisé par une infiltration lymphocytaire massive et une thrombose capillaire entraînant une nécrose du greffon (13). Nous n'avons constaté rien de tel au cours de nos TTs aussi bien en hétérotopie qu'en orthotopie, confirmant ainsi le rôle essentiel de la désépithélialisation dans la tolérance immunitaire des greffons. Cependant, l'apoptose cellulaire observée au niveau de la lamina propria et du tissu péri-cartilagineux des greffons en hétérotopie pourrait être le reflet d'un rejet *a minima*, compte tenu de son évolution quantitative en courbe de Gauss, alors que la revascularisation du greffon était déjà bien établie. Les événements apoptotiques étaient encore plus faiblement observés après TT orthotopique, ce qui n'est pas étonnant car la régénération épithéliale contribue à l'acceptation du greffon par l'hôte (21).

Au niveau des anneaux cartilagineux, on a également observé des événements apoptotiques en phase précoce, qui, selon Tanaka *et al.*, pourraient être la conséquence de l'ischémie initiale du greffon (14). Cependant le mécanisme par lequel, chez le lapin, le cartilage perd de sa vitalité puis se calcifie au fil des semaines demeure obscur.

Finalement, en dépit de la bonne tolérance immunitaire et de la persistance de la rigidité due à la calcification des cartilages, la prolifération endoluminale fibroblastique provenant de la lamina propria constitue une sévère hypothèque à la mise en œuvre de la transplantation de segments longs d'ATDC. Cette difficulté pourrait être résolue par l'utilisation d'une endoprothèse en silicône temporaire ayant pour objectif d'assurer une cicatrisation dirigée de l'épithélium et de

protéger le greffon d'éventuels phénomènes infectieux qui pourraient l'affecter. Cependant la maintenance de ce type d'endoprothèse chez le lapin est particulièrement ardue (8).

Limites de l'étude

Comme démontré par les autres séries de remplacement et de transplantation trachéales de la littérature (8,13,14,22-25), le lapin est un modèle animal fragile, ce qui a constitué une première limite à notre étude (Tableau III). Le décès survient sans prodrome, ce qui a été le cas d'un animal décédé de manière fortuite dans les 24h, et des animaux décédés de sténose sévère. Cette complication ayant été électivement observée après TT de greffons longs et moyens, nous a conduit, selon les règles de bon usage des animaux à usage expérimental, à réduire le nombre d'animaux opérés, avec comme conséquence certains groupes numériquement faibles (Tableau II).

Une autre limite de notre étude est le fait que deux modes différents de revascularisation des greffons ont été mis en œuvre lors de la phase de TT orthotopique : soit par enveloppement fascial, ou par les muscles sous hyoïdiens. En fait, cette différence n'est qu'apparente, car le fascia superficialis latéro-thoracique du lapin est une structure essentiellement musculaire.

Finalement, l'apport de la bronchoscopie a été déterminant dans la longue survie des animaux ayant fait l'objet d'une transplantation de segments courts, grâce aux aspirations de sécrétions et aux manœuvres de dilatation.

Conclusion

Nous avons démontré la faisabilité de la transplantation de segments courts d'ATDC, sans problème de rejet ou de malacé du greffon chez le lapin. Cependant, avant application clinique, des investigations dans une autre espèce de plus grande taille, comme le miniporc, sont indispensables et sont en cours dans notre laboratoire. Nous envisageons de tester notamment la faisabilité de la transplantation de greffons longs. En effet, ce sont les seuls utiles en pratique, pour le traitement de certaines tumeurs, sténoses ou malacés trachéales étendues, non opérables par résection - anastomose trachéale conventionnelle.

Discussion en séance

Commentaires de D Grunenwald

Je souhaiterais resituer ton travail dans le cadre des avancées en reconstruction trachéale. Celle-ci est en effet nécessaire lorsque la destruction par tumeur, inflammation, sténose ou autre exige un remplacement long supérieur à 6/7 cm. En effet, en deçà, une résection-anastomose est faisable au prix de certains artifices techniques. Le problème est de trouver le bon substitut trachéal, lequel doit être rigide latéralement, flexible longitudinalement, étanche, non toxique, non immunogène, solide et résistant dans le temps et enfin capable de s'épithélialiser, comme tu l'as précisé. Évaluant dans un environnement septique et immunologiquement très actif, il devrait pouvoir résister à l'infection et devrait exiger un traitement immunosuppresseur puissant. Face à ces contraintes, différentes innovations ont été proposées, comme la transplantation hétérotopique revascularisée à partir de l'épiploon ou le muscle ; les allogreffes aortiques présentées antérieurement à l'Académie par Azorin, puis Martinod pour le remplacement des bronches ; les néo trachées composites fabriquées à partir de tissus autologues (cartilages costaux intégrés dans un greffon cutané), développées à Marie Lannelongue ; enfin, la bio ingénierie tissulaire, un domaine absolument passion-

nant. Elle consiste à prélever un organe chez un donneur, comme la trachée. Celle-ci, éventuellement bifurquée, sera décellularisée pour en faire une matrice acellulaire. Puis on va la recellulariser à partir des cellules souches de l'hôte et, grâce à des facteurs de croissance, on va pouvoir la réimplanter. À titre d'exemple, Birchall *et al.* (*Lancet* 2012;380:994-1000) ont rapporté l'observation d'un enfant qui a bénéficié de cette technique avec beaucoup de succès puisque, à ma connaissance, il est encore en vie à 5 ans. Un autre exemple est celui d'un homme âgé de 36 ans, qui a fait l'objet d'un remplacement de la bifurcation carénaire avec une matrice synthétique en matériau nano composite, construite sur mesure, puis ensemencée de cellules souches dans un bioréacteur avant implantation (Jungebluth *et al.* *Lancet* 2011;378:1997-2004). Ce patient a eu également une très longue survie et ceci est absolument fascinant. Je voulais présenter ces données en complément de ton exposé car je trouvais que des gens comme toi pourraient être considérés comme des « conquérants de l'inutile », comme Lionel Terray, car la transplantation trachéale ne concerne que quelques patients, mais qui en ont tellement besoin qu'il faut continuer à progresser.

Réponse

Merci Dominique pour tes commentaires, auxquels je vais répondre point par point.

L'épithélialisation n'est pas le problème des substituts trachéaux car pratiquement tous se réépithélialisent, du moins expérimentalement. Par contre, le cartilage et sa rigidité, et la conservation des propriétés biomécaniques du substitut, constituent le problème crucial.

L'environnement septique condamne l'utilisation de matériaux synthétiques et la deuxième observation que tu as présentée s'est, en fait, fort mal terminée avec le décès du patient de complication septique et de déhiscence.

La transplantation hétérotopique reste anecdotique puisqu'il n'y a qu'une seule observation de transplantation de trachée enveloppée d'épiploon, qui s'est soldée par une sténose du greffon au bout de quatre mois. Par contre la revascularisation de l'allogreffe trachéale par l'intermédiaire du bloc thyro trachéal (artère thyroïdienne inférieure) constitue une solution intéressante, comme démontré par l'observation de Strome *et al.* de transplantation laryngo trachéale publiée dans le *New England Journal of Medicine*. (2001;344:1676-9). C'est le résultat clinique à long terme des patients opérés de remplacement trachéal par allogreffe aortique qui m'a conduit à changer de modèle expérimental. Parmi les six patients opérés à Lille, trois sont encore en vie sans récurrence avec un recul de huit à neuf ans, mais malheureusement aucun anneau trachéal n'a été observé au sein des greffons, contrairement à ce qui avait été vu chez l'animal. Je ne suis pas le seul à avoir fait cette constatation : Gisèle Cuestas de Buenos Ayres a récemment publié un cas de remplacement trachéal de sauvetage par allogreffe aortique pour déhiscence anastomotique chez une enfant de quatre ans (*Acta Otorrinolaringol Esp* 2014;65(3):191-3), et n'a pas observé de régénération d'anneau trachéal avec cinq ans de recul. Un constat identique a été fait par Jean François Velly, dans les mêmes circonstances et après sept ans de recul (donnée non publiée).

Je vais être sévère avec la bio ingénierie trachéale. Macchiarini, le promoteur de la méthode, dit avoir opéré 11 patients, mais seules deux observations sont documentées. La première, publiée dans *The Lancet* en 2008 (vol 372, p. 2023-30), était un cas de remplacement de tronc souche gauche pour malacie. Après de multiples *stenting*, elle s'est soldée par une pneumonectomie de nécessité quelques années plus tard. La deuxième était le remplacement de la bifurcation trachéale par prothèse nano composite, un échec déjà évoqué. Quant à l'observation de Birchall, c'est également un échec à quatre ans, le greffon s'étant sévèrement sténosé. Il serait important que ces échecs ou difficultés soient publiés, comme je n'hésite pas à le faire moi-même.

Commentaires de Bernard Kron

Cette présentation passionnante me permet d'évoquer l'intérêt de la prothèse en silicone dans la reconstruction de la voie biliaire principale étudiée naguère expérimentalement chez 21 chiens : régénération d'un cholédoque complet avec une muqueuse continue. Et votre problème, c'est l'absence d'épithélium à la partie moyenne quand le greffon est très long ; et c'est cela qui m'a permis de rappeler cette expérience, ainsi qu'un cas clinique de restauration de la voie biliaire principale après un traumatisme opératoire.

Réponse

L'endoprothèse en silicone envisagée lors de la réalisation de transplantations orthotopiques sera provisoire et sa paroi transparente permettra de suivre l'évolution de la régénération épithéliale : lorsque l'on aura un aspect uniformément rosé, on pourra procéder à l'ablation de cette endoprothèse.

Question d'Arlette Colchen-Personne

Mais vous n'aurez toujours pas de cartilage ?

Réponse

Chez le lapin, même si le cartilage des greffons trachéaux perd de sa vitalité à moyen terme, l'évolution vers la calcification assure la rigidité. Sans anticiper sur les résultats des études en cours chez le porc, de la transplantation hétérotopique de greffons trachéaux dans l'épiploon, on a d'ores et déjà observé une persistance de la vitalité des chondrocytes jusqu'à 90 jours après la greffe, chez cet animal.

Références

- Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet* 1979;1:433.
- Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, Weiss M, Dartevielle P. Tracheal allograft replacement. An unsuccessful method. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1993;7:648-52.
- Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D, Leuven Tracheal Transplant Group. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med* 2010;362:138-45.
- Delaere PR, Vranckx JJ, Meulemans J, Vander Poorten V, Segers K, Van Raemdonck D et al. Learning curve in tracheal allotransplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:2538-45.
- Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;111:1930-4.
- Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, Murakami A, Takamoto S. Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123:153-60.
- Wurtz A, Hysi I, Zawadzki C, Soenen V, Hubert T, Banfi C, Jashari R et al. Construction of a tube-shaped tracheal substitute using fascial flap-wrapped revascularized allogenic aorta. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:663-8.
- Wurtz A, Hysi I, Kipnis E, Zawadzki C, Hubert T, Jashari R, Copin MC, Jude B. Tracheal reconstruction with a composite graft: fascial flap-wrapped allogenic aorta with external cartilage-ring support. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;16:37-43.
- Hysi I, Wurtz A, Zawadzki C, Kipnis E, Jashari R, Hubert T, Alexandre Ung, Copin M-C, Jude B. Immune tolerance of epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45:e180-6.
- Hysi I, Kipnis E, Fayoux P, Copin MC, Zawadzki C, Jashari R, Hubert T, Alexandre Ung, Jude B, Ramon P, Wurtz A. Successful orthotopic transplantation of short tracheal segments without immunosuppressive therapy. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;47:e54-e61.
- Balderman SC, Weinblatt G. Tracheal autograft revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:434-41.
- Nakanishi R, Shirakusa T, Mitsudomi T. Maximum length of tracheal autografts in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:1081-7.
- Delaere PR, Liu ZY, Hermans R, Sciort R, Feenstra L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac*

- Cardiovasc Surg 1995;110:728-37.
14. Tanaka H, Maeda K, Okita Y. Transplantation of the cryopreserved tracheal allograft in growing rabbits. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1707-11.
 15. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998;65:869-75.
 16. Wurtz A, Porte H, Conti M, Desbordes J, Azorin JF, Martinod E et al. Tracheal replacement with aortic allografts. *N Eng J Med*. 2006;355:1938-40.
 17. Wurtz A, Porte H, Conti M, Desbordes J, Dusson C, Copin M-C et al. Surgical technique and results of tracheal and carinal replacement with aortic allografts for salivary gland-type carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:387-93.
 18. Wurtz A. Circumferential tracheal replacement: Do the benefits warrant the risks? *Ann Thorac Surg*. 2014;97:1480.
 19. Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient-derived epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:118-23.
 20. Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE. Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation* 2000;70:857-63.
 21. Ito Y, Suzuki H, Hattori Y, Muhammad BAH, Takahashi T, Suzuki K, et al. Complete replacement of tracheal epithelia by the host promotes spontaneous acceptance of orthotopic tracheal allografts in rats. *Transplant Proc* 2004;36:2406-12.
 22. Shi H, Xu H, Lu D, Wu J. Animal models of tracheal allotransplantation using vitrified cryopreservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:1222-6.
 23. Weidenbecher M, Tucker HM, Gilpin DA, Dennis JE. Tissue-engineered trachea for airway reconstruction. *The Laryngoscope* 2009;119:2118-23.
 24. Dodge-Khatami A, Niessen HWM, Koole LH, Klein MG, van Gulik TM, de Mol BAJM. Tracheal replacement in rabbits with a new composite silicone-metallic prosthesis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003;11:245-9.
 25. Seguin A, Baccari S, Holder-Espinasse M, Bruneval P, Carpentier A, Taylor DA, et al. Tracheal regeneration: evidence of bone marrow mesenchymal stem cell involvement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;145:1297-304.