



Thèse

2007

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

---

Efficacité de l'application de sangsues sur un modèle de lambeau cutané  
de type "random" chez le rat

---

Bezzola, Thierry

**How to cite**

BEZZOLA, Thierry. Efficacité de l'application de sangsues sur un modèle de lambeau cutané de type 'random' chez le rat. Doctoral Thesis, 2007. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:445

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:445>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:445](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:445)

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE

Section de médecine clinique

Département de Chirurgie

Service de Chirurgie plastique et reconstructive

Thèse préparée sous la direction du Professeur Brigitte Pittet-Cuénod

---

**EFFICACITE DE L'APPLICATION DE SANGSUES  
SUR UN MODELE DE LAMBEAU CUTANE  
DE TYPE « RANDOM » CHEZ LE RAT**

Thèse

Présentée à la Faculté de Médecine  
de l'Université de Genève  
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Thierry Bezzola

de

Genève et Comologno (TI)

Thèse n° 10495

Genève  
2007

## Résumé :

Les lambeaux sont couramment utilisés en chirurgie réparatrice pour combler une perte de substance suite à un traumatisme ou à une chirurgie carcinologique. L'apparition d'une nécrose partielle est la complication la plus fréquente des lambeaux, due le plus souvent au développement d'une congestion veineuse. Afin de soulager celle-ci, les chirurgiens plasticiens ont redécouvert l'un des plus anciens traitements – la saignée – à travers l'utilisation de sangsues. Le bénéfice de l'application clinique de sangsues est maintenant bien établi lors d'insuffisance veineuse pure. Toutefois, nous ne disposons d'aucune connaissance quant à leur usage lors d'insuffisance mixte artério-veineuse, présente parfois à l'extrémité distale de lambeaux cutanés de type «random». Ce travail a pour but d'étudier les effets de l'application de sangsues sur un modèle de lambeau cutané dorsal chez le rat, présentant une insuffisance vasculaire artérielle et veineuse, avec pourcentage de nécrose stable.

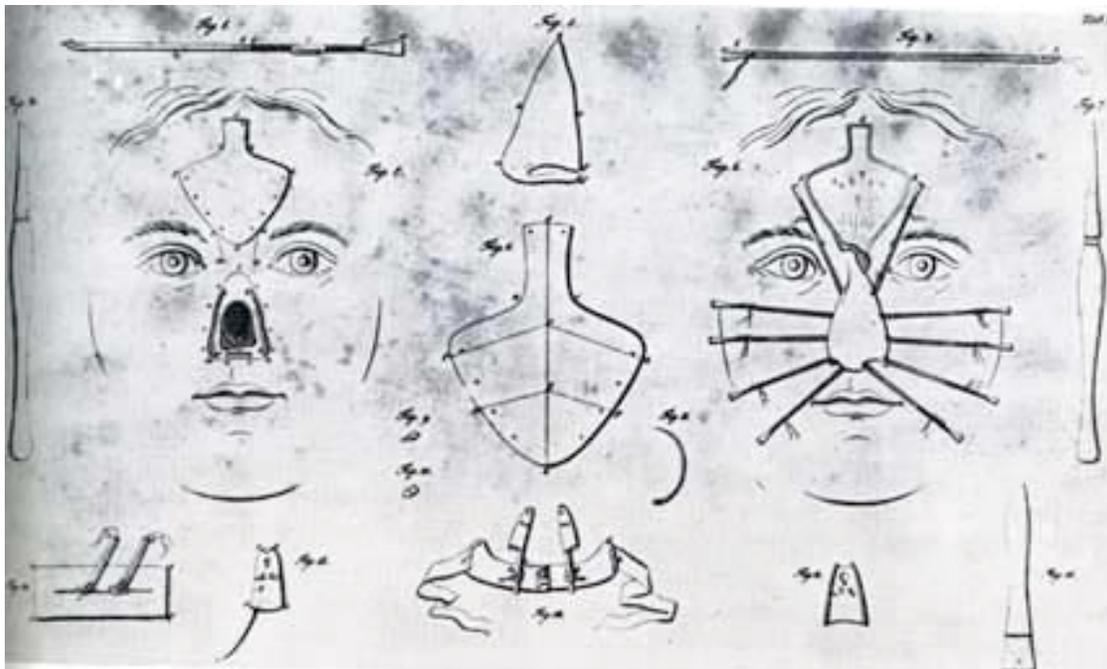
# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b>II. LES LAMBEAUX .....</b>	<b>5</b>
1. DEFINITION .....	5
a) Les lambeaux cutanés «random» .....	5
b) Les lambeaux axiaux .....	5
2. MECANISMES DE SURVIE DES LAMBEAUX .....	6
3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA NECROSE DES LAMBEAUX .....	7
4. APPROCHES THERAPEUTIQUES POUR AMELIORER LA SURVIE DES LAMBEAUX .....	9
a) La procédure du délai chirurgical .....	9
b) Stimulation de l'angiogénèse .....	9
c) Inhibition de la thrombose .....	10
d) Pré-conditionnement à l'ischémie ou à l'hypoxie .....	11
e) Applications topiques .....	11
5. UTILISATION DE SANGSUES .....	12
a) Rappel historique : de la saignée et l'utilisation de sangsues .....	12
b) Utilisation récente des sangsues .....	15
c) Utilisation en chirurgie réparatrice .....	15
6. OBJECTIF DE L'ETUDE .....	16
<b>III. EXPERIENCE .....</b>	<b>17</b>
1. PREPARATION A L'EXPERIENCE .....	17
2. MODELE DE LAMBEAU .....	17
3. ATTRIBUTION DES GROUPES D'ETUDES .....	18
4. APPLICATION DES SANGSUES .....	19
5. ÉVALUATION DE LA VIABILITE DES LAMBEAUX .....	20
6. ÉVALUATION DE LA PERFUSION DES LAMBEAUX .....	20
7. ANALYSE STATISTIQUE .....	22
8. RESULTATS .....	23
a) Analyse macroscopique des lambeaux .....	23
b) Survie des lambeaux .....	24
c) Perfusion cutanée mesurée par laser doppler .....	25
d) Application des sangsues .....	25

<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>27</b>
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>32</b>
<b>VI. ANNEXE : LA SANGSUE .....</b>	<b>33</b>
1. ANATOMIE .....	33
2. REPRODUCTION .....	34
3. PHYSIOLOGIE .....	34
4. MECANISMES D'ACTION DES SANGSUES .....	36
a) L'hirudine.....	36
b) Autres facteurs agissant sur l'agrégation plaquettaire ou sur la coagulation.....	37
c) Facteurs vasodilatateurs ou facilitant la dissémination tissulaire des substances actives.....	37
d) Effet mécanique.....	37
5. COMPLICATIONS DE L'UTILISATION CLINIQUE DE SANGSUES.....	37
a) L'infection.....	37
b) Autres complications.....	38
6. MAINTENANCE ET MODE D'APPLICATION .....	38
<b>VII. GLOSSAIRE .....</b>	<b>41</b>
<b>VIII. REFERENCES .....</b>	<b>44</b>
<b>IX. REMERCIEMENTS .....</b>	<b>50</b>

## I. INTRODUCTION

Depuis plus de 20 siècles, les lambeaux sont utilisées pour reconstruire une perte de substance ou pour couvrir une plaie profonde consécutive à un traumatisme ou à l'excision d'une tumeur par exemple. Les écrits de Sushruta, vers 600 avant Jésus-Christ, relatent déjà l'usage de lambeaux, notamment au niveau du front. En Inde, l'amputation du nez était pratiquée pour punir les voleurs et les mécréants, et des reconstructions nasales à l'aide de ces lambeaux frontaux étaient alors pratiquées. Cette «méthode indienne» reste aujourd'hui encore une procédure de choix pour reconstruire un nez [1] (cf. figure 1). En 1597, Tagliacozzi, chirurgien de Bologne, publie une technique de reconstruction du nez à l'aide d'un lambeau migrateur provenant du bras, connue sous le nom de «méthode italienne» (cf. figure 3). Peu de progrès sont accomplis dans le domaine des lambeaux jusqu'au 20ème siècle et le début de la première guerre mondiale, où se développent alors les bases des techniques de reconstruction modernes. Malgré l'avancée des connaissances, notamment dans le domaine de l'anatomie vasculaire, la nécrose partielle des lambeaux demeure un problème significatif pour le chirurgien plasticien. Des modèles de lambeaux ischémiques chez l'animal ont alors été développés afin d'étudier et mieux comprendre les phénomènes physiopathologiques menant à leur nécrose. L'insuffisance veineuse est depuis lors reconnue comme le facteur le plus préjudiciable à la survie d'un tissu transféré. Parmi les nombreuses thérapies étudiées afin de pallier l'insuffisance veineuse des lambeaux figure l'application de sangsues.



**Figure 1 :** La méthode indienne pour reconstruire le nez à l'aide d'un lambeau frontal, il y a 2500 ans.

## **II. LES LAMBEAUX**

### **1. Définition**

Les lambeaux consistent en un transfert de tissu vascularisé. Le site de prélèvement d'un lambeau est défini comme la zone donneuse alors que le site à reconstruire, où sera placé le lambeau, est défini comme la zone receveuse. Lors du prélèvement d'un lambeau, tous les vaisseaux sanguins au pourtour sont coupés chirurgicalement, hormis au niveau du pédicule, c'est-à-dire une base d'implantation non sectionnée qui assure seule la vascularisation des tissus transférés. Il en résulte pour le lambeau une diminution de la circulation sanguine pouvant entraîner une ischémie puis des troubles métaboliques et de la coagulation, menaçant sa survie.

Le pédicule est gardé soit définitivement soit temporairement en continuité avec la zone donneuse (lambeau pédiculé). Si la zone receveuse se trouve à distance de la zone donneuse, les vaisseaux contenus dans le pédicule seront sectionnés et immédiatement anastomosés sur des vaisseaux proches de la zone receveuse (lambeau libre).

Les lambeaux peuvent être classés en fonction de leur proximité par rapport à la zone receveuse (local ou distant), de leur type de vascularisation, du type de mouvement qu'ils réaliseront durant le transfert pour couvrir une perte de substance (avancement, rotation ou translation) ou de la composition des tissus transposés. Ils peuvent en effet contenir de la peau, de la graisse, du fascia, du muscle, des tendons ou même de l'os. Les lambeaux sont dit combinés lorsque plusieurs de ces éléments tissulaires sont prélevés, en fonction des besoins de la zone receveuse.

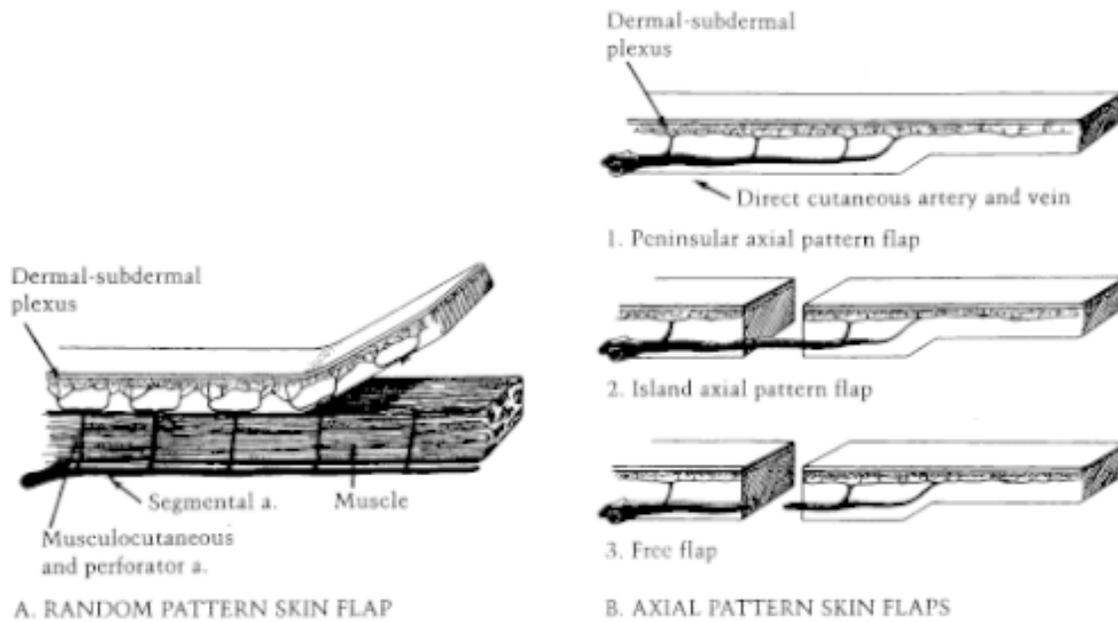
Concernant la classification en fonction de la vascularisation, nous pouvons définir 2 grands types de lambeaux (cf. figure 2) :

#### a) Les lambeaux cutanés «random»

Ces lambeaux ne comprennent pas d'artère cutanée définie anatomiquement. La peau est vascularisée de façon aléatoire par un fin plexus vasculaire contenu dans le derme et le tissu sous-cutané. Ils survivent à condition que le rapport de leur longueur par rapport à leur largeur ne dépasse pas 1,5 (hormis au niveau du visage, où ce rapport peut atteindre 3 en raison de l'exceptionnelle richesse du plexus vasculaire dermique). Lors du prélèvement d'un grand lambeau «random», c'est sa taille (surface) qui devient alors le facteur déterminant de sa survie.

#### b) Les lambeaux axiaux

Ceux-ci peuvent être cutanés, musculo-cutanés ou fascio-cutanés. Les plus couramment utilisés sont les lambeaux cutanés axiaux. Ils contiennent par définition un axe artério-veineux anatomique qui les perfuse de façon fiable malgré un rapport longueur/largeur supérieur à 1,5. Lorsque l'artère et la veine sont de calibre suffisant, le pédicule peut être sectionné pour être anastomosé à distance sur des vaisseaux receveurs, ce qui définit le «lambeau libre».



**Figure 2 :** Les différents types de lambeaux en fonction de leur vascularisation. Tiré de Sabiston Textbook of Surgery, Townsend, 16th edition.

## 2. Mécanismes de survie des lambeaux

Le devenir d'un lambeau est initialement déterminé par la capacité de la circulation sanguine à travers le pédicule de subvenir aux besoins métaboliques des tissus transférés. En condition normale, l'apport sanguin nutritif de la peau dépasse largement les besoins nécessaires à sa survie. Toutefois, la diminution de la perfusion sanguine suite à la levée d'un lambeau entraîne une ischémie tissulaire, puis des modifications du métabolisme cutané, concernant notamment l'utilisation du glucose et les enzymes du métabolisme intermédiaire [2-3]. Trois jours après la levée d'un lambeau, une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate ont été mesurées, avec diminution des réserves tissulaires de glucose et de glycogène par rapport à de la peau saine [4]. Ces modifications sont proportionnelles au degré d'ischémie présenté par les tissus du lambeau. Dans la majorité des cas, la consommation de glucose et la production de lactates redeviennent normales après la fin de la première semaine suivant la levée du lambeau.

Si initialement la vascularisation des lambeaux n'est assurée que par leur pédicule, il se développe rapidement des connexions entre les vaisseaux du lambeau et ceux du site receveur, permettant de réguler le flux sanguin au sein des tissus transférés. Ainsi sont créées de nouvelles connexions vasculaires (artérielles, veineuses et lymphatiques) avec la zone receveuse sur toute la périphérie du lambeau. Ce phénomène, appelé néovascularisation, peut invoquer un ou plusieurs des processus suivants [5] : rétablissement d'un flux sanguin antérograde par l'union des capillaires du lit receveur avec ceux du lambeau ; bourgeonnement de nouveaux capillaires à

partir des vaisseaux préexistants du lambeau (augmentant ainsi le nombre absolu de vaisseaux pour une aire donnée) ; bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins nutritifs à partir du lit receveur, qui pénètrent le lambeau. Le délai d'apparition de ces néovaisseaux est variable, leur présence ayant parfois été démontrée après 2 jours seulement. Suite à une réimplantation digitale, il convient habituellement d'attendre 4 à 5 jours avant d'obtenir un drainage veineux adéquat par néovascularisation, alors que cette même attente est en général de 7 à 10 jours pour un lambeau musculo-cutané [6].

Un second phénomène, différent de la néovascularisation, contribue à assurer la survie d'un lambeau. Il s'agit de la vasculogénèse, qui consiste en une dilatation des vaisseaux sanguins préexistants, favorisant ainsi la vascularisation de toute la surface du lambeau à travers le pédicule. Ce phénomène concerne principalement des vaisseaux anastomotiques (choke vessels) de calibre réduit, qui relie les territoires vasculaires définis (angiosomes), et qui vont présenter une dilatation temporaire [7-8]. Les mécanismes physiologiques expliquant ce phénomène restent toutefois peu clairs. Il existerait une hyperplasie (augmentation) et une hypertrophie (élargissement) des cellules dans toutes les couches de la paroi de ces vaisseaux. La séquence temporelle des modifications induites par l'ischémie semble être la même dans différentes espèces (homme et animal) et dans différents tissus, suggérant l'existence d'un processus universel [9].

### **3. Physiopathologie de la nécrose des lambeaux**

La diminution de la perfusion tissulaire consécutive au transfert des lambeaux peut entraîner une nécrose, qui peut être partielle ou totale. Les mécanismes physiopathologiques impliqués présentent des caractéristiques propres à chaque type de lambeau employé :

- Une fois prélevé, chaque lambeau pédiculé, de type «random» ou axial, possède une physiologie unique et une séquence différente des mécanismes pouvant mener à sa nécrose. La taille revêt une importance primordiale. En effet, si le lambeau est trop grand pour la capacité de vascularisation du pédicule, l'extrémité distale du lambeau va présenter une insuffisance vasculaire mixte, artérielle et veineuse, menant à une nécrose partielle distale. Cette insuffisance vasculaire est variable selon l'arbre vasculaire contenu dans le lambeau. L'observation clinique de ces lambeaux en souffrance semble toutefois indiquer une prépondérance de l'insuffisance veineuse (turgescence, cyanose, chaleur à la palpation).
- Dans le cas du lambeau libre, l'on assiste parfois à une thrombose secondaire du pédicule, concernant l'artère ou la veine, menant à la nécrose totale du lambeau. La thrombose veineuse est la plus fréquente pour 2 raisons : d'une part, les anastomoses veineuses sont souvent plus difficiles à réaliser (différence de calibre entre la veine du pédicule et la veine choisie au site receveur) et, d'autre part, les veines sont plus facilement compressibles (par un hématome par exemple) et sujettes à des torsions ou coudures.

- La réimplantation représente un cas particulier : l'anastomose veineuse n'est pas toujours réalisable (lors de réimplantation digitale distale par exemple, où les veines sont de trop petit calibre), entraînant une insuffisance veineuse pure puis une nécrose de l'implant en l'absence de mesures thérapeutiques.

Les causes primaires de la nécrose sont donc une insuffisance du flux artériel, du retour veineux ou une combinaison des deux. La pathogenèse des lésions tissulaires consécutives à une ischémie demeure insuffisamment comprise. Différents mécanismes ont été suggérés, dont des altérations de la perméabilité capillaire résultant en un œdème tissulaire, une modification du tonus des vaisseaux avec vasoconstriction diffuse, et la génération de radicaux libres toxiques durant l'ischémie. Le phénomène majeur semble cependant être la formation de microthromboses vasculaires, induites soit par des lésions endothéliales, soit par stimulation des mécanismes de coagulation par l'ischémie tissulaire. Habituellement, les plaquettes n'adhèrent pas à un endothélium intact, sain. Ce dernier est en effet capable d'inhiber cette adhésion par la production locale de prostacycline (puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire), ainsi que par l'inactivation de la thrombine produite localement au moyen de la protéine C et de l'antithrombine III. Lorsque les cellules endothéliales sont lésées par une ischémie prolongée ou par une atteinte physique, les plaquettes adhèrent au collagène sous-endothélial exposé. L'agrégat de plaquettes ainsi formé dans la lumière du vaisseau crée un obstacle physique à la circulation du sang. Les plaquettes relâchent par ailleurs des substances vasoconstrictrices comme la sérotonine et la thromboxane A<sub>2</sub>, augmentant encore la résistance au flux sanguin, ainsi que des facteurs thrombogéniques qui activent la cascade de la coagulation, menant à la formation du fibrinogène puis l'apparition de microthromboses.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, une insuffisance veineuse entraîne d'avantage d'effets délétères qu'une insuffisance artérielle. Si dans le cas de lambeaux souffrant d'insuffisance artérielle pure, les lésions endothéliales sont difficilement mises en évidence, celles-ci sont en revanche clairement démontrées dans les lambeaux souffrant d'insuffisance veineuse [10]. Elles résultent de la forte augmentation de la pression intra-vasculaire, entraînant les phénomènes suivants :

- I. Formation d'œdème interstitiel par fuite du sérum sanguin dans les espaces extracellulaires. Il en résulte une augmentation de la barrière de diffusion de l'oxygène. Par comparaison, il n'y a pas de formation d'œdème en cas d'insuffisance artérielle isolée.
- II. L'hémoconcentration consécutive à la diffusion extracellulaire de plasma augmente la viscosité sanguine, diminuant la vitesse du flux sanguin dans le réseau capillaire. La viscosité sanguine est en effet principalement déterminée par l'hématocrite, et dans une moindre mesure par les protéines plasmatiques comme le fibrinogène.
- III. Diminution du flux tissulaire artériel par compression extrinsèque et fermeture des capillaires nutritifs, avec maintien de la perméabilité des shunts artério-veineux. Ces shunts, qui constituent une part substantielle du flux sanguin dans un lambeau cutané [11], ont en effet des parois plus épaisses que celles des capillaires. Lorsqu'un lambeau est soumis en revanche à insuffisance artérielle, le flux sanguin capillaire est préservé grâce à une réduction de ces mêmes shunts artério-veineux [10,12].

#### **4. Approches thérapeutiques pour améliorer la survie des lambeaux**

La nécrose partielle ou totale des lambeaux, pourtant utilisés depuis plus de 2000 ans, survient encore de façon régulière. De nombreuses approches thérapeutiques ont donc été élaborées afin d'améliorer le flux sanguin à l'intérieur des lambeaux, donc leur survie, chez l'homme ou en expérimentation animale.

##### **a) La procédure du délai chirurgical**

Cette approche, décrite en 1597 par Tagliacozzi, anatomiste et chirurgien de Bologne, consiste en un prélèvement partiel du lambeau dans un premier temps, produisant une division des vaisseaux sanguins sur toute la longueur du lambeau. Cette procédure permet d'accroître la dimension viable du lambeau lors de sa transposition 7 à 15 jours plus tard, notamment grâce à la vasculogénèse. Le délai chirurgical entraîne également une tolérance accrue des tissus à l'ischémie, induisant des modifications permettant la survie de ces mêmes tissus à un flux sanguin réduit.

De plus, l'inflammation et l'ischémie produites par le geste chirurgical induisent la libération de facteurs angiogéniques endogènes tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et FGF (fibroblast growth factor). Ces 2 facteurs sont en effet produits naturellement en réponse à l'hypoxie tissulaire [13] et durant la cicatrisation d'une plaie [14] respectivement. Il sont impliqués dans le processus de néovascularisation, même si la présence de cette dernière est souvent difficile à mettre en évidence.

Immédiatement après levée d'un lambeau, il a été également démontré un état hyperadrénergique, sur probable relâchement de noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques sectionnées, induisant une vasoconstriction et contribuant également au développement de la nécrose partielle secondaire. Cette réaction n'est toutefois que transitoire, la noradrénaline étant éliminée spontanément des tissus, expliquant en partie aussi le meilleur flux sanguin dans un lambeau après délai chirurgical [15].

La procédure du délai reste aujourd'hui encore l'une des plus fiables pour améliorer la vascularisation d'un lambeau. Malheureusement, elle implique une intervention supplémentaire, ce qui explique son utilisation limitée en pratique clinique.

##### **b) Stimulation de l'angiogénèse**

Cette approche a évolué suite aux publications récentes démontrant l'effet bénéfique de différents facteurs de croissance sur la cicatrisation des plaies [16-17]. Les plus étudiés sont le VEGF et le bFGF (basic fibroblast growth factor). Si ces 2 facteurs ont montré un effet bénéfique sur la vascularisation des lambeaux en application locale, seul le bFGF améliorerait leur survie sur modèle animal [18]. Nous savons en revanche qu'une injection seule de facteurs angiogéniques, administrée localement avant la levée d'un lambeau, n'est pas capable d'induire d'angiogénèse, et ne stimule ainsi pas le phénomène de délai [19]. Une étude plus récente a démontré le bénéfice

du PDGF (platelet-derived growth factor) [20]. Son utilisation entraîne une néovascularisation tissulaire prouvée, ainsi qu'une amélioration de la survie sur un modèle de lambeau ischémique chez l'animal. Ces facteurs angiogéniques ayant une durée de vie limitée à quelques minutes, leur application thérapeutique doit faire appel au génie génétique, limitant leur emploi en clinique.



**Figure 3 :** Reconstruction nasale à l'aide d'un lambeau migrateur du bras. Le pédicule nourricier gardé au bras n'est qu'un vecteur temporaire appelé à être sectionné lorsque le lambeau transporté bénéficiera de connexions suffisantes avec la zone receveuse, lui permettant une existence autonome. De Tagliacozzi, G. «De Curtorum Chirurgia per Insitionem». Venise, 1597.

c) Inhibition de la thrombose

Si l'hypoperfusion capillaire joue un rôle capital dans la survenue de la nécrose distale, d'autres phénomènes associés aggravent les dommages tissulaires. La présence de microthromboses a pu être démontrée dans les tissus ischémiques. Elles peuvent être secondaires à des lésions endothéliales, comme vu précédemment, par hyperpression mécanique dans le cadre d'une insuffisance veineuse. Elles se développent également dans le cadre d'ischémie tissulaire, par stimulation de la coagulation. Durant l'ischémie tissulaire en effet, l'expression du facteur tissulaire (TF) est augmentée [21]. Cette protéine, suite à sa liaison au facteur VII (FVII), devient l'activateur principal de la coagulation in vivo. L'emploi de facteur VII inactivé (FVIIai) permet, par compétition, d'inhiber la liaison FVII/TF et donc d'empêcher la cascade de coagulation de débiter. Son application sur modèle animal a montré un potentiel intéressant en améliorant significativement la survie de lambeaux ischémiques [22].

d) Pré-conditionnement à l'ischémie ou à l'hypoxie

Afin d'augmenter la survie totale des lambeaux ischémiques, le pré-conditionnement pharmacologique ou ischémique a été investigué par Hosnuter et ses collaborateurs [23], sur un modèle de lambeau cutané dorsal ischémique chez le rat. Il consistait en l'injection locale de dexaméthasone (un corticostéroïde), d'un clampage du pédicule vasculaire de 20 minutes, ou les deux. L'amélioration de la survie était significative pour les deux méthodes individuellement, et encore plus prononcée pour la combinaison des deux.

Une autre approche vise à habituer progressivement les tissus à une ischémie aiguë sévère. Cette technique, connue sous le terme d'entraînement hypoxique intermittent, consiste en l'alternance de séances brèves d'exposition à une hypoxie normobarique (mélange contenant moins d'oxygène que l'air pur, administré par un masque par exemple) avec des séances de réoxygénation (par inhalation d'air pur), cela de façon répétée. Le but est d'induire une adaptation tissulaire à l'hypoxie. Cette méthode ne présente aucun danger reconnu chez l'homme. Sur un modèle de lambeau cutané dorsal ischémique de type «random» chez le rat, cette approche a permis une amélioration significative de la survie de lambeaux cutanés compromis [Schlaudraff K., article en soumission].

Il existe d'autres méthodes qui se sont révélées efficaces en chirurgie expérimentale pour préparer les tissus aux dommages consécutifs à l'hypoxie tissulaire. Parmi celles-ci nous pouvons relever l'application de chaleur localement (pré-conditionnement thermique) [24] et l'administration d'érythropoïétine [Harder Y., article en soumission].

e) Applications topiques

Sur modèle animal, l'application topique quotidienne, pendant 7 jours, de peroxyde d'oxygène et de diméthyl sulfoxyde en combinaison ( $H_2O_2$  8% et DMSO 50%) permet une amélioration de la survie de lambeaux cutanés [25]. L'application topique d'acide oléique 10% provoque également une amélioration de la survie sur modèle de lambeau ischémique chez le rat [26]. L'application d'un patch d'EMLA, combinant 2 anesthésiques locaux, la xylocaïne et la prilocaïne, a démontré une amélioration significative de la survie d'un modèle de lambeau «random» chez le rat [27]. Les anesthésiques locaux sont en effet connus pour leur effet vasodilatateur, et ont un effet préventif sur le vasospasme. L'usage topique de nitroglycérine, puissant vasodilatateur, a également démontré ses effets bénéfiques sur la survie de lambeaux compromis en expérimentation animale [28-29].

Bien que l'emploi d'anesthésiques locaux apporte des résultats prometteurs en expérimentation animale, leur usage clinique n'amène cependant que des résultats peu satisfaisants, et les chirurgiens plasticiens continuent ainsi de chercher d'autres solutions.

## 5. Utilisation de sangsues

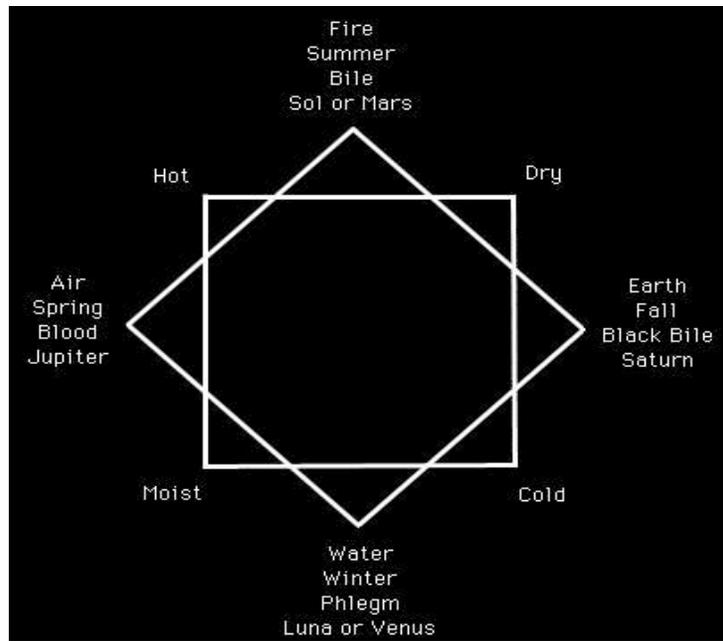
### a) Rappel historique : de la saignée et l'utilisation de sangsues

La saignée est un art ancien remontant à l'époque des premières pratiques médicales découvertes en Mésopotamie et en Egypte dès le 3ème millénaire avant Jésus-Christ. Les fondements de la médecine «moderne» seront apportés bien après par les Grecs, et dès le 6ème siècle avant J.-C., des savants établiront les bases de la médecine des siècles à venir : il s'agit des philosophes naturalistes, qui ont été les premiers à dissocier la médecine de la magie. Parmi eux Pythagore (580-490 av. J.-C.), mieux connu pour ses travaux en mathématique, qui établit le principe de l'universalité des 4 éléments que l'on retrouve dans un corps humain : l'eau, la terre, l'air et le feu. Hippocrate (460-370 av. J.-C.), à qui l'on attribue souvent à tort l'origine de la médecine en Occident, pratiquait lui aussi l'usage de la saignée, des cautères, des purgatifs et des vomitifs. Il basait sa médecine sur les mêmes principes que Pythagore, en ajoutant aux 4 éléments 4 caractères (chaud, froid, sec ou humide) et 4 humeurs (le sang, la lymphe ou phlegme, la bile jaune et la bile noire ou atrabile) (cf. figure 4).

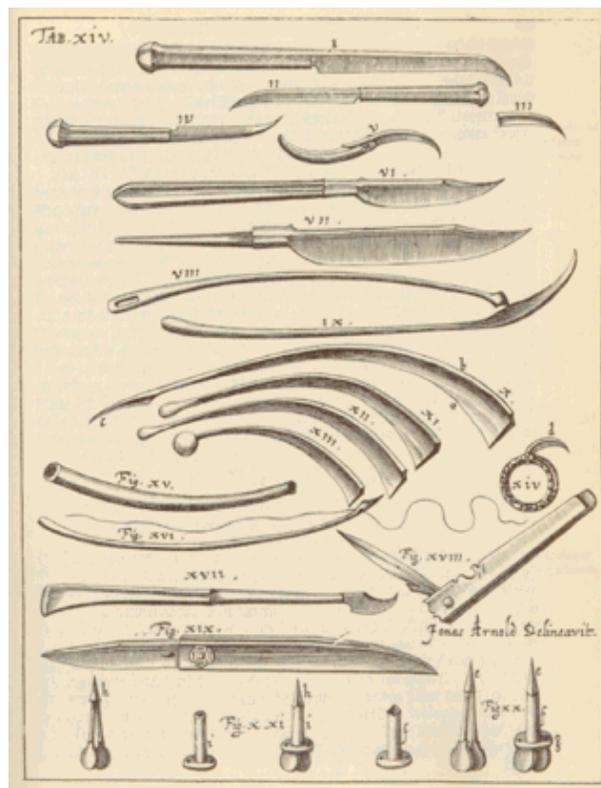
Ce concept des humeurs sera repris par Galien (130-201 après J.-C.) pour expliquer la survenue de maladies, provoquées par une mauvaise balance entre les fluides. Retirer du sang de l'organisme permettait ainsi, selon cette nouvelle théorie, de restaurer l'équilibre et d'apporter la guérison. Ainsi des veinosections et des artériotomies étaient pratiquées avec toutes sortes d'instruments, dont des lancettes et des flammes (cf. figure 5). Les volumes retirés dépendaient du clinicien, et l'usage de la saignée jusqu'à la syncope devint un traitement populaire.

On trouve trace des sangsues initialement sur des peintures murales de sépultures des Pharaons de la 18ème dynastie (1567-1308 av. J.-C.) [30]. Leur première utilisation thérapeutique remonte probablement aux Babyloniens vers 1500 avant J.-C., avant que des manuscrits sanscrits ne révèlent leur utilisation en Inde vers 500 avant J.-C.. Nicander de Colophon (200-130 av. J.-C.) fut le premier à rapporter leur utilisation médicale. Au début de l'Ere Chrétienne, Themison de Laodicée (123-40 av. J.-C.), un élève d'Asclépiades, les utilisait pour réaliser des saignées. Les sangsues étaient alors réputées moins douloureuses et plus fiables pour retirer un volume déterminé de sang que l'utilisation de lancettes par exemple. Leur usage était même considéré comme bénéfique lorsqu'il s'agissait de retirer du sang d'une partie sensible du corps, par exemple pour le traitement des hémorroïdes, du prolapsus rectal ou d'une inflammation vulvaire [31].

L'emploi de sangsues perdurera au Moyen Age, et elles devinrent très populaires en Europe aux 18ème et 19ème siècles, ainsi qu'aux Etats-Unis où la demande était si grande que l'on estime que 30 millions de spécimens étaient envoyés par bateau depuis l'Allemagne chaque année (au milieu du 18ème siècle). *Hirudo Medicinalis* s'imposa au fil des ans comme la meilleure sangsue, sa morsure étant réputée plus profonde et occasionnant un saignement plus long par rapport notamment à son homologue américain, *Hirudo Decora*. (cf. annexe chapitre VI)



**Figure 4 :** Représentation schématique des 4 éléments, caractères et humeurs.



**Figure 5 :** Scultetus, Johannes (1595-1645). «Armamentarium chirurgicum». Illustration de divers instruments utilisés au 17ème siècle pour les saignées.

Vers 1830, l'usage des sangsues se répand rapidement sous l'influence de Broussais (1772-1832), médecin chef de l'hôpital Val de Grâce à Paris et chirurgien dans la Grande Armée de Napoléon, considéré comme le médecin le plus sanguinaire de l'histoire. Broussais pensait en effet que toute maladie pouvait être reliée à l'inflammation, c'est-à-dire une accumulation de sang dans une partie localisée du corps. Ainsi, sa thérapie consistait en une diète et l'application de sangsues, parfois en nombre massif. Les indications étaient aussi variées que laryngite aiguë, néphrite, épидидymite, appendicite, poliomyélite, épistaxis, gastrite, prolapsus rectal, fièvre jaune, tuberculose, rhumatismes, épilepsie ou encore œdème cérébral.

Malheureusement, cette utilisation massive et sans discernement de sangsues (jusqu'à 80 par patient) fit de nombreuses victimes par hémorragie. Vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, cette «sanguinomanie» n'est plus en accord avec les concepts modernes médicaux émergents, et la pénurie concomitante de sangsues provoquée par des mesures sanitaires et l'éradication de mares et marais, sera également à l'origine du déclin de leur emploi thérapeutique.



**Figure 6 :** «Les sangsues» de Louis Boilly, 1827. Lithographie d'un médecin du 19<sup>ème</sup> siècle appliquant une sangsue sur le cou d'un patient, pendant que le jeune garçon tient un bol rempli de sangsues.

## b) Utilisation récente des sangsues

Suite aux travaux de Haycraft en 1884 [32] qui mirent en évidence une substance anticoagulante (nommée hirudine, cf. annexe chapitre VI.4) dans la salive des sangsues, elles regagnèrent peu à peu de l'intérêt. On retrouve ainsi trace de leur utilisation pour la prophylaxie thromboembolique dans les années 1930, et pour la thrombose coronarienne aiguë en 1943 [33-34]. Une grande diversité de pathologies non chirurgicales a bénéficié de l'application de sangsues ces 30 dernières années : Phlegmasia cerulea dolens [35], hématomes sublinguaux [36-38], purpura fulminans [39], otites moyennes et externes [40], œdèmes du scrotum [41-44], hématomes périorbitaires [45-46], hémorroïdes [47], thrombophlébites, abcès «froids», obésité, paronychies, priapisme et céphalées entre autres. Ces utilisations restent toutefois marginales, et le bénéfice souvent incertain.

## c) Utilisation en chirurgie réparatrice

L'insuffisance veineuse (se manifestant cliniquement par une cyanose, une turgescence des veines du lambeau et un temps de recoloration capillaire rapide) est une complication courante des lambeaux et des réimplantations tissulaires. Dans l'attente d'une néovascularisation rétablissant un drainage veineux adéquat, l'application de sangsues les premiers jours permet un certain soulagement de l'engorgement des tissus, avant l'apparition de dommages tissulaires irréversibles.

Les premières références de leur usage en chirurgie plastique et reconstructive datent de 1960, avec les travaux de Derganc [48] et Batchelor [49]. Ce dernier décrit alors 5 cas de lambeaux pédiculés présentant une congestion veineuse rapide post-opératoire, résolue en 2 à 4 jours suite à l'application de sangsues. Derganc quant à lui a rapporté 20 cas ayant bénéficié de l'application de sangsues. Il s'agit cependant de cas sporadiques se référant à plusieurs types différents de lambeaux.

L'utilisation de sangsues en chirurgie réparatrice ne sera toutefois acceptée à large échelle que suite aux publications de Foucher et de ses collaborateurs en 1981 [50]. Ils décrivent leur usage pour suppléer à l'insuffisance veineuse pure dans le cadre de 14 réimplantations digitales où les anastomoses veineuses n'étaient pas possibles ou insuffisantes.

Ces premiers auteurs ont ainsi déterminé l'indication de l'utilisation de sangsues en chirurgie réparatrice et leurs effets sur la survie des tissus compromis par une insuffisance veineuse. Cet effet sera définitivement démontré expérimentalement sur modèle animal (Hayden [51], Lee [52], Lozano [53], Cottler [54] et Smoot [55]). Toutes ces expériences, réalisées sur un modèle de lambeau axial ischémique dans lequel la veine du lambeau a été clampée (insuffisance veineuse pure), démontrent une amélioration significative de la survie des lambeaux traités avec des sangsues. Elles sont depuis lors couramment employées en clinique pour le traitement de l'insuffisance veineuse de lambeaux libres ou axiaux [56-59], lors de réimplantation tissulaire lorsque le drainage veineux ne peut être rétabli (doigts [60-64], oreilles [65-68], scalp [69], lèvres [70-71] et pénis [72]), voire pour l'engorgement veineux des lambeaux porte-PAM (plaque aréolo-mamelonnaire) suite à la chirurgie de réduction mammaire [73].

## **6. Objectif de l'étude**

À notre connaissance, l'utilisation de sangsues sur un lambeau ischémique sans insuffisance veineuse pure, telle la partie distale d'un lambeau pédiculé de type «random» qui mêle insuffisance artérielle et veineuse (insuffisance dite mixte), n'a jamais été investiguée.

Le but de ce travail est donc d'établir les effets de l'application de sangsues sur un modèle de lambeau de type «random» chez le rat, présentant un pourcentage de nécrose spontanée défini.

Nos hypothèses de travail sont les suivantes :

- 1) Le volume de sang retiré par les sangsues et l'écoulement de sang prolongé par la morsure permettent de soulager la composante d'insuffisance veineuse. L'insuffisance vasculaire se développant rapidement - dès les premières heures suivant la levée des lambeaux - l'application précoce de sangsues préviendrait l'installation de l'insuffisance veineuse, et limiterait ainsi les dégâts tissulaires consécutifs.
- 2) L'effet mécanique de succion des sangsues peut créer une augmentation favorable de la perfusion sanguine locale du lambeau. La pression négative, lors de l'ingestion de sang, pourrait favoriser l'apport artériel du lambeau en plus de diminuer la pression dans l'arbre vasculaire distal (cf. annexe chapitre VI.4.d).
- 3) Les substances anticoagulantes et anti-agrégantes plaquettaires contenues dans leur salive peuvent prévenir l'apparition de microthromboses, et donc améliorer la perfusion (cf. annexe chapitre VI.4.a-c).
- 4) L'application répétée de sangsues permettrait également de maintenir un flux sanguin adéquat à travers les lambeaux, jusqu'au développement de la néovascularisation, limitant ou prévenant l'apparition d'une zone de nécrose.

### **III. EXPERIENCE**

La présente étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Genève, ainsi que par les autorités vétérinaires locales. Les rats utilisés sont des mâles de type Wistar, pesant 350 grammes en moyenne, gardés dans des cages individuelles et disposant de nourriture et boisson ad libitum. Ils sont gardés dans une pièce à température contrôlée constante (22°C), avec un cycle jour/nuit de 12 heures. 30 rats ont été utilisés. Ils ont été sacrifiés au 14ème jour.

#### **1. Préparation à l'expérience**

Avant la levée du lambeau, les rats sont anesthésiés en les plaçant dans une boîte en plexiglas dans laquelle est conduit un mélange d'Isoflurane 2% (Abott AG Baar, Suisse) 2L/minute et d'oxygène 2L/minute. L'anesthésie est poursuivie sur la table de travail à l'aide d'un masque, en conservant le même mélange. L'animal est ensuite rasé à l'aide d'une tondeuse électrique sur toute la zone dorsale, puis au rasoir manuel.

#### **2. Modèle de lambeau**

Le lambeau utilisé a été initialement décrit par McFarlane en 1965 [74], puis modifié par Khouri afin d'obtenir un schéma de nécrose mieux prédictible [75]. Il s'agit d'un lambeau cutané dorsal de type «random», avec un plan de dissection entre le panniculum carnosum (emporté avec le lambeau) et l'aponévrose de la musculature profonde. Ce modèle de lambeau présente une insuffisance vasculaire au niveau de sa moitié distale. Il peut être divisé en 3 zones distinctes de taille égale (cf. figure 7). La zone 1 (tiers proximal) reflète l'aspect clinique de survie totale de lambeaux, la zone 2 (tiers moyen) un schéma mixte de survie et de nécrose partielle, alors que la zone 3 (tiers distal) présente une nécrose totale, comprenant toute l'épaisseur du lambeau. Le pourcentage total de nécrose pour ce modèle de lambeau est, de façon relativement stable et prédictible, d'environ 50%.

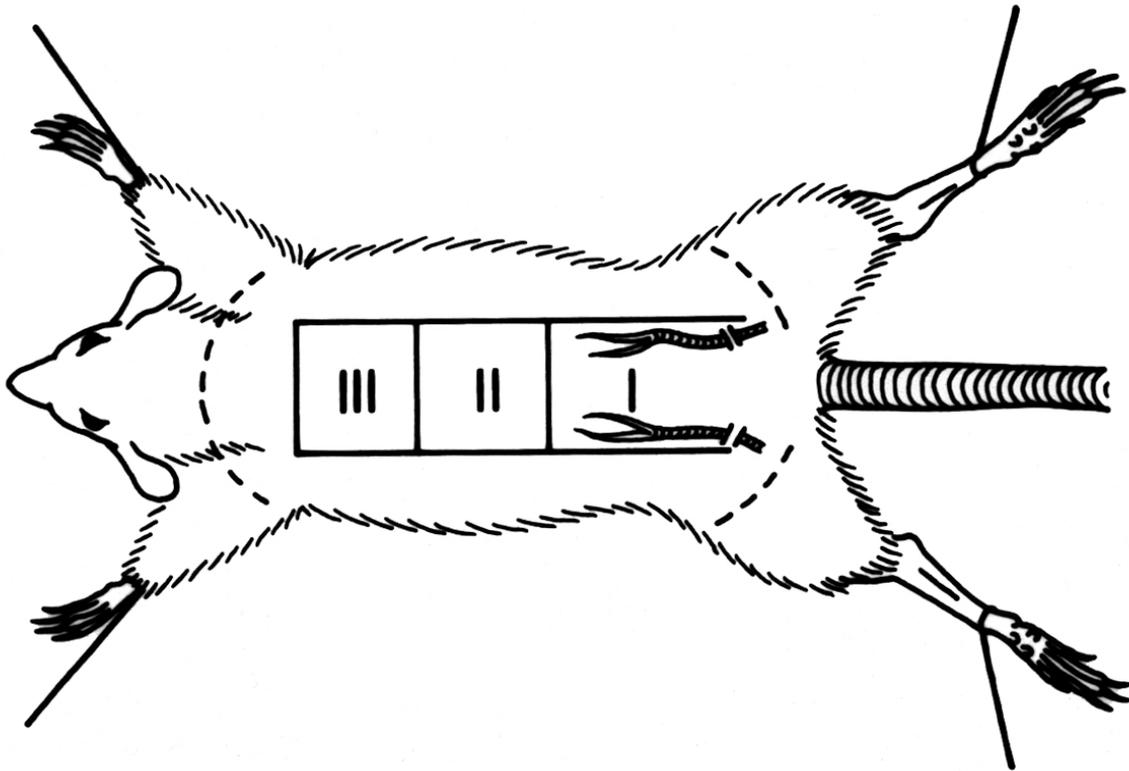
Dans notre expérience, la levée du lambeau s'effectue à l'aide de ciseaux, en commençant distalement et en poursuivant la dissection jusqu'à la partie proximale du lambeau, conservant un pédicule inférieur. Il est pris soin de couper les 2 artères sacrées passant latéralement à la base du lambeau, qui est ensuite repositionné, et suturé par un surjet de Prolène 4.0 (Ethicon inc.). Pour notre étude, nous avons utilisé un chablon du lambeau mesurant 3x9cm, apposé sur le dos de l'animal et centré sur la colonne vertébrale, dont le pourtour est ensuite dessiné avec un feutre.

### 3. Attribution des groupes d'études

Immédiatement après avoir effectué la levée du lambeau, les rats sont distribués au hasard en 3 groupes :

- Groupe 1 (n=10) : contrôle. Le lambeau est resuturé en place. Pas d'application de sangsue.
- Groupe 2 (n=10) : application d'une seule sangsue. Celle-ci est placée immédiatement après suture du lambeau, pour une durée de 30 minutes. Mesure du temps de saignement.
- Groupe 3 (n=10) : application de 3 sangsues. La première est appliquée immédiatement après suture du lambeau, la deuxième 8 heures après levée du lambeau et la troisième 16 heures après levée du lambeau, toujours pour une durée de 30 minutes. Mesure du temps de saignement après chaque application.

Pour les 3 groupes, nous avons effectué une mesure quotidienne du flux cutané à l'aide d'un laser Doppler. La viabilité des lambeaux et la surface de souffrance cutanée étaient contrôlées de façon quotidienne, par observation macroscopique et par planimétrie.



**Figure 7 :** Le lambeau dorsal selon McFarlane, divisé en trois zones distinctes.

#### 4. Application des sangsues

Les sangsues utilisées pour la présente expérience sont de la classe *Hirudo Medicinalis* et fournies par la pharmacie des Hôpitaux Universitaires de Genève, qui les reçoit elle-même de la pharmacie St-Pierre à Zürich. Elles sont conservées à température ambiante dans un grand bocal en verre contenant de l'eau fraîche, changée tous les jours (cf. annexe VI. 6).

Les sangsues choisies étaient celles les plus mobiles et qui se tenaient vers la surface du bocal. C'est en effet ainsi que l'on reconnaît les plus voraces (cf. annexe chapitre VI.6). Avant et après chaque application, les sangsues sont pesées à l'aide d'une balance électronique, et la variation du poids est consignée. Le poids gagné est converti en ml de sang, 1g de poids gagné équivalant à 1ml de sang [76]. La première application débute immédiatement après suture du lambeau, le rat étant toujours anesthésié. Le site d'application correspond au tiers distal du lambeau, sur lequel une feuille plastique dont on a découpé une fenêtre d'1cm<sup>2</sup> est apposée. Une goutte de sang prélevée à l'aide d'une aiguille sur la patte arrière du rat est appliquée sur la peau à l'endroit de l'attachement désiré. La sangsue est prélevée à l'aide de pincettes atraumatiques, et la tête est dirigée sur la goutte de sang, au centre de la fenêtre découpée dans la feuille de plastique.

Dès le début de la succion, l'heure est notée, et la sangsue sera laissée en place pour 30 minutes exactement. Le détachement est obtenu par l'application d'un bâtonnet enduit d'alcool-ether sur le corps de la sangsue ; cela provoque une légère régurgitation et l'arrêt immédiat du repas. Après avoir été pesée, elle est ensuite sacrifiée en la plongeant dans une solution de chlorhexidine 0.1% alcoolique.

Dans le groupe 3, une nouvelle sangsue est appliquée à 8 heures puis à 16 heures de la levée initiale du lambeau. Les rats sont alors réanesthésiés et l'application se fait selon le même procédé qu'initialement.



**Figure 8 :** Sangsue venant de s'attacher au tiers distal du lambeau, peu après sa levée.

## **5. Évaluation de la viabilité des lambeaux**

Dès le premier jour suivant la levée des lambeaux, leur viabilité est contrôlée quotidiennement par observation macroscopique. Les zones de souffrance et de nécrose cutanées sont évaluées.

La souffrance cutanée se traduit cliniquement par un aspect bleuté, luisant et turgescent de la peau, avec parfois l'apparition de petites vésicules ou phlyctènes (épidermolyse superficielle) qui évoluent vers une nécrose superficielle et forment de petites croûtes plutôt brunes. La nécrose est considérée devant un aspect épaissi voire cartonné de la peau, qui devient noire et sèche, formant progressivement une limite assez nette avec la peau avoisinante.

Afin d'évaluer le pourcentage relatif de survie des lambeaux, nous avons utilisé la méthode de planimétrie de façon quotidienne, dès le deuxième jour de l'expérience. Celle-ci consiste à placer une feuille transparente sur le dos de l'animal anesthésié, et à dessiner les contours du lambeau, puis les zones de nécrose (cf. figure 10). Un stylo optique relié à un ordinateur permet ensuite de relever les données et de mesurer la taille en cm<sup>2</sup> du lambeau étudié et de sa surface nécrosée. La proportion de survie du lambeau est alors déterminée par soustraction de la surface de nécrose à la surface totale du lambeau, et les résultats sont exprimés en pourcentage. Toutes les évaluations ont été réalisées par le même examinateur, et les résultats représentent la moyenne de 2 mesures.

Les zones de nécrose cutanée sont très bien délimitées après une semaine. Nous avons donc choisi de garder pour analyse les résultats des planimétries au 7<sup>ème</sup> jour. Nous avons également pratiqué des analyses des valeurs obtenues aux 10<sup>èmes</sup> et 14<sup>èmes</sup> jours, mais ceux-ci étant très certainement faussés du fait de la rétraction connue des zones nécrotiques, nous ne les présentons pas dans cette étude.

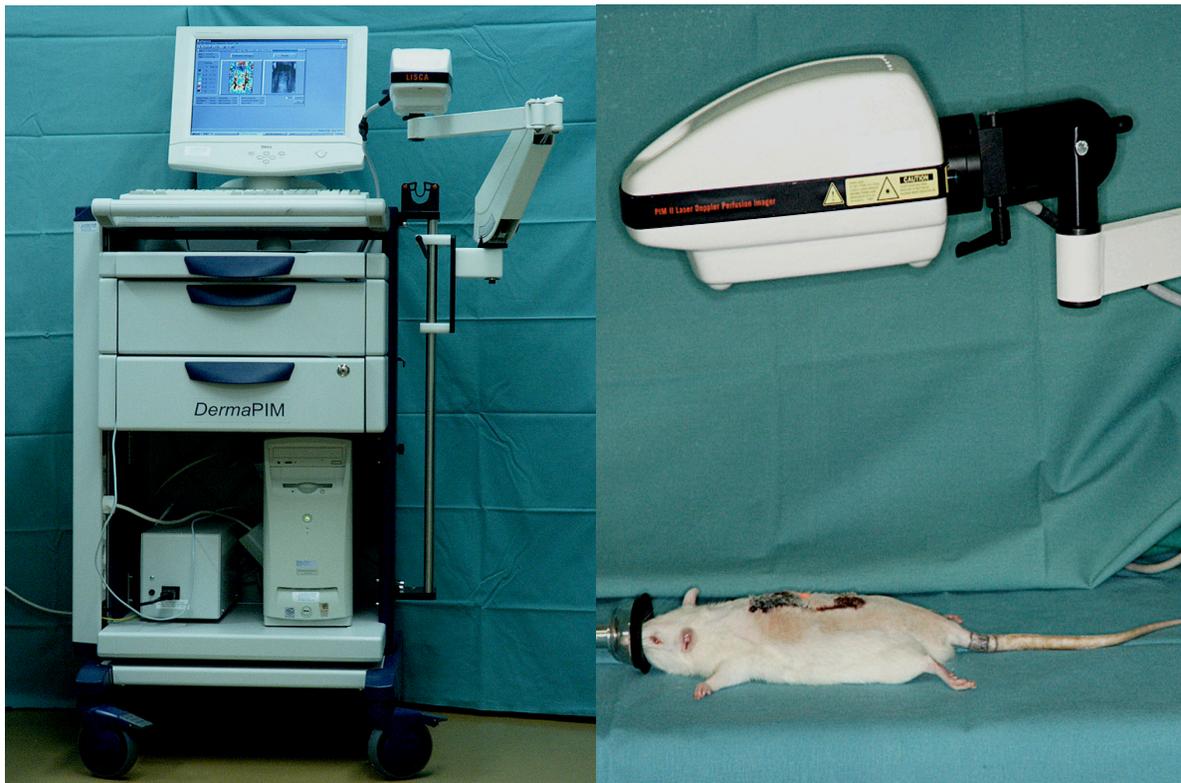
## **6. Évaluation de la perfusion des lambeaux**

Une évaluation quantitative de la perfusion des lambeaux a été réalisée quotidiennement pendant 2 semaines à l'aide d'un laser doppler imager (PIMII, Lisca laser doppler imaging system, Linköping, Suède), les animaux étant préalablement anesthésiés (cf. figure 9). Cette technique, non-invasive et aisée d'emploi, permet des résultats reproductibles lors d'utilisation répétée chez le même sujet. Afin de limiter l'effet de variations de température, les rats ont été gardés, durant toute la durée de l'expérience, dans des pièces à température constante contrôlée (22°C).

La lumière émise par la tête du laser pénètre les tissus à une profondeur de 0.4-0.7mm, et permet ainsi la mesure des perfusions des plexus capillaires du lambeau pour une aire déterminée. L'appareil permet également, grâce à sa précision, de déceler des différences de flux sanguin pour des points très rapprochés contenus au sein d'une même aire. Les résultats obtenus sont ainsi plus fiables même si la perfusion sanguine du lambeau est hétérogène.

Un programme informatique statistique combiné au laser doppler (Patchtest-Wizard 1.2, Lisca Inc.) permet de créer une image de la zone de distribution microvasculaire. La perfusion de la zone balayée par le scanner est présentée sous forme de valeurs numériques brutes ainsi que par encodage couleur (les zones les moins perfusées apparaissant en bleu foncé, les mieux perfusées en rouge vif, cf. figure 10). Les données enregistrées peuvent ainsi être facilement interprétées en définissant des régions d'intérêt sur l'image elle-même. En utilisant une zone d'intérêt définie, le logiciel calcul plusieurs paramètres, dont notamment la valeur moyenne de perfusion et le nombre de sites de mesure. Le programme prend en compte également, pour le calcul des moyennes de perfusion, les valeurs nulles présentes parfois aux niveaux des zones nécrotiques.

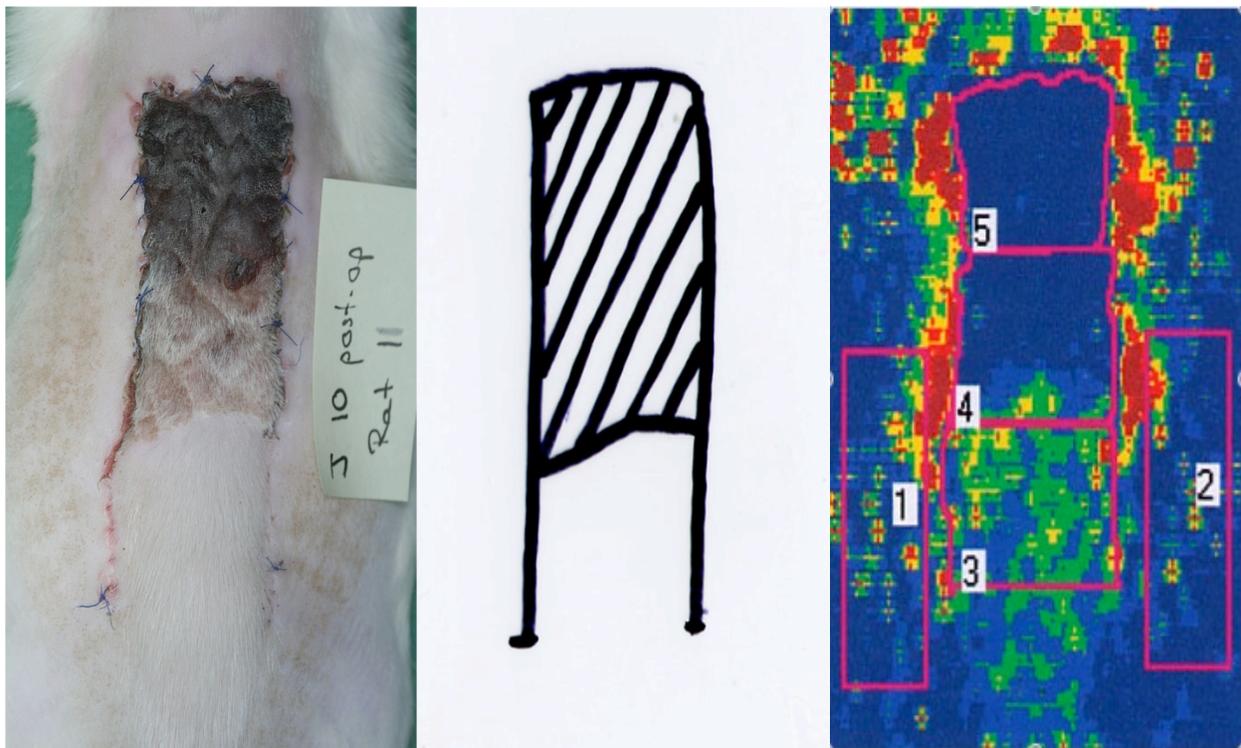
Pour cette expérience, la zone scannée comprend le lambeau dans son ensemble ainsi que la peau saine adjacente, permettant la comparaison des flux. Cinq surfaces de taille comparable sont ainsi choisies, trois correspondant aux tiers proximaux, intermédiaires et distaux des lambeaux, et deux autres de part et d'autre des lambeaux, au niveau de la peau saine adjacente. Ces 2 dernières aires sont tracées de manière à ne pas inclure les zones d'hypervascularisation en bordure immédiate du lambeau (dus à la néovascularisation), aisément repérables par leur couleur rouge sur l'image exprimant la perfusion avec le logiciel Patchtest-Wizard (cf. figure 10). Les valeurs moyennes de perfusion sanguine mesurées pour chaque tiers des lambeaux ont été reportées comme un pourcentage par rapport à la perfusion moyenne de la peau saine adjacente. Cette dernière a été calculée en prenant la moyenne des valeurs de perfusion de chacune des 2 surfaces adjacentes aux lambeaux.



**Figure 9 :** Le laser doppler imager. Sur l'image de droite, mesure de la perfusion en cours sur un rat anesthésié grâce à un masque.

## 7. Analyse statistique

Toutes les valeurs de perfusion relative et les pourcentages de viabilité obtenus par planimétrie ont été comparées par analyse de variance (ANOVA) à l'aide du programme GraphPad InStat 3.0. Une valeur de  $p < 0.05$  est admise comme significative. Toutes les valeurs ont au préalable été soumises à un test de normalité (xlstat2006).



**Figure 10 :** Evaluation d'un lambeau au 10ème jour, chez un animal du groupe 3 (triple application de sangsue). À gauche, photo montrant la présence d'une nécrose supérieure à 50%. Au centre, image planimétrique, la zone de nécrose étant représentée par l'aire hachurée. À droite, analyse de la perfusion après examen au laser doppler avec le logiciel Patchtest-Wizard. Trois zones de surface similaire sont dessinées pour les 3 segments du lambeau : proximal, intermédiaire et distal (zones 3, 4 et 5 respectivement). Deux autres zones de même surface sont créées pour analyse de la peau saine adjacente au lambeau (zones 1 et 2). On peut remarquer la corrélation des zones de nécrose sur la photo et sur la planimétrie, avec la perfusion très diminuée au niveau de la moitié distale du lambeau (code couleur bleu foncé).

## 8. Résultats

### a) Analyse macroscopique des lambeaux

Après élévation des lambeaux, la perfusion périphérique est initialement maintenue, comme en témoigne le saignement artériel aux marges chirurgicales, en bordure des lambeaux. Lors des 12 premières heures post-opératoires, nous notons l'apparition d'une coloration pourpre et d'un œdème tissulaire au niveau du tiers distal des lambeaux, ainsi que l'arrêt du saignement périphérique, signant la présence d'une insuffisance artério-veineuse progressive. Dans les groupes 1 (contrôle) et 2 (une sangsue), nous observons ensuite le développement d'une épidermolyse superficielle (manifestée par des phlyctènes et des croûtes superficielles brunâtres) dès le 2<sup>ème</sup> jour post-opératoire, à la partie la plus distale des lambeaux, et s'étendant progressivement plus proximale. Au 4<sup>ème</sup> jour, on relève une induration progressive de tout le tiers distal et la présence d'une croûte épaisse noire, correspondant à une nécrose touchant toute l'épaisseur du lambeau. Cette nécrose forme une limite bien définie avec le tissu sain, lui-même déterminé par une couleur comparable à la peau saine adjacente (cf. figure 10, image de gauche).

Dans le groupe 3 (trois sangsues), nous avons remarqué l'apparition précoce de zones de nécrose superficielle, dès 16 heures post-opératoires, se situant autour des sites de morsure des sangsues (cf. figure 11). Une nécrose comprenant toute l'épaisseur tissulaire du lambeau a été également mise en évidence aux mêmes sites, dès le 2<sup>ème</sup> jour post-opératoire ( $p < 0.01$ ).

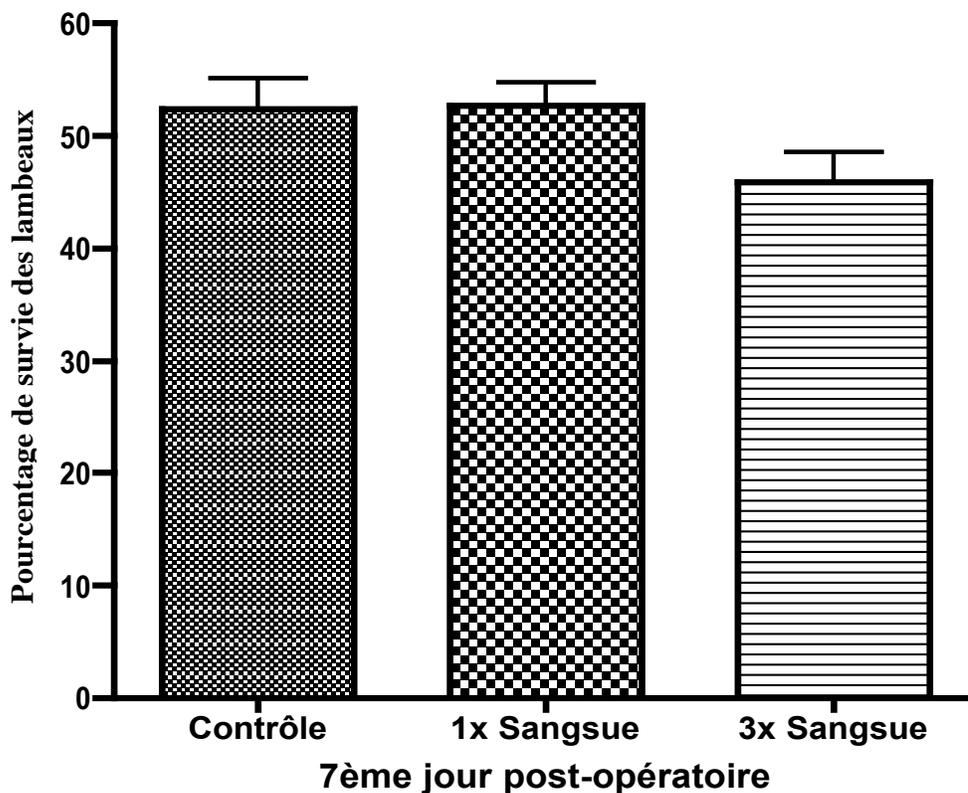


**Figure 11 :** Troisième application de sangsue, 16 heures après levée du lambeau. Les 2 sites de morsures précédents montrent déjà un aspect nécrotique. La nécrose s'étendra ensuite rapidement au niveau du tiers distal.

b) Survie des lambeaux

Les analyses planimétriques ont montré pour le groupe 1 (contrôle), au 7<sup>ème</sup> jour, une survie moyenne de  $52.4 \pm 8.5\%$  de la surface totale du lambeau. L'application d'une seule sangsue n'amène pas de changement significatif quant à la survie. Au 7<sup>ème</sup> jour post-opératoire, la survie était de  $52.7 \pm 6.4\%$  pour le groupe 2.

La triple application de sangsue a montré une diminution non significative de la survie des lambeaux de 6.5% ( $p > 0.05$ ). Au 7<sup>ème</sup> jour, la survie dans le groupe 3 était de  $45.9 \pm 8.5\%$  (cf. figure 12).



**Figure 12 :** Pourcentage de survie des lambeaux au 7<sup>ème</sup> jour, estimés par planimétrie, exprimés en pourcentage  $\pm$  écart-type. Groupe contrôle :  $52.4 \pm 8.5\%$ , groupe 1 :  $52.7 \pm 6.4\%$ , groupe 3 :  $45.9 \pm 8.5\%$  ( $p > 0.05$ ).

c) Perfusion cutanée mesurée par laser doppler

Au 2<sup>ème</sup> jour post-élévation d'un lambeau cutané «random», les mesures au laser doppler montrent une perfusion de  $93.2 \pm 16.5\%$  des valeurs cutanées normales pour le tiers proximal chez les animaux du groupe contrôle, de  $92.7 \pm 16.7\%$  pour le groupe 3 et une augmentation non significative de 9% pour le groupe 2 ( $102.2 \pm 13.2\%$ ). Concernant le tiers intermédiaire, les valeurs mesurées sont de  $57.2 \pm 10.3\%$  de la perfusion cutanée normale pour le groupe 1 (contrôle),  $59.5 \pm 8.5\%$  pour le groupe 3, et de  $72.4 \pm 9.1\%$  pour le groupe 1 ( $p < 0.01$ ). L'application d'une seule sangsue a donc permis une augmentation significative du flux sanguin de 15.2% pour le tiers moyen. Les mesures effectuées au niveau du tiers distal des lambeaux ne sont pas considérées dans cette étude, les morsures laissées par les sangsues et le développement d'une épidermolyse superficielle empêchant une analyse fiable des perfusions.

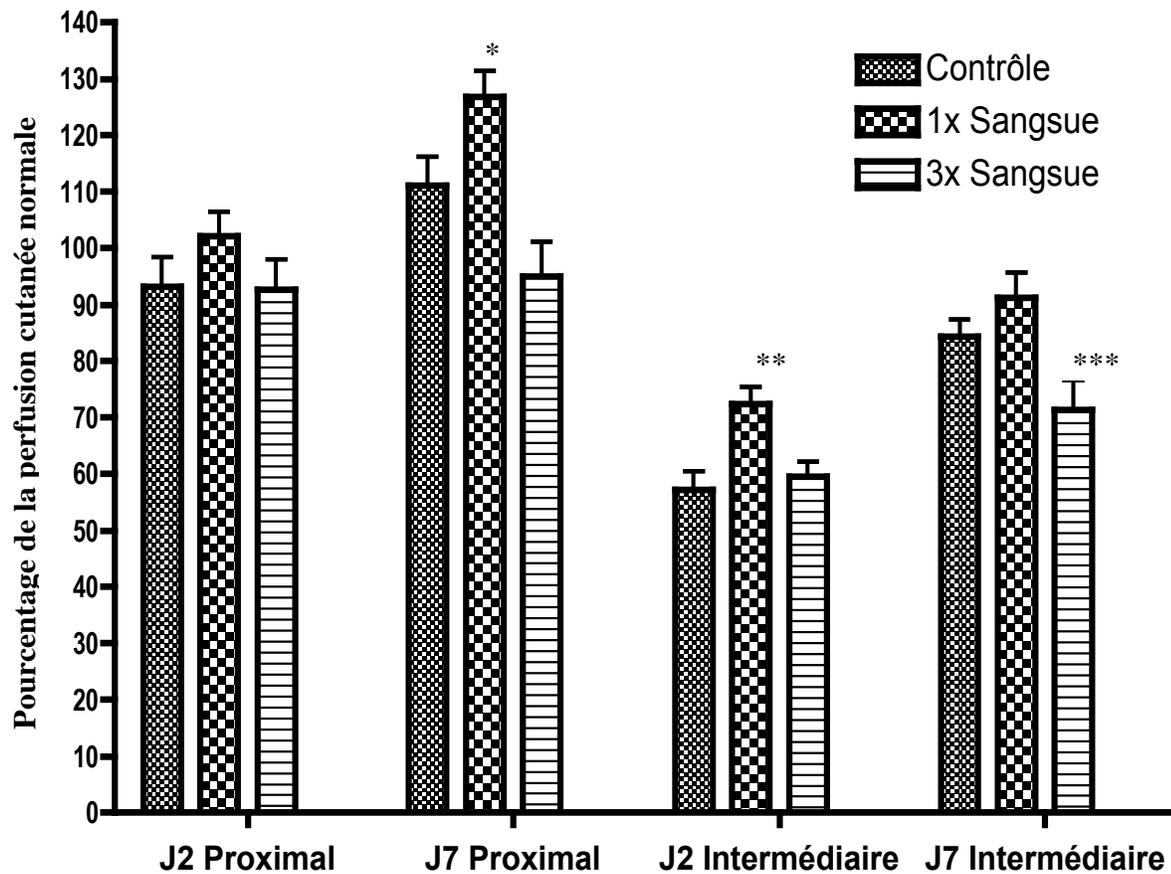
Au 7<sup>ème</sup> jour post-opératoire, la perfusion moyenne mesurée au niveau du tiers proximal est de  $111.1 \pm 16\%$  de la perfusion de la peau saine adjacente pour le groupe contrôle, de  $95 \pm 19.4\%$  pour le groupe 3, et de  $126.7 \pm 14.9\%$  pour le groupe 2 ( $p < 0.01$ ), soit une augmentation significative de 15.6% de la perfusion cutanée suite à l'application d'une seule sangsue. Au 7<sup>ème</sup> jour également, la perfusion moyenne mesurée au niveau du tiers intermédiaire est de  $84.3 \pm 9.3\%$  de la perfusion de la peau saine adjacente pour le groupe contrôle, de  $91.2 \pm 14\%$  pour le groupe 2, et de  $71.3 \pm 16.6\%$  pour le groupe 3 ( $p < 0.05$ ), soit une diminution significative de 13% de la perfusion au tiers moyen suite à l'application de 3 sangsues (cf. figure 13).

d) Application des sangsues

Nous n'avons pas rencontré de difficultés lors de l'application des sangsues immédiatement après la levée des lambeaux ou 8 heures plus tard. En revanche, leur emploi s'est avéré plus délicat après 16 heures, certaines sangsues refusant même de s'attacher. Si nous avons dû parfois recourir à plusieurs tentatives avec la même sangsue, voire utiliser un autre spécimen, l'attachement a été obtenu dans tous les cas et pour la durée souhaitée (30 minutes).

Le poids des sangsues avant application est de 1.12 grammes en moyenne ( $0.76\text{g} - 1.46\text{g}$ ). La quantité moyenne de sang ingéré est de  $0.1 \pm 0.2\text{g}$  après application immédiate ( $p < 0.01$ ), de  $0.6 \pm 0.5\text{g}$  lors d'une application différée de 8 heures et de  $0.3 \pm 0.5\text{g}$  après un délai de 16 heures.

Le temps de saignement moyen des morsures observé, depuis le détachement de la sangsue jusqu'à l'obtention d'un caillot avec arrêt du saignement, est de  $188 \pm 52$  minutes. Aucun rat n'a succombé par exsanguination.



**Figure 13 :** Pourcentages moyens de perfusion pour les tiers proximaux et intermédiaires des lambeaux par rapport à la perfusion moyenne de la peau saine adjacente.

\* groupe 2 : 126.7% vs. 111.1% et 95% (p<0.01)

\*\* groupe 2 : 72.4% vs. 57.2% et 59.5% (p<0.01)

\*\*\* groupe 3 : 71.3% vs. 84.3% et 91.2% (p<0.05)

#### **IV. DISCUSSION**

Le but de cette étude est d'investiguer si l'application de sangsues peut avoir un effet bénéfique sur un modèle de lambeau souffrant d'insuffisance vasculaire mixte artérioveineuse. Une telle insuffisance se développe couramment au niveau de la partie distale des lambeaux cutanés type «random», fréquemment utilisés en chirurgie plastique et reconstructive pour couvrir des pertes de substance de petite ou moyenne taille [77-78], par exemple après un traumatisme ou l'exérèse de tissu tumoral [79-80].

Les lambeaux «random» sont caractérisés par l'absence de pédicule vasculaire défini, la perfusion tissulaire reposant entièrement sur un réseau vasculaire de distribution aléatoire. Leur physiologie a été rendue plus claire suite aux études de l'anatomie vasculaire cutanée réalisées par Ian Taylor en 1987, et notamment grâce à l'introduction du concept des «angiosomes» [81]. Un angiosome est une zone tridimensionnelle de tissus suppléés par un système vasculaire unique, artériel et veineux. Les territoires vasculaires spécifiques à chaque lambeau sont ainsi connus, définissant leur taille maximale selon les «artériosomes» et «vénosomes» inhérents [82].

L'extension d'un lambeau cutané «random» au-delà de son angiosome est responsable d'une diminution du flux sanguin, tant artériel que veineux. Si un angiosome peut en effet bénéficier d'une certaine perfusion en provenance des angiosomes adjacents, celle-ci est toutefois réduite en raison du caractère tortueux et du calibre réduit des artères anastomotiques (choke vessels) reliant les angiosomes entre eux. Le développement de l'insuffisance veineuse, qui semble être prédominante cliniquement, peut s'expliquer par la présence de valves positionnées de manière à assurer un flux veineux centripète au sein d'un même angiosome. Ainsi, dans une portion de lambeau qui inclut un territoire angiosomique adjacent, la circulation veineuse doit s'effectuer à contre-sens des valves. L'hyperpression intra-vasculaire qui en résulte, attestée par la dilatation des veines concernées [83], permet dans une certaine mesure de forcer ces valves.

Malgré ces avancées scientifiques réalisées dans le domaine de l'anatomie vasculaire, ayant permis l'amélioration du dessin des lambeaux, les chirurgiens plasticiens restent encore fréquemment confrontés aux problèmes d'ischémie post-opératoire distale et de nécrose partielle secondaire. On la rencontre jusque dans 25% des cas de lambeaux pédiculés utilisés pour la région cervico-faciale [84-85], ainsi que lors de reconstruction mammaire [86-87], entraînant une morbidité significative pour les patients.

Un lambeau axial peut également montrer des signes de «randomisation» dans ses zones périphériques, si sa délimitation excède le territoire de l'angiosome et inclut des tissus n'étant pas directement vascularisés par les vaisseaux nourriciers inclus dans le pédicule du lambeau. Il peut ainsi en résulter une nécrose partielle (contrairement à une nécrose intéressant la quasi-totalité de la surface du lambeau en cas d'atteinte au niveau du pédicule), se produisant dans 0-28% des TRAM flaps [88-89], 2,5-37,5% des DIEP flaps [89-91] et dans 7-27% des lambeaux de grand pectoral [85, 92-93].

Les mécanismes physiopathologiques exacts du développement de la nécrose dans les lambeaux «random» restent toutefois insuffisamment compris. Les zones concernées par la nécrose subissent des modifications progressives de la microcirculation, causées soit par une diminution initiale du flux sanguin artériel avec stase veineuse consécutive, soit par une augmentation primaire de la résistance veineuse qui entrave progressivement l'hémodynamique artérielle. Le rôle des shunts artério-veineux (qui sont recrutés en cas d'insuffisance veineuse et diminuent en cas d'insuffisance artérielle [10-12]) n'est lui aussi pas clairement établi. Selon Pang et ses collaborateurs [94], les shunts sembleraient ne pas être impliqués prioritairement dans la réduction du flux sanguin distal d'un modèle de lambeau type «random». Ces mêmes auteurs évoquent en revanche le rôle probablement prépondérant dans l'ischémie d'une vasoconstriction de petites artères «random» (suppléant les artéioles cutanées et les shunts), ainsi que le relâchement de substances neuro-humorales pouvant également jouer un rôle dans l'augmentation de la résistance vasculaire.

Le modèle de lambeau utilisé pour cette étude, décrit par McFarlane, est couramment utilisé pour étudier la survie et la nécrose des lambeaux. Son dessin est aisé, et le pourcentage de nécrose distale très constant. Les expérimentations visant à améliorer la survie de tels lambeaux ont cependant jusqu'alors ciblé essentiellement la composante artérielle de l'insuffisance vasculaire, avec parfois des résultats probants (vasodilatateurs, facteurs angiogéniques par exemple). Toutefois, l'évolution clinique du lambeau cutané dorsal chez le rat montre tous les signes d'une composante d'insuffisance veineuse : tuméfaction, aspect luisant et violacé de la peau, chaleur à la palpation et présence d'un écoulement sanguin veineux après scarification. Une insuffisance artérielle pure se manifeste en revanche par un lambeau pâle, sec, froid à la palpation et ne saignant pas après scarification.

Il existe diverses thérapies bien étudiées pour sauver un lambeau souffrant de congestion veineuse, par absence soit partielle soit totale du retour veineux. En cas d'obstruction complète du retour veineux, lors d'une thrombose par exemple (faisant suite à un vasospasme, à une torsion du vaisseau ou à sa compression par un hématome), c'est la révision chirurgicale du lambeau qui constitue le traitement primaire. Cependant cette réintervention est souvent limitée par le temps et n'est pas toujours capable de résoudre l'insuffisance veineuse. L'anticoagulation intraveineuse par héparine [95-96] ainsi que les traitements thrombolytiques [97] sont controversés, du fait de leur effet limité au sein du lambeau et du risque augmenté d'hématome, et donc du risque de compression secondaire du pédicule [98]. En cas d'absence partielle de retour veineux, ou lorsqu'il n'existe pas de possibilité chirurgicale de pallier son absence totale, comme lors d'une réimplantation digitale, les chirurgiens plasticiens ont redécouvert l'une des plus anciennes pratiques médicales, la saignée, à travers l'utilisation de sangsues.

Les sangsues sont ainsi de nos jours fréquemment utilisées chez l'homme avec un succès démontré par nombre de publications, après une chirurgie de réimplantation, ou pour soulager des lambeaux axiaux souffrant d'une insuffisance ou d'une absence du retour veineux. En expérimentation animale, cinq études ont investigué les effets de l'application de sangsues sur la survie de lambeaux, s'agissant toujours de modèles de lambeaux axiaux dont le retour veineux a été artificiellement interrompu [52-55]. Elles permettent d'obtenir une décompression veineuse (manifestée notamment par l'amélioration de la coloration cutanée autour du site de morsure) et la restauration partielle d'une perfusion capillaire, dans l'attente du rétablissement d'un drainage

veineux efficace par néovascularisation [55]. La pression négative générée lors de la succion provoque également un afflux de sang à travers le lambeau en direction du site de morsure, dont les effets bénéfiques sur la restauration initiale du flux sanguin ont été démontrés [59]. Toutefois, les effets de l'application de sangsues sur un lambeau de type «random» présentant une insuffisance mixte artério-veineuse n'ont encore jamais été investigués.

Ainsi, en tenant compte du rôle probablement dominant de la composante veineuse dans les mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance vasculaire mixte, nous avons établi notre hypothèse principale de travail : l'usage de sangsues permettrait de soulager la congestion veineuse tissulaire, conduisant à une amélioration de la survie de notre modèle de lambeau. Leur application précoce permettrait également de prévenir la péjoration secondaire de la perfusion artérielle. Il a été démontré en effet qu'une congestion veineuse prolongée de quelques heures seulement entraîne un ralentissement du flux artériel [52, 54].

Lors de la première application de sangsue dans notre expérience, les quantités de sang ingurgitées ont été faibles ( $0.1 \pm 0.2g$ ), de manière attendue. En effet, si les sangsues peuvent ingérer plus de 1000 fois leur poids (soit plus de 15ml de sang) lors d'utilisation clinique rapportée chez l'homme en cas de congestion veineuse prononcée [51, 99], les rations de sang sont cependant bien plus faibles chez l'animal, et sont corrélées à la sévérité et à la durée de la congestion veineuse, ainsi qu'à la quantité de perfusion artérielle. Si la congestion veineuse n'était pas encore bien établie immédiatement après la levée du lambeau, un certain degré d'insuffisance artérielle était déjà présent, démontrant le caractère mixte de l'insuffisance vasculaire de notre modèle de lambeau.

Il ne semble toutefois pas exister de corrélation entre le volume de sang retiré par les sangsues et la survie des lambeaux, comme le décrivent Cottler et ses collaborateurs. Ils ont suggéré ainsi que le volume retiré tenait un rôle moindre que la redistribution du flux sanguin cutané produite par les sangsues, comme déjà suggéré par Smoot et ses collaborateurs [55]. Les mécanismes expliquant l'augmentation de la perfusion par effet mécanique restent peu clairs. La pression négative générée lors de la succion provoque certes un afflux de sang à travers le lambeau, en direction du site de morsure. Si une grande partie de ce sang finira soit dans le tractus digestif de la sangsue, soit s'écoulera durant plusieurs heures par la plaie, la résultante de l'afflux créé reste favorable pour la perfusion globale du lambeau. Aucune étude jusqu'ici n'a cependant pu élucider de manière précise ce phénomène. Certaines artéριοles cutanées pourraient rester ainsi perméables par maintien d'une certaine pression de perfusion. En plus de l'effet mécanique, une amélioration locale de la perfusion pourrait résulter des substances vasodilatatrices sécrétées par les sangsues, contrebalançant l'état hyper-adrénergique faisant suite à la levée d'un lambeau et l'effet de substances vasoconstrictrices relâchées lors de l'inflammation (thromboxane A2 p.ex.).

Nous avons observé, dans notre étude, que l'application d'une seule sangsue induisait un effet bénéfique transitoire sur la perfusion des lambeaux cutanés dorsaux de type «random». Au 2ème jour post-opératoire, nous avons en effet mesuré une augmentation significative de la perfusion au tiers intermédiaire de 15.2% par rapport au groupe contrôle ( $p < 0.01$ ). Cette amélioration s'est estompé toutefois avec le temps au niveau du tiers moyen, et a «reculé» vers le tiers proximal : au 7ème jour post-opératoire, l'augmentation de la perfusion locale était de 15.6% au tiers proximal comparé au groupe contrôle ( $p < 0.01$ ), mais n'était plus que de 6.9% au tiers intermédiaire

( $p > 0.05$ ), n'atteignant plus les critères de signification. Sachant que l'amélioration de la survie des lambeaux ne peut être obtenue qu'au prix d'une augmentation maintenue de la perfusion artérielle au niveau du tiers intermédiaire (zone critique), la survie totale du lambeau au 7ème jour post-opératoire est demeurée ainsi inchangée (groupe 2 vs. contrôle : 52.7% vs. 52.4%,  $p > 0.05$ ). Nos résultats contrastent avec ceux de Cottler qui, suite à l'application de 2 spécimens à 48 heures d'intervalle, avait observé une amélioration significative de 78% de la perfusion et de 27% concernant la survie totale [54]. Toutefois, dans leur expérience, il a fallu obtenir une très forte augmentation de la perfusion pour une répercussion modérée sur la survie du lambeau. Dans notre modèle de lambeau cutané dorsal chez le rat, l'insuffisance artérielle concomitante ne permet pas au lambeau de réagir positivement à la levée de l'insuffisance veineuse, et donc d'obtenir une amélioration de la survie.

Si l'ingestion de sang est restée peu importante lors de la première application, les sangsues ont déversé toutefois leurs substances anticoagulantes dans la plaie, comme en témoignait le temps de saignement moyen de 188 minutes observé, permettant ainsi l'écoulement de quelque quantité supplémentaire de sang. Le soulagement de la congestion veineuse n'a été cependant que partiel, au vu de l'aspect clinique des lambeaux après 8 heures, qui montraient toujours un aspect turgescents et cyanosés, et des quantités de sang plus importantes prélevées par les sangsues lors de la deuxième application ( $0.6 \pm 0.5g$ ). Ces constatations s'expliquent certainement à nouveau par la présence de l'insuffisance artérielle sous-jacente qui, par ralentissement du flux artériel capillaire, entraîne une stase veineuse secondaire. Des microthromboses pourraient ainsi s'être formées malgré les substances anticoagulantes de la salive injectée. Celles-ci auront probablement été «lavées» de la plaie rapidement, sans avoir eut le temps de diffuser à l'intérieur des tissus en raison du faible flux artériel.

Après 16 heures, les lambeaux présentaient toujours des signes de congestion veineuse dans les 3 groupes, mais l'insuffisance artérielle gagnait de l'importance, comme semblaient l'indiquer les observations suivantes : premièrement, la quantité de sang ingéré par les sangsues tendait à diminuer, même si les valeurs n'atteignent pas le seuil de signification ( $0.3 \pm 0.5g$  vs.  $0.6 \pm 0.5g$  à 8 heures,  $p > 0.05$ ). Deuxièmement, certaines sangsues ont montré un désintérêt total du site d'application choisi (au tiers distal du lambeau), mais se tenaient prêtes en revanche à s'attacher sur une partie plus proximale du lambeau voire en zone saine adjacente. Lors des premières utilisations thérapeutiques de sangsues, il a été souvent observé et rapporté qu'elles ne s'attachaient pas à un lambeau nécrosé souffrant d'insuffisance artérielle, et leur utilisation a même été suggérée comme moyen de tester la viabilité des lambeaux [100]. De plus, l'échec d'un attachement rapide, une faible succion ou un repas incomplet ont même été suggérés par Foucher comme facteurs pronostics de la survie des lambeaux, malgré une coloration tissulaire encore satisfaisante.

La triple application de sangsues, dans notre étude, a démontré des effets délétères prononcés. Au 2ème jour post-opératoire, la perfusion sanguine au tiers intermédiaire n'était augmentée que de 2.5%, de façon non significative ( $p > 0.05$ ). Au 7ème jour post-opératoire cependant, nous avons mesuré une diminution significative de 13% de la perfusion au tiers intermédiaire (groupe 3 vs. contrôle :  $71.3 \pm 16.6\%$  vs.  $84.3 \pm 9.3\%$ ) ( $p < 0.05$ ), reflétée par une diminution de la survie des lambeaux de 6.5% (groupe 3 vs. contrôle :  $45.9 \pm 8.5\%$  vs.  $52.4 \pm 8.5\%$ ), toutefois non significative ( $p > 0.05$ ). Cliniquement, l'effet délétère de la triple application s'est exprimé par le

développement précoce de la nécrose distale des lambeaux, débutant aux sites de morsure et développée de façon quasi définitive dès le second jour post-opératoire déjà, soit 2 jours plus tôt que dans les groupes 1 et 2 (groupe 3 vs. contrôle : jour 2 vs. jour 4) ( $p < 0.01$ ).

Le lambeau de McFarlane, utilisé pour la présente étude, n'a jusqu'à ce jour pas encore fait l'objet d'une étude anatomique vasculaire détaillée, et l'appréciation de sa nécrose en termes de mécanismes circulatoires demeure insuffisante. Bien qu'elle semble prépondérante lors de l'observation clinique, la composante d'insuffisance veineuse du lambeau cutané dorsal ne peut ainsi être quantifiée avec certitude. De plus, son impact réel sur la survie d'un modèle de lambeau cutané «random» chez l'animal reste controversé. Certains auteurs pensent en effet qu'une diminution même importante du retour veineux n'entraîne pas de diminution de survie d'une portion randomisée d'un lambeau axial [101], ou d'un lambeau cutané «random» malgré une congestion veineuse précoce, du moins chez l'animal [83]. L'insuffisance artérielle pourrait ainsi, contrairement aux observations pratiquées chez l'homme, être plus délétère qu'une insuffisance veineuse dans un lambeau cutané dorsal chez le rat [83]. Nous savons en effet qu'il existe des différences importantes entre la peau humaine et la peau animale. Chez le rat, la peau est vascularisée essentiellement par des artères cutanées directes parallèles à l'axe longitudinal de l'animal, et en faible partie par de rares branches perforantes musculo-cutanées. De manière inverse, ces artères perforantes représentent l'afflux sanguin principal chez l'homme.

Nos résultats montrent que l'application d'une seule sangsue, sur un modèle de lambeau type «random», entraîne une augmentation transitoire de la perfusion tissulaire locale, confirmant une partie de nos hypothèses. Cependant, cet effet n'est pas suffisant concernant l'amélioration de la survie, en raison de l'insuffisance artérielle concomitante. La posologie des sangsues doit ainsi être adaptée non seulement au degré d'insuffisance veineuse, mais également à la «réserve» artérielle dont dispose le lambeau. Un surdosage, en cas d'insuffisance artérielle concomitante, entraîne des effets délétères par soustraction trop importante de sang à la fois artériel et veineux. Il en résulte une diminution significative de la perfusion artérielle autour des sites de morsure des sangsues, promouvant l'ischémie localement et le futur développement de la nécrose tissulaire dans les lambeaux de type «random».

## **V. CONCLUSION**

Les résultats de ce travail montrent que l'application de sangsues, en cas d'insuffisance vasculaire mixte, entraîne une augmentation de la perfusion tissulaire locale sans amélioration toutefois de la survie du lambeau ischémique de type «random» chez le rat. Un surdosage de sangsues exerce en revanche des effets délétères sur la perfusion sanguine locale, réduisant ainsi la survie totale.

L'évaluation clinique minutieuse d'un lambeau en souffrance est indispensable avant d'appliquer des sangsues. Le caractère de l'insuffisance vasculaire doit être déterminé avec précision afin d'exclure la présence d'une insuffisance artérielle bien évidemment, mais également la présence d'une insuffisance mixte artério-veineuse.

En clinique, la fréquence, la durée et le nombre de sangsues à appliquer doivent être adaptés au degré d'insuffisance veineuse et à la taille du lambeau.

La congestion veineuse pure avec apport artériel maintenu demeure la seule indication à l'utilisation clinique des sangsues.

## VI. ANNEXE : LA SANGSUE

La sangsue est un animal invertébré de l'embranchement des annélides, appartenant à la classe des hirudinées, annélides sans parapodes ni soies, dont le nombre de segment est constant, et caractérisés par la possession d'une ventouse buccale. Elle peuple les eaux stagnantes, et dispose d'une durée de vie d'une vingtaine d'années. Autrefois abondante en Europe de l'Ouest et dans les pays bordant la mer Méditerranée au nord-ouest, elle est aujourd'hui en voie de disparition en raison de la raréfaction des mares et du déclin de la population des grenouilles, l'un de ses hôtes en liberté. Elle est même devenue une espèce protégée dans de nombreux pays.

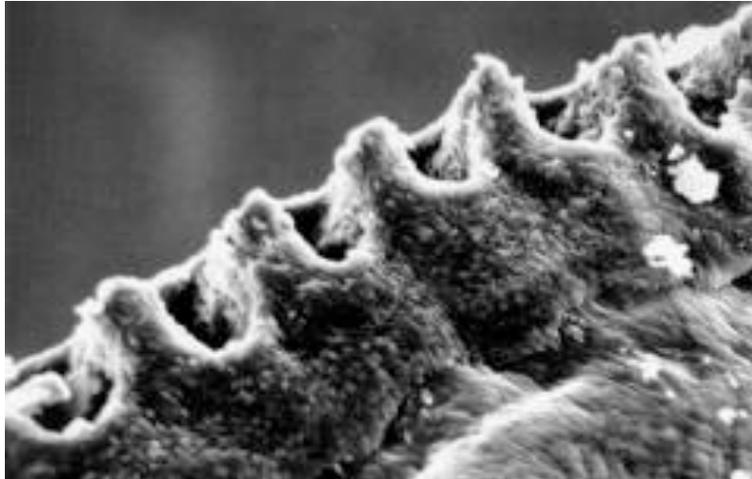
Bien qu'il existe plus de 700 espèces, la sangsue la plus utilisée en Europe et aux Etats-Unis est la sangsue européenne, *Hirudo Medicinalis*. D'autres sangsues sont utilisées en clinique, notamment *Haementeria Officinalis* au Mexique, *Podcilobdella Granulosa* en Inde, *H. Australiensis* en Australie, et plus récemment *Hirudinaria Manillensis* aux Etats-Unis et *H. Michalseni* en Afrique du Sud [102].

### 1. Anatomie

Selon Mann (1961), *Hirudo Medicinalis*, de couleur brun-vert foncée, mesure environ 12 cm de long et peut se contracter jusqu'à atteindre la moitié de sa longueur. Elle possède deux disques musculaires ou ventouses à chaque extrémité : l'une plus petite, en position céphalique, dans laquelle se trouve la bouche, et la seconde plus grande, se situant à la partie caudale, servant à l'attachement et à la locomotion. La bouche se compose de trois mâchoires de 70 petites dents acérées chacune, permettant de s'attacher et de mordre jusqu'à 1.5 mm de profondeur et laissant une blessure en forme de Y dont les 3 bords mesurent environ 1 mm de long (cf. figures 14 et 15). Un grand nombre de glandes salivaires unicellulaires s'ouvrent dans la bouche, permettant la sécrétion de substances actives dans la plaie.



**Figure 14 :** Agrandissement des trois mâchoires de la sangsue, formant un Y.



**Figure 15** : Agrandissement au microscope électronique des dents ornant chacune des trois mâchoires.

## **2. Reproduction**

La sangsue étant un animal hermaphrodite, la reproduction s'effectue donc par fertilisation mutuelle, qui a lieu d'avril à octobre, en fonction de la température des eaux. Elle dépose des cocons (sortant de son clitellum, partie se situant au milieu du corps) pouvant contenir jusqu'à 30 œufs chacun, dans la vase ou sur des plantes, des rochers ou même des crustacés. De 1 à 8 cocons peuvent être « pondus » en 1 semaine (en moyenne : 4 à 5 cocons). L'éclosion surviendra entre 3 à 6 semaines plus tard, en fonction de la température de l'eau [103].

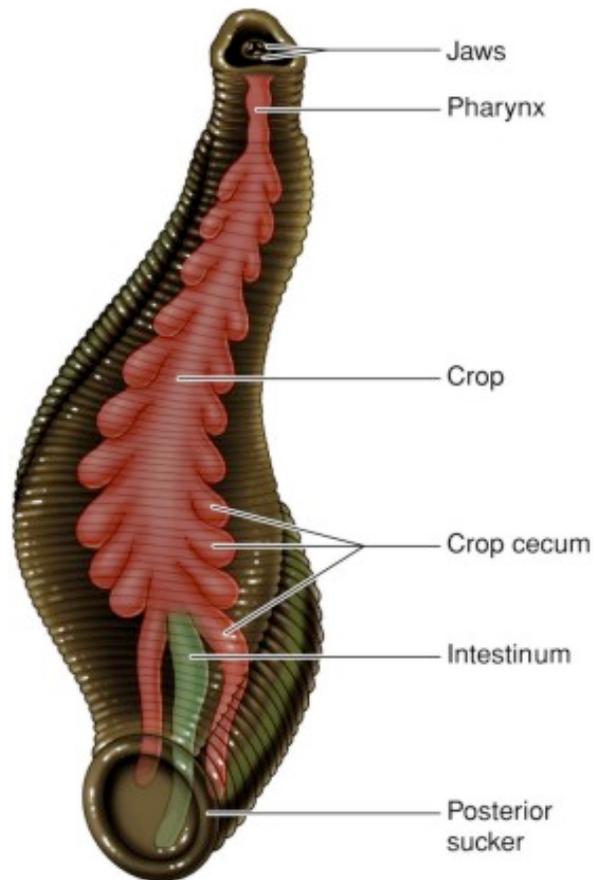
## **3. Physiologie**

Les sangsues se nourrissent du sang de mammifères, de reptiles ou d'amphibiens (la grenouille principalement), ainsi que de larves d'insectes. Les jeunes sangsues se nourrissent obligatoirement d'amphibiens pour leurs 2 premiers repas, n'étant pas encore capables de percer la peau des mammifères. L'appétit de la sangsue est un facteur déterminant de son comportement, un spécimen rassasié n'ayant que peu de chances de s'attacher et mordre à nouveau. La sangsue affamée répond à plusieurs stimuli mécaniques, chimiques et thermiques avant d'entamer son repas. L'hôte potentiel est d'abord détecté par son mouvement. La chaleur qu'il dégage va ensuite exciter chez la sangsue des neurones contenant de la sérotonine. La stimulation de ces neurones entraîne le relâchement de la sérotonine, qui va elle-même stimuler d'autres neurones contenus dans le pharynx, encourageant l'attachement, la morsure ainsi que la sécrétion de salive. La température idéale de la peau de l'hôte pour encourager la morsure se situerait entre 33°C et 40°C, la sangsue mordant rarement une surface avec une température inférieure à 25°C [104]. Les neurones contenant de la sérotonine agissent également comme chémorécepteurs, et sont ainsi également sensibles au sodium et à l'arginine présents dans le sang de l'hôte.

Grâce à un pharynx musculaire, le sang est aspiré (avec une pression négative d'environ 0.1 atmosphère) jusque dans le tractus digestif, où il s'épaissit, l'eau étant retirée progressivement par un système de 17 néphrons. Une ration complète de sang équivaut de 6 à 11 fois le poids initial de la sangsue. Le repas dure entre 20-40 minutes environ, et l'on suppose que c'est la distension de la paroi gastrique qui donne le feedback pour l'arrêt de l'ingestion.

La digestion, qui peut durer une année entière, s'effectue grâce à la flore bactérienne présente dans le tractus digestif de la sangsue, composé de 22 poches pouvant recueillir le sang (cf. figure 16). Graetz et Antrum, en 1935, ont été les premiers auteurs à émettre l'hypothèse que des bactéries soient imputées dans le processus de digestion. Busing, en 1958, mit en évidence une souche de bactéries qu'il nomma *Pseudomonas hirudin*. Nous savons aujourd'hui que la bactérie prédominante du tractus digestif est *Aeromonas Sobria*, mais la plus étudiée reste *Aeromonas hydrophila*. Toutes deux sont pathogènes pour l'homme et une vingtaine de cas d'infections ont été publiés [105]. *A. hydrophila* produit en outre un antibiotique limitant la croissance des autres bactéries, aidant ainsi à préserver le sang stocké de la putréfaction.

Quant à la respiration, elle s'effectue par échanges gazeux à la surface cutanée, celle-ci étant recouverte d'une muqueuse sensible à la dessiccation.



**Figure 16 :** Représentation schématique du système digestif de la sangsue.

#### 4. Mécanismes d'action des sangsues

L'effet thérapeutique des sangsues est, en réalité, plutôt dû au saignement continu de la blessure après morsure, pouvant durer plusieurs heures, qu'à la quantité de sang retirée directement. Les premiers cliniciens qui en ont fait usage ont rapporté qu'elles pouvaient retirer environ 10 à 15ml de sang lors d'une application, soit environ 800% de leur poids. Ils remarquèrent également un temps de saignement prolongé au niveau de la plaie après morsure. Afin d'expliquer ce phénomène, la salive des sangsues a ainsi fait l'objet de nombreuses recherches.

Il est intéressant de relever les mécanismes élaborés par les animaux se nourrissant de sang pour interférer avec les processus de coagulation du donneur. Il est en effet essentiel pour la sangsue de pouvoir inhiber la coagulation dans son tractus digestif, mais également au site de prélèvement chez l'hôte, afin de faciliter l'ingestion du sang. De plus, le stimulus nociceptif provoqué par une blessure induit habituellement chez l'hôte une réaction inflammatoire locale avec afflux de leucocytes. Il s'avère capital pour la sangsue de prévenir ce phénomène, car pendant les mois nécessaires à digérer la ration de sang, les leucocytes pourraient déverser des enzymes dégradant l'hémoglobine. La sangsue doit donc disposer de moyens de bloquer le stimulus nociceptif, de diminuer l'inflammation locale et de synthétiser des anticoagulants permettant de maintenir le sang fluide durant l'ingestion puis la digestion. En 2001, Salzet publiait une revue des divers composants salivaires connus ayant une action biologique, issus de différentes espèces de sangsues, dont voici les principaux [106] :

##### a) L'hirudine

Elle fut la première substance active mise en évidence, découverte en 1884 par Haycraft [36]. Shionoya, en 1927 [107], investiga son rôle d'agent anti-thrombotique puissant. La structure de l'hirudine fut établie en 1950, avant que Markwardt, en 1955, ne réussisse enfin à l'isoler et à l'identifier comme étant un polypeptide [108]. Comparée aux héparines de bas poids moléculaire, l'hirudine agit comme un inhibiteur direct de la thrombine et ne nécessite pas de co-facteurs pour son activité. Elle n'interfère pas non plus avec la synthèse des facteurs de la coagulation. De plus, elle est capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. Depuis 1986, elle peut être produite en quantité grâce au génie génétique.

Pendant des décennies, l'on pensait que le temps de saignement prolongé observé après morsure n'était dû qu'à l'hirudine. Toutefois, une étude anglaise menée par Munro et ses collaborateurs en 1989 a démontré que les paramètres de la coagulation sensibles à l'hirudine, comme le temps de saignement, le temps de thrombine et le temps de prothrombine, mesurés sur du sang s'écoulant d'une blessure humaine provoquée par une sangsue, redevenaient normaux après 15 minutes, l'hirudine étant spontanément lavée de la blessure [109]. La sangsue produit donc d'autres substances sécrétées dans sa salive, et capables de prolonger l'écoulement de sang par la morsure.

b) Autres facteurs agissant sur l'agrégation plaquettaire ou sur la coagulation

Bien d'autres substances actives contenues dans la salive des sangsues ont été découvertes par la suite et ont fait l'objet de nombreuses recherches. Une étude menée par Rigbi en 1996 établit que la salive de *H. medicinalis* est capable d'inhiber l'agrégation des plaquettes humaines induites par la thrombine, le collagène, l'ADP, l'adrénaline, le PAF et l'acide arachidonique [110]. Il révèle la présence de l'apyrase, enzyme inhibant l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Il met en évidence également d'autres substances, comme une collagénase inhibant l'agrégation induite par le collagène et permettant aux autres substances de mieux diffuser dans les tissus, un inhibiteur du PAF (puissant médiateur de l'inflammation) et la decorsine, polypeptide agissant comme un antagoniste puissant des récepteurs plaquettaires IIb-IIIa. L'étude a également démontré la présence d'inhibiteurs de la coagulation, notamment un inhibiteur du facteur Xa.

c) Facteurs vasodilatateurs ou facilitant la dissémination tissulaire des substances actives

Outre la collagénase, une hyaluronidase servirait à la dissémination des autres substances sécrétées dans la blessure [111]. Certains inhibiteurs de protéases ont été également isolés, et pourraient avoir un rôle antithrombotique, antifibrinolytique et peut-être anti-inflammatoire. Un vasodilatateur, sous la forme d'un anti-histaminique, contribue au prolongement du saignement observé après morsure. La présence d'une substance anesthésiante, quant à elle, n'a jamais été prouvée, mais semble fort probable en raison du caractère indolore de la morsure, et jouera donc le rôle d'éviter le stimulus nociceptif de la morsure.

d) Effet mécanique

Par phénomène de succion lors de la prise alimentaire, une pression négative (d'environ 0.1 atmosphère) est créée, stimulant ainsi favorablement le flux sanguin local chez l'hôte. Bien que non établi formellement, il est fortement présumé que cet effet de succion soit responsable en partie de l'effet bénéfique d'application de sangsues sur un lambeau compromis par une insuffisance veineuse, en augmentant l'apport artériel du lambeau en plus du soulagement de l'engorgement veineux (Smoot [59]).

## **5. Complications de l'utilisation clinique de sangsues**

a) L'infection

Une étude sur la nutrition des sangsues, menée par Elliott et ses collaborateurs, a révélé pourquoi l'infection est une complication potentielle de leur utilisation [112]. Typiquement, lorsque l'animal s'attache et perce un trou à travers la peau, il régurgite immédiatement une partie de son contenu intestinal (renfermant les bactéries) avant de commencer à sucer, et il régurgite à nouveau avant de se détacher. La persistance des micro-dents dans la plaie lors d'un retrait traumatique de la sangsue peut également conduire à une infection.

Les manifestations les plus fréquentes d'une infection à *Aeromonas hydrophila*, agent pathogène le plus courant contenu dans la flore intestinale de *H. medicinalis*, sont la gastro-entérite, la cellulite, les abcès, la nécrose cutanée et sous-cutanée, la myonécrose et la septicémie. L'incidence exacte d'une infection secondaire à l'emploi de sangsues en milieu clinique est difficile à établir. Des valeurs entre 2.4% et 20% sont rapportées dans la littérature [113]. Il a été également rapporté des infections à *Serratia Marcescens*. Un traitement antibiotique approprié instauré avant l'application de sangsues chez l'homme permet de prévenir efficacement ces complications, pour autant que l'apport artériel soit suffisant au site d'application [114]. Toutefois, il faut prendre en compte l'incidence de  $\beta$ -lactamases, contre-indiquant l'emploi de céphalosporines de 1ère génération ou de pénicillines [115]. Au vu de ce risque infectieux et du risque théorique de transmission d'autres agents biologiques (hépatite, HIV), il devient évident qu'une sangsue ne doit être appliquée qu'une seule fois et qu'à un seul patient lors d'utilisation clinique.

#### b) Autres complications

Une autre complication possible lors d'application chez l'homme est la chute rapide de l'hémoglobine. Celle-ci survient lors de saignement important au site d'application mais aussi lors d'attachement à d'autres parties du corps, les orifices notamment, si l'on ne surveille pas la sangsue. La revue de la littérature montre en effet de multiples publications relatant des hémorragies au niveau du larynx, pharynx, glotte, œsophage, estomac, vagin, urètre et vessie par exemple. L'hémorragie peut cependant, dans la majeure partie des cas, être contrôlée par compression ou application de thrombine localement.

Des cas de réaction allergique locale voire d'anaphylaxie aux composants salivaires ont été rapportés. Il a été également décrit des cas d'obstruction des voies aériennes et d'hémoptysie suite à la migration de sangsues au niveau de l'hypopharynx ou des bronches.

Pour terminer, il faut prendre en compte l'aspect psychologique de l'application de sangsues pour le patient. En effet, la majorité d'entre eux n'apprécient pas voir de petites créatures visqueuses évoluer librement sur leur corps. Une aide psychologique s'avère parfois nécessaire.

## **6. Maintenance et mode d'application**

Les sangsues sont idéalement conservées dans un verre ou un bocal en plastique d'au moins 500ml et rempli d'eau fraîche aux 2/3. L'eau sera changée régulièrement. Une compresse attachée par un élastique les empêchera de s'enfuir du récipient et permettra un libre passage de l'air. Les sangsues ainsi gardées pourront vivre jusqu'à une année sans se nourrir. Certaines pharmacies (Leeches USA par exemple) recommandent d'utiliser de l'eau distillée à laquelle on ajoute une mixture saline appelée Hirudosalt.

Lors d'utilisation clinique, les sangsues affamées sont les plus performantes. Celles-ci sont parfois reconnaissables par leur mode d'attachement au bocal, la bouche étant au-dessus de la

surface de l'eau et le reste du corps pendant immergé. Les sangsues rassasiées se trouvent plus volontiers sous la surface de l'eau, voire reposant au fond du bocal.

Concernant leur utilisation, notamment chez l'homme, de nombreux protocoles ont été publiés. Un premier résumé a été édité par Kraemer en 1988 [98], puis un second plus récent par Whitaker en 2004 [116]. Voici leurs principales recommandations :

- Le site d'attachement devra tout d'abord être nettoyé avec un peu de NaCl, afin de retirer toute substance antiseptique ou pommade pouvant interférer avec l'attachement de la sangsue, voire avec une solution saline héparinisée et tiède pour favoriser également la vasodilatation (Whitaker). La désinfection avec une solution alcoolique n'est pas recommandée, pouvant faire régurgiter dans la plaie des bactéries propres à la sangsue. Le site choisi d'application devrait être celui où la congestion veineuse est la plus importante, et l'on peut apposer une gaze humide percée en son centre pour diriger la sangsue. Celle-ci sera manipulée avec des gants, et en évitant l'emploi de pinces métalliques pour la saisir. À l'aide d'une aiguille, on fait sourdre une petite goutte de sang de l'hôte au site choisi et l'on applique la tête de la sangsue directement sur le sang, la stimulant ainsi à s'attacher (certains auteurs proposent également de déposer quelques gouttes de solution glucosaline à 5%). Une fois la morsure effectuée, on peut surveiller le bon déroulement de l'ingestion en observant les mouvements de péristaltisme au niveau du pharynx, puis l'augmentation progressive du volume de l'animal.
- Une surveillance régulière est nécessaire, prévenant ainsi les risques de disparition de la sangsue et son attachement au niveau d'une autre partie du corps ou d'un orifice, jusqu'à son détachement spontané en fin de repas, d'une durée de 20 à 60 minutes environ en moyenne. Le détachement peut être obtenu en appliquant une solution alcoolique ou saline sur le corps de la sangsue qui, une fois utilisée, devra être sacrifiée, en la trempant dans une solution d'alcool à 70% par exemple. Il ne faut utiliser les sangsues qu'une fois et qu'avec un seul patient. Certains auteurs ont toutefois développé des techniques permettant de réutiliser précocement un spécimen rassasié [117].
- Suite au détachement de la sangsue, la plaie continuera de saigner spontanément pendant des heures. Une surveillance aux demi-heures permet de vérifier le bon écoulement du sang, et l'on pourra frotter la plaie avec une petite gaze imbibée de NaCl pour retirer les caillots et stimuler l'écoulement au besoin. Les signes d'allergie ou d'infection seront recherchés régulièrement, et des cultures bactériennes de la plaie seront effectuées.
- Toutes les 24 heures au minimum, et durant toute la thérapie, un contrôle de l'hémoglobine et hémocrite sera effectué, afin de prévenir une perte de sang trop importante, en particulier chez les enfants. En fonction des résultats, des culots globulaires devront être transfusés.
- Concernant le risque infectieux, les sangsues ne seront pas réutilisées, et doivent être sacrifiées après toute utilisation. Lors d'application chez l'homme, des antibiotiques intraveineux prophylactiques seront administrés durant toute la thérapie (Whitaker recommande par exemple une quinolone, comme la ciprofloxacine, associée à un aminoglycoside, ces deux antibiotiques n'ayant jamais rencontré de résistances). Les patients

qui présentent toujours une plaie ouverte ou une escarre non cicatrisée après l'arrêt de l'application de sangsues devraient bénéficier d'une prophylaxie per os jusqu'à cicatrisation complète.

Malheureusement, concernant le nombre idéal de sangsues à appliquer pour obtenir l'effet désiré, ainsi que le temps d'application et l'intervalle entre deux applications, il ne semble se dégager aucun protocole spécifique. Un doigt réimplanté ne nécessitera probablement qu'une seule sangsue, alors qu'un lambeau plus vaste exigera plusieurs spécimens. Les conclusions de l'étude de Kraemer sont que *«le nombre exact de sangsues à appliquer et le choix du site d'attachement dépendent de l'importance et de la localisation de l'engorgement veineux. Du fait que toutes les sangsues n'ingèrent pas de ration équivalente, plusieurs spécimens pourront être nécessaires pour un seul traitement»*. Quant à Whitaker, il souligne simplement le fait que les indications à l'emploi de sangsues restent très vagues encore à l'heure actuelle, et sont dépendantes du chirurgien.



**Figure 17** : Willem van den Bossche. Historia Medica. Bruxelles, 1639.

## VII. GLOSSAIRE

**Acide arachidonique** : acide gras non saturé, dérivé des phospholipides des membranes cellulaires. Dégradé par la cyclo-oxygénase (enzyme inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou AINS) en prostaglandines, prostacycline et thromboxaneA2, ainsi que par la lipo-oxygénase en leucotriènes. Alors que les prostaglandines et la thromboxaneA2 favorisent l'agrégation plaquettaire, la prostacycline s'y oppose très fortement. Les leucotriènes n'ont pas de rôle direct sur les plaquettes.

**Adrénaline** : hormone sécrétée par la glande surrénale. Médiateur chimique des nerfs adrénergiques. Stimule les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ , provoquant : accélération du rythme cardiaque, augmentation de la force et de l'amplitude de ses battements, contraction des vaisseaux sanguins (à l'exception des artères coronaires et artères des muscles squelettiques, qui se dilatent), élévation de la tension artérielle et de la glycémie, inhibition de la musculature bronchique et intestinale, accroissement des sécrétions et provocation de la mydriase.

**Facteurs de croissance** : substances polypeptidiques qui se fixent sur des récepteurs membranaires et stimulent alors la prolifération cellulaire. Parmi ces facteurs : FGF (fibroblast growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor).

**Facteur tissulaire (TF)** : protéine relâchée par un tissu endommagé, participant à l'activation de la cascade de coagulation.

**Facteur VII** : appelé aussi proconvertine. L'un des 13 facteurs de la coagulation, désignés par des chiffres romains. Agit sur la thromboplastine en présence de calcium ionisé, formant ainsi la convertine. Cette dernière permet la transformation de la prothrombine en thrombine.

**Facteur Xa** : Il accélère la transformation de prothrombine en thrombine. Le «a» signifie que le facteur a été activé.

**Fibrine** : protéine filamenteuse insoluble, élastique, qui se dépose par coagulation spontanée du sang. Les filaments forment un réseau dont les nœuds sont constitués par des agrégats de plaquettes, menant à la formation d'un caillot ou thrombus.

**Fibrinogène** : précurseur de la fibrine. Se transforme en fibrine sous l'action de la thrombine.

**Héparine** : anticoagulant naturel, existant dans tous les tissus de l'organisme mais particulièrement abondant dans le foie (d'où son nom) et dans les muscles. Utilisée en thérapeutique dans le traitement des thromboses. Elle active l'antithrombine III plasmatique, ralentissant la formation et empêchant l'action de la thromboplastine et de la thrombine, s'opposant à la formation de la fibrine. Elle inhibe également les facteurs XIII et Xa, ainsi que l'adhésion et l'agrégation des plaquettes.

**Héparine de bas poids moléculaire (HBPM)** : caractérisées par leur fort antagonisme contre le facteur Xa et leur forte affinité pour l'antithrombine III. Action antithrombotique puissante, et faible action anticoagulante. Utilisées dans la prévention des thromboses veineuses.

**Hyaluronidase** : enzyme capable d'hydrolyser l'acide hyaluronique, polysaccharide abondant dans le tissu conjonctif notamment. Elle fait partie des facteurs de diffusion, c'est-à-dire des substances capables d'accroître la diffusion des virus, toxines ou colorants dans les tissus.

**Noradrénaline** : catécholamine sécrétée surtout par les cellules sympathiques des ganglions paravertébraux, à partir de la dopamine. Diffère de l'adrénaline par l'absence d'un groupement méthyle sur l'atome d'azote. Médiateur chimique qui stimule les récepteurs adrénergiques  $\alpha$ . Son action vasoconstrictrice et hypertensive est supérieure à celle de l'adrénaline.

**PAF** : facteur d'activation des plaquettes. Un des médiateurs de l'hypersensibilité immédiate. Phospholipide qui, sous l'influence de l'IgE, est libéré par les basophiles et les mastocytes. Facteur très énergétique d'agrégation plaquettaire, il contracte les bronches (rôle dans l'asthme), abaisse la pression artérielle et favorise l'apparition d'oedèmes.

**Plaquettes** : petits éléments sanguins de forme fuselée, déclenchant la coagulation sanguine et provoquant le début de l'hémostase, dite hémostase primaire. Leur membrane contient plusieurs récepteurs dont les plus importants sont les glycoprotéines Ib et IIb-IIIa. Lors d'une lésion vasculaire, la paroi endommagée du vaisseau sanguin expose des fibres de collagène, auxquelles vont s'accoler très rapidement (1 à 2 secondes) les plaquettes. Suite à l'adhésion, elles vont sécréter des substances stimulant leur regroupement, ou agrégation, puis seront unies par des filaments de fibrine.

**Prothrombine** : protéine plasmatique qui, sous l'action de la thromboplastine activée et en présence de calcium ionisé, se transforme en thrombine. Sa synthèse au niveau du foie ne peut se faire sans vitamine K.

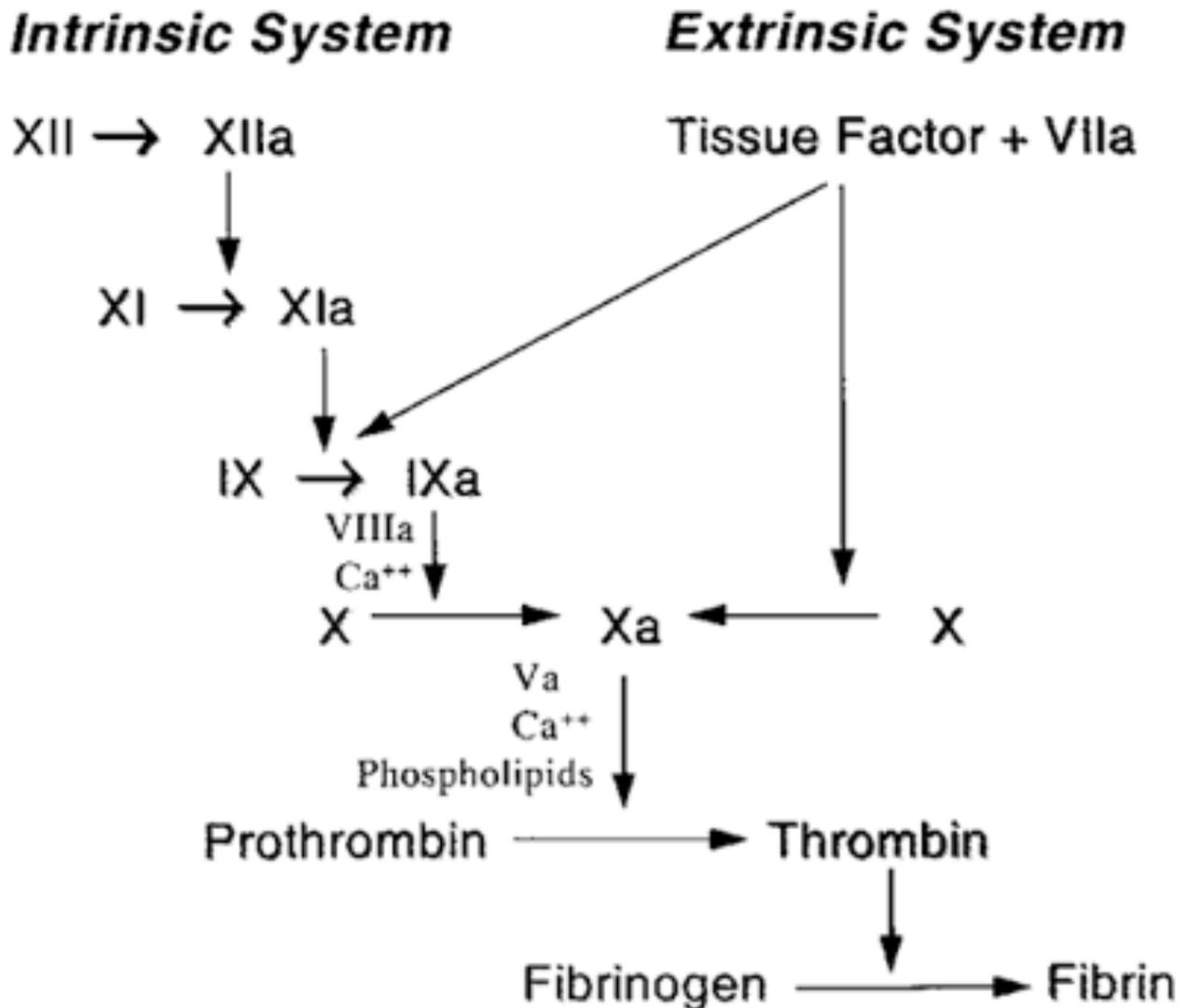
**Système nerveux sympathique** : l'un des 2 éléments du système nerveux autonome (l'autre étant le système nerveux parasympathique). Agit par l'intermédiaire de 2 médiateurs chimiques : l'adrénaline et la noradrénaline.

**Temps de prothrombine** : synonyme du temps de Quick. Mesure la somme des durées de la thrombinoformation, de la fibrinoformation et de l'activation de la thromboplastine. Son allongement est proportionnel à l'abaissement des taux de prothrombine et de certains facteurs accélérant la transformation de la prothrombine en thrombine (facteurs VI, VII et X notamment). Utilisé en clinique pour mesurer et surveiller l'efficacité des traitements par médicaments anticoagulants anti-vitamine K (par exemple Sintrom®).

**Temps de thrombine** : mesure la durée de fibrinoformation qui dépend des quantités de fibrinogène, d'antithrombine et d'héparine contenus dans le plasma. Allongé en présence de substances anticoagulantes.

**Thrombine** : enzyme capable de transformer le fibrinogène en fibrine.

**Thromboplastine** : système enzymatique complexe nécessaire à la coagulation du sang et formé dans le plasma par l'interaction de certains facteurs de la coagulation. Sous l'action des facteurs VI, VIIa et Xa, elle devient thromboplastine activée ou prothrombinase, transformant rapidement la prothrombine en thrombine.



Représentation schématique de la cascade de coagulation.

## VIII. REFERENCES

1. Pittet B., Montandon D. *Nasal reconstruction in children: a review of 29 patients*. J Craniofac Surg, 1998 Nov; **9**(6): 522-528.
2. Im M.J., Su C.T., Hoopes J.E. *Metabolic adaptations in delayed skin flaps. Glucose utilization and hexokinase activity*. Plast Reconstr Surg, 1979 Aug; **64**(2): 244-248.
3. Hoopes J.E., Su C.T., Im M.J. *Enzymatic responses to skin flap elevation following a delay procedure*. Plast Reconstr Surg, 1980 Sep; **66**(3): 369-372.
4. Cohen B.E., Harmon C.S., Phizackerley P.J. *Glucose metabolism in experimental skin flaps*. Plast Reconstr Surg, 1983 Jan; **71**(1): 79-86.
5. Bayati S., Russell R.C., Roth A.C. *Stimulation of angiogenesis to improve the viability of prefabricated flaps*. Plast Reconstr Surg, 1998 Apr; **101**(5): 1290-1295.
6. Khoo C.T., Bailey B.N. *The behaviour of free muscle and musculocutaneous flaps after early loss of axial blood supply*. Br J Plast Surg, 1982 Jan; **35**(1): 43-46.
7. Callegari P.R., Taylor G.I., Caddy C.M., Minabe T. *An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies*. Plast Reconstr Surg, 1992 Mar; **89**(3): 397-407; discussion 417-418.
8. Taylor G.I., Corlett R.J., Caddy C.M., Zelt R.G. *An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications*. Plast Reconstr Surg, 1992 Mar; **89**(3): 408-16; discussion 417-418.
9. Dhar S.C., Taylor G.I. *The delay phenomenon: the story unfolds*. Plast Reconstr Surg, 1999 Dec; **104**(7): 2079-2091.
10. Hjortdal V.E., Hauge E., Hansen E.S. *Differential effects of venous stasis and arterial insufficiency on tissue oxygenation in myocutaneous island flaps: an experimental study in pigs*. Plast Reconstr Surg, 1992 Mar; **89**(3): 521-529.
11. Guba A.M. Jr. *Arteriovenous shunting in the pig*. Plast Reconstr Surg, 1980 Mar; **65**(3): 323-327.
12. Hjortdal V.E., et al. *The microcirculation of myocutaneous island flaps in pigs studied with radioactive blood volume tracers and microspheres of different sizes*. Plast Reconstr Surg, 1992 Jan; **89**(1): 116-124.
13. Shweiki D., et al. *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992 Oct; **359**(6398): 843-845.
14. Folkman J., Klagsbrun M. *Angiogenic factors*. Science, 1987 Jan; **235**(4787): 442-447.
15. Pearl R.M. *A unifying theory of the delay phenomenon—recovery from the hyperadrenergic state*. Ann Plast Surg, 1981 Aug; **7**(2): 102-112.
16. Colville-Nash P.R., Willoughby D.A. *Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential*. Mol Med Today, 1997 Jan; **3**(1): 14-23.
17. Steed D.L., Edington H., Moosa H.H., Webster M.W. *Organization and development of a university multidisciplinary wound care clinic*. Surgery, 1993 Oct; **114**(4): 775-779.
18. Rinsch C., Quinodoz P., Pittet B., Alizadeh N., Baetens D., Montandon D., Aebischer P., Pepper M.S. *Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia*. Gene Ther, 2001 Apr; **8**(7): 523-533.

19. Hayward P.G., et al. *Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon.* Br J Plast Surg, 1991 Oct; **44**(7): 526-529.
20. Liu P.Y., et al. *Enhancement of ischemic flap survival by prefabrication with transfer of exogenous PDGF gene.* J Reconstr Microsurg, 2005 May; **21**(4): 273-279.
21. Suefuji H., et al. *Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction.* Am Heart J, 1997 Aug; **134**(2 Pt 1): 253-259.
22. Alizadeh N., Pittet B., Tenorio X., Pyke C., Baetens D., Schlaudraff K.U., Montandon D., Ezban M., Pepper M.S. *Active-site inactivated FVIIa decreases thrombosis and necrosis in a random skin flap model of acute ischemia.* J Surg Res, 2004 Dec; **122**(2): 263-273.
23. Hosnuter M., Babuccu O., Kargi E., Altinyazar C. *Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival.* Ann Plast Surg, 2003 Apr; **50**(4): 398-402.
24. Harder Y, Amon M, Schramm R, Georgi M, Banic A, Erni D, Menger MD. *Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (HSP)-32-mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance.* Ann Surg. 2005 Dec; **242**(6): 869-78, discussion 878-9.
25. Raposio E., et al. *Experimental model for the evaluation of topical application of a solution to help myocutaneous flap transposition.* Ann Chir Plast Esthet, 2002 Jun; **47**(3): 219-21.
26. Hsu O.K. et al. *Pharmacologic enhancement of rat skin flap survival with topical oleic acid.* Plast Reconstr Surg, 2004 Jun; **113**(7): 2048-2054; discussion 2055-2056.
27. Karacal N., Ambarcioglu O., Topal U., Mamedov T., Kutlu N. *Enhancement of dorsal random-pattern skin flap survival in rats with topical lidocaine and prilocaine (EMLA): enhancement of flap survival by EMLA.* J Surg Res, 2005 Mar; **124**(1): 134-138.
28. Rohrich R.J., Cherry G.W., Spira M. *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment.* Plast Reconstr Surg, 1984 Jun; **73**(6): 943-948.
29. Price M.A., Pearl R.M. *Multiagent pharmacotherapy to enhance skin flap survival: lack of additive effect of nitroglycerin and allopurinol.* Ann Plast Surg, 1994 Jul; **33**(1): 52-56.
30. Whitaker I.S., Rao J., Izadi D., Butler P.E. *Historical article: Hirudo medicinalis: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history.* Br J Oral Maxillofac Surg, 2004 Apr; **42**(2): 133-137.
31. Adams S.L. *The Medicinal Leech. A page from the annelids of internal medicine.* Ann Intern Med, 1988 Sep; **109**(5): 339-405.
32. Haycraft J.B. *On the action of a secretion obtained from the medicinal leech on the coagulation of the blood.* Proc R Soc Lond, 1884; **36**: 478-487.
33. Utley D.S., Koch R.J., Goode R.L. *The failing flap in facial plastic and reconstructive surgery: role of the medicinal leech.* Laryngoscope, 1998 Aug; **108**(8 Pt 1): 1129-1135.
34. Lilienthal H. *Coronary thrombosis: proposed treatment by hirudin.* J Mt Sinai Hosp, 1943; **10**: 135.
35. Weinfeld A.B., Kattash M., Grifka R., Friedman J.D. *Leech therapy in the management of acute venous congestion of an infant's lower limb.* Plast Reconstr Surg, 1998 Oct; **102**(5): 1611-1614.
36. Lee N.J., Peckitt N.S. *Treatment of a sublingual hematoma with medicinal leeches: report of case.* J Oral Maxillofac Surg, 1996 Jan; **54**(1): 101-103.
37. Grossman M.D., Karlovitz A. *Lingual trauma: the use of medicinal leeches in the treatment of massive lingual hematoma.* J Trauma, 1998 Jun; **44**(6): 1083-1085.

38. Smeets I.M., Engelberts I. *The use of leeches in a case of post-operative life-threatening macroglossia.* J Laryngol Otol, 1995 May; **109**(5): 442-4.
39. de Chalain T., Cohen S.R., Burstein F.D. *Successful use of leeches in the treatment of purpura fulminans.* Ann Plast Surg, 1995 Sep; **35**(3): 300-304.
40. Seleznev K.G., et al. *Use of the medicinal leech in the treatment of ear diseases.* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1992; **54**(1): 1-4.
41. Makin C.A., Edwards L. *Application of leeches to reduce swelling after reconstructive surgery.* Br J Urol, 1987 Feb; **59**(2): 189.
42. Pantuck A.J. *Re: leech therapy for massive scrotal hematoma following percutaneous transluminal angioplasty.* J Urol, 1998 May; **159**(5): 1647-1648.
43. Goessl C., Steffen-Wilke K., Miller K. *Leech therapy for massive scrotal hematoma following percutaneous transluminal angioplasty.* J Urol, 1997 Aug; **158**(2): 545.
44. Isgar B., Turner A.G. *Large scrotal haematoma treated with medicinal leeches.* Br J Urol, 1989 Nov; **64**(5): 549-50.
45. Bunker T.D. *The contemporary use of the medicinal leech.* Injury, 1981 Mar; **12**(5): 430-432.
46. Menage M.J., Wright G. *Use of leeches in a case of severe periorbital haematoma.* Br J Ophthalmol, 1991 Dec; **75**(12): 755-756.
47. Dressler H., Ehmann G. *Local therapy of grade 1 and 2 hemorrhoids. Effectiveness of a combination preparation with standardized blood leech extract.* Fortschr Med, 1992 Jun 10; **110**(16): 307-310.
48. Derganc M., Zdravic F. *Venous congestion of flaps treated by application of leeches.* Br J Plast Surg, 1960 Jul; **13**: 187-192.
49. Batchelor A.G., Davison P., Sully L. *The salvage of congested skin flaps by the application of leeches.* Br J Plast Surg, 1984 Jul; **37**(3): 358-360.
50. Foucher G., Henderson H.R., Maneaud M., et al. *Distal digital replantation: one of the best indications for microsurgery.* Int J Microsurg, 1981; **3**: 263-270.
51. Hayden R.E. *Leeches. Objective monitoring of altered perfusion in congested flaps.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1988 Dec; **114**(12): 1395-1399.
52. Lee C., Mehran R.J., Lessard M.L., Kerrigan C.L. *Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flap.* Br J Plast Surg, 1992 Apr; **45**(3): 235-238.
53. Lozano D.D., Stephenson L.L., Zamboni W.A. *Effect of hyperbaric oxygen and medicinal leeching on survival of axial skin flaps subjected to total venous occlusion.* Plast Reconstr Surg, 1999 Sep; **104**(4): 1029-1032.
54. Cottler P.S., Gampper T.J., Rodeheaver G.T., Skalak T.C. *Evaluation of clinically applicable exsanguination treatments to alleviate venous congestion in an animal skin flap model.* Wound Repair Regen, 1999 May-Jun; **7**(3): 187-195.
55. Smoot E.C. 3rd, Debs N., Banducci D., Poole M., Roth A. *Leech therapy and bleeding wound techniques to relieve venous congestion.* J Reconstr Microsurg, 1990 Jul; **6**(3): 245-250.
56. Lim C.L. *Successful transfer of "free" microvascular superficial temporal artery flap with no obvious venous drainage and use of leeches for reducing venous congestion: case report.* Microsurgery, 1986; **7**(2): 87-88.
57. Adams J.F., Lassen L.F. *Leech therapy for venous congestion following myocutaneous pectoralis flap reconstruction.* ORL Head Neck Nurs, 1995 Winter; **13**(1): 12-14.

58. Rodgers I.R., Grove A.S. Jr., Silverman D.G. *Venous engorged tissue flaps treated with medicinal leeches*. Ophthal Plast Reconstr Surg, 1992; **8**(4): 271-277.
59. Regan P.J., Roberts J.O., Sabapathy S.R., Roberts A.H. *Use of the medicinal leech to salvage specialized skin jeopardized by venous impairment*. Injury, 1991 Mar; **22**(2): 161-163.
60. Foucher G., Norris R.W. *Distal and very distal digital replantations*. Br J Plast Surg, 1992 Apr; **45**(3): 199-203.
61. Soucacos P.N., Beris A.E., Malizos K.N., Kabani C.T., Pakos S. *The use of medicinal leeches, Hirudo medicinalis, to restore venous circulation in trauma and reconstructive surgery*. Int Angiol, 1994 Sep; **13**(3): 251-258.
62. Akyurek M., Safak T., Kecik A. *Fingertip replantation at or distal to the nail base: use of the technique of artery-only anastomosis*. Ann Plast Surg, 2001 Jun; **46**(6): 605-612.
63. Callegari P.R., Moore J.H. Jr., Degnan G.G. *The leech amphitheater for digital replantation*. Plast Reconstr Surg, 1992 Sep; **90**(3): 511-513.
64. Baudet J. *The use of leeches in distal digital replantation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1991 Feb; **2**(1): 193-196.
65. Mutimer K.L., Banis J.C., Upton J. *Microsurgical reattachment of totally amputated ears*. Plast Reconstr Surg, 1987 Apr; **79**(4): 535-541.
66. Sadove R.C. *Successful replantation of a totally amputated ear*. Ann Plast Surg, 1990 Apr; **24**(4): 366-370.
67. Funk G.F., Bauman N.M., Rinehart R.J., Mankarious L.A. *Microvascular replantation of traumatically amputated ears*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1996 Feb; **122**(2): 184-186.
68. Cho B.H., Ahn H.B. *Microsurgical replantation of a partial ear, with leech therapy*. Ann Plast Surg, 1999 Oct; **43**(4): 427-429.
69. Henderson H.P., Matti B., Laing A.G, Morelli S., Sully L. *Avulsion of the scalp treated by microvascular repair: the use of leeches for post-operative decongestion*. Br J Plast Surg, 1983 Apr; **36**(2): 235-239.
70. Crawford C.R., Hagerty R.C. *Survival of an upper lip aesthetic complex using arterial reanastomosis only*. Ann Plast Surg, 1991 Jul; **27**(1): 77-79.
71. Hirase Y., Kojima T., Hayashi J., Nakano M. *Successful upper labial replantation after 17 hours of ischemia: case report*. J Reconstr Microsurg, 1993 Sep; **9**(5): 327-329.
72. Pantuck A.J., Lobis M.R., Ciocca R., Weiss R.E. *Penile replantation using the leech Hirudo medicinalis*. Urology, 1996 Dec; **48**(6): 953-956.
73. Gross M.P., Apesos J. *The use of leeches for treatment of venous congestion of the nipple following breast surgery*. Aesthetic Plast Surg, 1992 Fall; **16**(4): 343-348.
74. McFarlane R.M., DeYoung G., Henry R.A. *The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention*. Plast Reconstr Surg, 1965 Feb; **35**: 177-182.
75. Khouri M.A., Edstrom L. *Standardizing the dorsal flap*. Surgery forum, 1986; **37**: 510-511.
76. Conforti M.L., Connor N.P., Heisey D.M., Hartig G.K. *Evaluation of performance characteristics of the medicinal leech (Hirudo medicinalis) for the treatment of venous congestion*. Plast Reconstr Surg, 2002; **109**: 228-235.
77. Bunkis J., Mulliken J.B., Upton J., Murray J.E. *The evolution of techniques for reconstruction of full-thickness cheek defects*. Plast Reconstr Surg, 1982; **70**: 319-327.

78. Kulakowski A., Towpik E. *Reconstruction of full-thickness cheek defects after cancer surgery*. Eur J Surg Oncol, 1987; **13**: 57-62.
79. Baker S.R. *Regional flaps in facial reconstruction*. Otolaryngol Clin North Am, 1990; **23**: 925-946.
80. Wheeland R.G. *Reconstruction of the lower lip and chin using local and random-pattern flaps*. J Dermatol Surg Oncol 1991; **17**: 605-615.
81. Taylor G.I., Palmer J.H. *The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications*. Br J Plast Surg, 1987 Mar; **40**(2): 113-141.
82. Taylor G.I., Caddy C.M., Watterson P.A., Crock J.G. *The venous territories (venosomes) of the human body: experimental study and clinical implications*. Plast Reconstr Surg, 1990 Aug; **86**(2): 185-213.
83. Chang H., Nobuaki I., Minabe T., Nakajima H. *Comparison of three different supercharging procedures in a rat skin flap model*. Plast Reconstr Surg, 2004 Jan; **113**(1): 277-283.
84. Kroll S.S., Schusterman M.A., Reece G.P. *Costs and complications in mandibular reconstruction*. Ann Plast Surg, 1992 Oct; **29**(4): 341-347.
85. Mehta S., Sarkar S., Kavarana N., Bhathena H., Mehta A. *Complications of the pectoralis major myocutaneous flap in the oral cavity: a prospective evaluation of 220 cases*. Plast Reconstr Surg, 1996 Jul; **98**(1): 31-37.
86. Shrotria S., Webster D.J., Mansel R.E., Hughes L.E. *Complications of rectus abdominis myocutaneous flaps in breast surgery*. Eur J Surg Oncol, 1993 Feb; **19**(1): 80-83.
87. Banic A., et al. *Late results of breast reconstruction with free TRAM flaps: a prospective multicentric study*. Plast Reconstr Surg, 1995 Jun; **95**(7): 1195-1206.
88. Watterson P.A., Bostwick J. 3<sup>rd</sup>, Hester T.R. Jr., et al. *TRAM flap anatomy correlated with a 10-year clinical experience with 556 patients*. Plast Reconstr Surg, 1995; **95**: 1185-1194.
89. Kroll S.S. *Fat necrosis in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps*. Plast Reconstr Surg, 2000; **106**: 576-583.
90. Gill P.S., Hunt J.P., Guerra A.B., et al. *A 10-year retrospective review of 758 DIEP flaps for breast reconstruction*. Plast Reconstr Surg, 2004; **113**: 1153-1160.
91. Blondeel P.N. *One hundred free DIEP flap breast reconstructions: a personal experience*. Br J Plast Surg, 1999; **52**: 104-111.
92. Deditis R.A., Guimaraes A.V. *Pectoralis major musculocutaneous flap in head and neck cancer reconstruction*. World J Surg, 2002; **26**: 67-71.
93. Chepeha D.B., Annich G., Pynnonen M.A., et al. *Pectoralis major myocutaneous flap vs revascularized free tissue transfer: complications, gastrostomy tube dependence, and hospitalization*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2004; **130**: 181-186.
94. Pang C.Y., Neligan P.C., Forrest C.R., Nakatsuka T., Sasaki G.H. *Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig*. Plast Reconstr Surg, 1986 Jul; **78**(1): 75-84.
95. Kumar P. *The effect of low-molecular-weight heparin on the survival of rabbit congested skin flap*. Plast Reconstr Surg, 2003; **111**: 1580; author reply 1580.
96. Veravuthipakorn L., Veravuthipakorn A. *Microsurgical free flap and replantation without antithrombotic agents*. J Med Assoc Thai, 2004; **87**: 665-669.
97. Conrad M.H., Adams W.P. Jr. *Pharmacologic optimization of microsurgery in the new millennium*. Plast Reconstr Surg, 2001; **108**: 2088-2096; quiz 2097.

98. Buntic R.F., Brooks D., Buncke H.J., Buncke G.M. *Dextran-related complications in head and neck microsurgery: do the benefits outweigh the risks?* *Plast Reconstr Surg*, 2004; **114**: 1008; author reply 1008-1009.
99. Kraemer B.A., Korber K.E., Aquino T.I., Engleman A. *Use of leeches in plastic and reconstructive surgery: a review.* *J Reconstr Microsurg*, 1988 Oct; **4**(5): 381-386.
100. Lent C.M., Fliegner K.H., Freedman E., Dickinson M.H. *Ingestive behaviour and physiology of the medicinal leech.* *J Exp Biol*, 1998; **137**: 513-527.
101. Roberts A.P., Cohen J.I., Cook T.A. *The rat ventral island flap: a comparison of the effects of reduction in arterial inflow and venous outflow.* *Plast Reconstr Surg*, 1996 Mar; **97**(3): 610-615.
102. Mackay D.R., et al. *Aeromonas species isolated from medicinal leeches.* *Ann Plast Surg*, 1999 Mar; **42**(3): 275-279.
103. Sawyer R.T. *Leech biology and behavior, vols. 1,2.* New York : Oxford University Press, 1986.
104. Dickinson M.H., Lent C.M. *Feeding behavior of the medicinal leech, Hirudo medicinalis.* *J Comp Physiol*, 1984; **154**(4): 449-455.
105. Lineaweaver W.C., et al. *Aeromonas hydrophila infections following use of medicinal leeches in replantation and flap surgery.* *Ann Plast Surg*, 1992 Sep; **29**(3): 238-244.
106. Salzet M. *Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches.* *FEBS letters*, 2001 Mar; **492**(3): 187-192.
107. Shionoya T. *J Exp Med*, 1927; **49**: 19-26.
108. Markwardt F. *Untersuchungen über hirudin.* *Naturwissenschaften*, 1955; **42**: 537-538.
109. Munro R., Hechtel F.O., Sawyer R.T. *Sustained bleeding after a leech bite in the apparent absence of hirudin.* *Thromb Haemost*, 1989 Jun 30; **61**(3): 366-369.
110. Rigbi M., Orevi M., Eldor A. *Platelet aggregation and coagulation inhibitors in leech saliva and their roles in leech therapy.* *Semin Thromb Hemost*, 1996; **22**(3): 273-278.
111. Claude A. *Spreading properties and mucolytic activity of leech extracts.* *Proc Soc Exper Biol Med*, 1940; **43**: 684.
112. Elliott E.J. *Chemosensory stimuli in feeding behavior of the leech Hirudo medicinalis.* *J Comp Physiol [A]*, 1986 Sep; **159**(3): 391-401.
113. Sartor C., Limouzin-Perotti F., Legre R., Casanova D., Bongrand M.C., Sambuc R., Drancourt M. *Nosocomial Infections with Aeromonas hydrophila from Leeches.* *Clin Infect Dis*, 2002 Jul 1; **35**(1): E1-E5.
114. Lineaweaver W.C., et al. *Postprandial Aeromonas hydrophila cultures and antibiotic levels of enteric aspirates from medicinal leeches applied to patients receiving antibiotics.* *Ann Plast Surg*, 1992 Sep; **29**(3): 245-249.
115. Hermansdorfer J., Lineaweaver W., Follansbee S., Valauri F.A., Buncke H.J. *Antibiotic sensitivities of Aeromonas hydrophila cultured from medicinal leeches.* *Br J Plast Surg*, 1988 Nov; **41**(6): 649-651.
116. Whitaker I.S., Izadi D., Oliver D.W., Monteath G., Butler P.E. *Hirudo Medicinalis and the plastic surgeon.* *Br J Plast Surg*, 2004 Jun; **57**(4): 348-353.
117. West B.R., Nichter L.S., Halpern D.E. *Emergent reuse leech therapy: a better method.* *Plast Reconstr Surg*, 1994 Apr; **93**(5): 1095-1098.

## **IX. REMERCIEMENTS**

Pour la réalisation de ce travail, qui a comporté notamment de nombreuses heures en laboratoire à découvrir les joies et peines du « chercheur » - expérience absolument inoubliable ! – j'ai bénéficié du soutien indispensable de plusieurs personnes que je souhaite mentionner ici.

Je tiens à remercier en premier lieu le Dr. Kai-Uwe Schlaudraff, connu au fond d'un laboratoire, et devenu ami au fil des discussions et des verres consommés à l'air libre, bien installés en terrasse... Il a su me stimuler, m'apprendre les ficelles de l'expérimentation animale et me soutenir quand rien n'allait (mais elle va s'attacher cette sangsue !!!!). Il m'a aidé à analyser les résultats, et à conduire initialement toutes les étapes pratiques de cette expérience... Qu'aurais-je fait sans lui ? Merci Kai !

Le Professeur Brigitte Pittet-Cuénod, qui m'a donné l'occasion d'effectuer cette thèse dans le domaine de la recherche fondamentale. Malgré les difficultés rencontrées, je ressors grandi de cette expérience ! Un grand merci également pour sa patience lors des dernières corrections et les multiples épisodes de relecture nécessaires.

Ma famille, dont la « positive attitude » constante m'a porté durant toute la période de rédaction, au son des « Mais oui, vas-y, tu peux la finir cette thèse, t'es presque au bout ! ».

Saskia enfin, mon plus précieux soutien, qui a toujours su me motiver et me garder sur les rails, qui sait m'encourager sans trop me mettre la pression, qui me réconforte dans les moments plus pénibles, et qui partagera avec moi les instants de joie après acceptation de ce travail, ajoutant un éclat de plus à cette année 2006 si exceptionnelle !