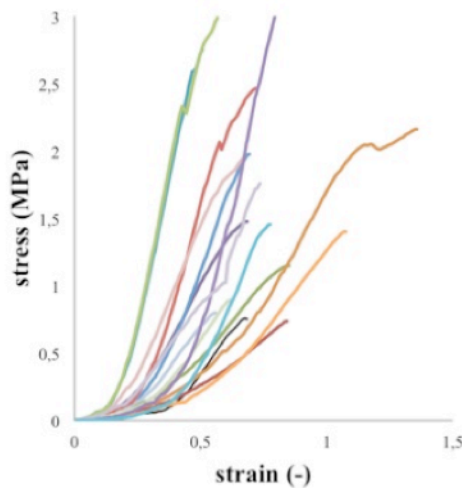
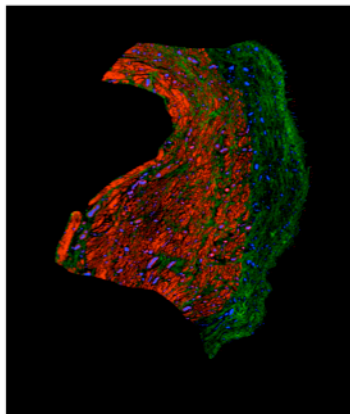


Laurent de Landsheere

Etude de la corrélation entre les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal dans le cadre du prolapsus génital

Promoteurs: Professeur Jean-Michel Foidart
 Professeur Michel Cosson



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Médicales**



Année académique 2013-2014

Voici venu le temps de remercier ceux qui m'ont permis de concrétiser ce travail. C'est l'occasion pour moi de fermer les yeux un instant et de repenser à ce long parcours, depuis le début de mes études de médecine jusqu'à maintenant. Je repense à ces nombreuses rencontres, décisives dans mon orientation professionnelle et dans mes choix de carrière... C'est aussi le moment de remercier ma famille et mes amis qui comptent beaucoup pour moi, mais j'y reviendrai plus loin.

Mes premiers et plus vifs remerciements vont au Professeur Jean-Michel Foidart et au Professeur Michel Cosson. Merci pour votre enseignement et pour vos conseils qui m'ont aidé en permanence à surmonter les difficultés et les doutes qui sont le lot quotidien d'une thèse de doctorat.

Cher Professeur Foidart, merci pour votre vision et votre instinct (de grandes qualités pour un chasseur...). Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé tout au long de mon parcours de spécialisation en Gynécologie-Obstétrique et d'avoir développé mon intérêt pour la chirurgie gynécologique. Vous m'avez permis de rencontrer le Professeur Cosson et réuni les conditions matérielles pour que je puisse travailler au CHRU de Lille et que ce projet de thèse se concrétise. Tout porte à croire que c'était le bon choix !

Merci aussi pour l'encadrement de ce travail et pour votre facilité à trouver des solutions quand les problèmes paraissaient inextricables, le tout dans une approche scientifique rigoureuse mais sereine et souriante.

Cher Professeur Cosson, merci de m'avoir fait confiance, dès notre première rencontre, et si bien accueilli et intégré dans cette grande équipe de chirurgie gynécologique de Jeanne de Flandre. Merci de m'avoir enseigné, notamment au travers des consultations du mercredi matin, votre vision de la prise en charge de la chirurgie du prolapsus génital. Merci pour votre simplicité de contact et votre ouverture d'esprit. Merci d'avoir si souvent trouvé les mots pour me relancer et me remotiver dans ce travail lors des moments les plus difficiles. Ces 2 années passées à Lille ont été un tournant décisif dans ma carrière. J'ose espérer que l'avenir nous permettra encore de poursuivre cette collaboration tellement fructueuse ! Je souhaite également remercier tout particulièrement l'ensemble de l'équipe du CHRU de Lille et en particulier le Docteur Jean-Philippe Lucot, qui m'a si souvent conseillé dans mes premières rédactions d'articles et qui m'a également pris sous son aile protectrice en me transmettant ses compétences chirurgicales. La notion de compagnonage prend tout son sens quand je repense à ces 2 ans passés à Jeanne de Flandre... Merci également à Pierre Collinet, Chrystèle Rubod, Loïc Boulanger et à mes chers compagnons de route du Clinicat Bruno Dedet et Géraldine Giraudet.

Grand merci au Professeur Michelle Nisolle de m'avoir fait confiance dès le début de mon parcours en Gynécologie-Obstétrique. Je me souviens encore avec précision de ma première présentation à l'ESGE sur l'endométriose, alors que je n'étais encore qu'étudiant en médecine... Merci aussi de m'avoir encouragé à poursuivre mes travaux scientifiques dès mon retour du CHRU de Lille et de m'en avoir fourni les moyens. Merci enfin de m'avoir rapidement permis de trouver ma place au sein de l'équipe universitaire de Liège, en favorisant mon autonomie chirurgicale.

Merci à toute l'équipe du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de si bonnes conditions. Merci tout particulièrement au Professeur Agnès Noël pour votre soutien et pour avoir présidé d'une main de maître de mon comité de thèse durant ces 5 années ! Merci à Carine Munaut pour ton aide dans toutes les étapes de ce travail, depuis la première immuno-histochimie jusqu'à la relecture de ce mémoire, ton écoute attentive de mes nombreux "topos" sur l'avancement de mes recherches et pour tes conseils avisés. Merci à Silvia Blacher pour ta vision "digitalisée" des mes coupes histologiques et pour m'avoir fait découvrir une approche différente de l'analyse d'image traditionnelle. Je n'oublierai pas ces nombreuses heures passées à discuter devant l'ordinateur du labo aussi bien de pixellisation que du temps qu'il fait à Barcelone... Merci à Catherine Maillard pour son aide dans l'analyse statistique et dans les illustrations de plusieurs articles repris dans cette thèse. Merci également Isabelle Dasoul, Emilie Feyereisen et Patricia Gavitelli pour leur assistance technique (et morale) dans l'élaboration de ces magnifiques colorations histologiques. Merci au Professeur Betty Nusgens pour ses conseils précieux, sa gentillesse et sa disponibilité durant tout ce travail.

Merci au Professeur Mathias Brieu et à toute son équipe de l'école centrale de Lille pour le support professionnel du versant biomécanique de cette thèse de doctorat. Merci Mathias d'avoir directement perçu le potentiel que les compétences de Liège et de Lille pouvaient engendrer et pour votre indéfectible enthousiasme quand il s'agit de trouver des solutions à des problèmes ou élaborer des hypothèses de travail. Merci à Jean Gilibert et Pauline Lecompte-Grosbras, mais aussi à Bruno Dedet et Boris Gabriel pour avoir fait un succès de ses différentes campagnes de tests biomécaniques!

Je tiens également à remercier l'ensemble des collègues avec qui j'ai travaillé depuis le début de ma spécialisation en Gynécologie-Obstétrique. Je tiens à remercier tout particulièrement les Professeurs Michelle Nisolle et Frédéric Goffin, ainsi que le Docteur Philippe Petit pour leur aide dans la collecte des prélèvements nécessaires à ce travail. Je remercie également l'ensemble des membres du service de Gynécologie-Obstétrique de la Citadelle, qui m'ont si souvent soutenu dans la concrétisation de cette thèse.

Merci au Docteur Frédéric Chantraine pour son soutien, en tant que collègue de bureau et ami. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience de "jeune PhD" et de m'avoir si souvent conseillé et rassuré dans les périodes plus difficiles de ce travail.

Merci aussi aux Professeurs David Waltrégnny, Jan Deprest, Boris Gabriel, Aude Béliard, Agnès Noël, Carine Munaut, Michelle Nisolle, Michel Cosson et Jean-Michel Foidart de me faire l'honneur de lire et d'expertiser ce travail de thèse. Merci d'avoir pu me consacrer du temps dans vos agenda déjà si chargés, comme en témoigne le doodle lancé pour fixer la date de défense de thèse !

Merci à mes parents pour leur aide et leur soutien indéfectible durant toutes mes études, je suis conscient de leur devoir beaucoup. Merci à mes frères et soeurs ainsi qu'à l'ensemble de ma famille.

Enfin, je dédie cette thèse à ma femme Laura et à mes enfants, Romane et Sacha. Jamais je ne pourrais vous remercier comme vous le méritez de m'avoir soutenu dans ce projet ! Merci ma chérie d'avoir été si souvent réconfortante dans les moments difficiles. Merci pour ton courage, ta ténacité et ta force de caractère qui m'ont permis de poursuivre ce travail envers et contre tout!

Abréviations

ARNm	Acide Ribonucléique messenger
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Actin</i>
ATFP	Arc Tendineux du Fascia Pelvien
BMPs	<i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EFW	<i>Elastic fiber width</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FBN	Fibrilline
GSI	<i>Genuine Stress Incontinence</i>
HAS	Haute Autorité de la Santé
HE	Hématoxyline Eosine
HTX	Hystérectomie
IUE	Incontinence Urinaire à l'Effort
kN	kililoNewton
LBDT	Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement
LTBPs	Complexe latent du TGF- β
LOX	Lysyl oxydases
LOXL1-4	Lysyl oxydases-like 1-4
MEC	Matrice Extracellulaire
MMPs	MétalloProtéases Matricielles
Mpa	Megapascal
PGP 9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
POP	<i>Pelvic Organ Prolapse</i>
POP-Q	<i>Pelvic Organ-Prolapse-Quantification</i>
RGB	<i>Red Green Blue</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor- β</i>
TIMPs	Inhibiteur Tissulaire des MétalloProtéases
TVM	<i>Tension free Vaginal Mesh</i>
TVT-O	<i>Tension free Vaginal Tape - Obturator</i>
WHI	<i>Women Health Initiative</i>

1	INTRODUCTION.....	10
1.1	Définition	13
1.2	Epidémiologie	17
1.3	Facteurs de risque	18
1.3.1	Facteurs génétiques.....	19
1.3.2	Facteurs liés à la reproduction	19
1.3.3	Facteurs de dégradation de la statique pelvienne.....	20
1.4	Prise en charge du prolapsus génital	22
1.4.1	Prise en charge conservatrice	22
1.4.2	Prise en charge chirurgicale.....	23
1.5	Histologie de la paroi vaginale	26
1.6	Propriétés biochimiques du tissu conjonctif vaginal	28
1.6.1	Le collagène.....	29
1.6.2	L'élastine	31
1.6.3	Analyse morphométrique de la paroi vaginale.....	34
1.7	Propriétés biomécaniques du tissu vaginal.....	36
1.7.1	Protocole expérimental d'analyse biomécanique	36
1.7.2	Caractérisation des propriétés biomécaniques du tissu vaginal	38
1.7.3	Comportement élastique non linéaire du tissu vaginal	41
1.7.4	Propriétés biomécaniques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital	42
1.7.5	Corrélation entre les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital.....	43
2	BUTS ET PLAN.....	44
3	RESULTATS.....	49
	- Publication n°1 " <i>Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review</i> "	50
	- Publication n°2 " <i>Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse</i> "	63
	- Publication n°3 " <i>Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties?</i> "	80
	- Publication n°4 " <i>Caractérisation biomécanique des ligaments utérins. Implications en statique pelvienne</i> "	88
	- Publication n°5 " <i>Biomechanical properties of Human pelvic organs</i> "	99
	- Publication n°6 " <i>Elastin: the link between biochemical and biomechanical properties of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse?</i> "	108

4	DISCUSSION.....	128
4.1	Analyse histomorphométrique du tissu vaginal.....	130
4.2	Analyse des propriétés biomécaniques du tissu vaginal	132
4.3	Applications en chirurgie du prolapsus génital.....	136
4.4	Principaux axes de recherche - Perspectives.....	138
5	CONCLUSION.....	140
6	ANNEXES.....	142
7	BIBLIOGRAPHIE.....	151

1 Introduction

Le prolapsus génital est une entité pathologique complexe résultant d'un déséquilibre de la statique pelvienne. Sa physiopathologie reste en partie méconnue. Ce travail a pour principal but d'approfondir les connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'apparition d'un prolapsus génital.

Pour permettre une bonne compréhension de cette pathologie, il est indispensable de définir le prolapsus génital, ses critères d'évaluation ainsi que sa prévalence et les facteurs de risques, génétiques et environnementaux. Nous aborderons également sa prise en charge, conservatrice ou chirurgicale, qui a fortement évolué ces dernières années suite aux alertes de la Food and Drug Administration (FDA) et de la Haute Autorité de la Santé (HAS) en matière d'utilisation de prothèses par voie vaginale.

Dans cette introduction, nous décrirons les connaissances actuelles de l'histologie de la paroi vaginale ainsi que les propriétés biochimiques du tissu vaginal, c'est à dire l'organisation structurelle du tissu conjonctif de la paroi vaginale. Nous décrirons les différents constituants de ce tissu comme les collagènes, l'élastine, les cellules musculaires lisses, les vaisseaux ainsi que son innervation. Les modifications des propriétés du tissu vaginal en cas de prolapsus seront abordées pour chacun de ces composants. Nous caractériserons les propriétés biomécaniques du tissu vaginal normal et dans le prolapsus génital afin de mieux comprendre le comportement de ce tissu lorsqu'il est soumis à des contraintes.

Les résultats de nos recherches sur les propriétés biochimiques et biomécaniques seront abordés en présentant les articles publiés dans ce domaine. Enfin, nous discuterons de la corrélation entre les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal dans le cadre du prolapsus génital et des potentielles implications de ces travaux dans le développement de matériaux prothétiques plus « physiologiques ».

1.1 Définition

Le **prolapsus génital** correspond à une saillie, permanente ou à l'effort, de tout ou d'une partie des organes pelviens dans la lumière vaginale.

Les formes anatomiques et le degré de sévérité sont variables, associant dans diverses proportions le prolapsus de l'étage antérieur ou colpocèle antérieure qui contient la vessie (cystocèle), le prolapsus de l'étage moyen qui correspond à l'utérus (hystérocele) ou au fond vaginal (élytrocele) et le prolapsus de l'étage postérieur contenant le rectum (rectocèle) (figure 1).

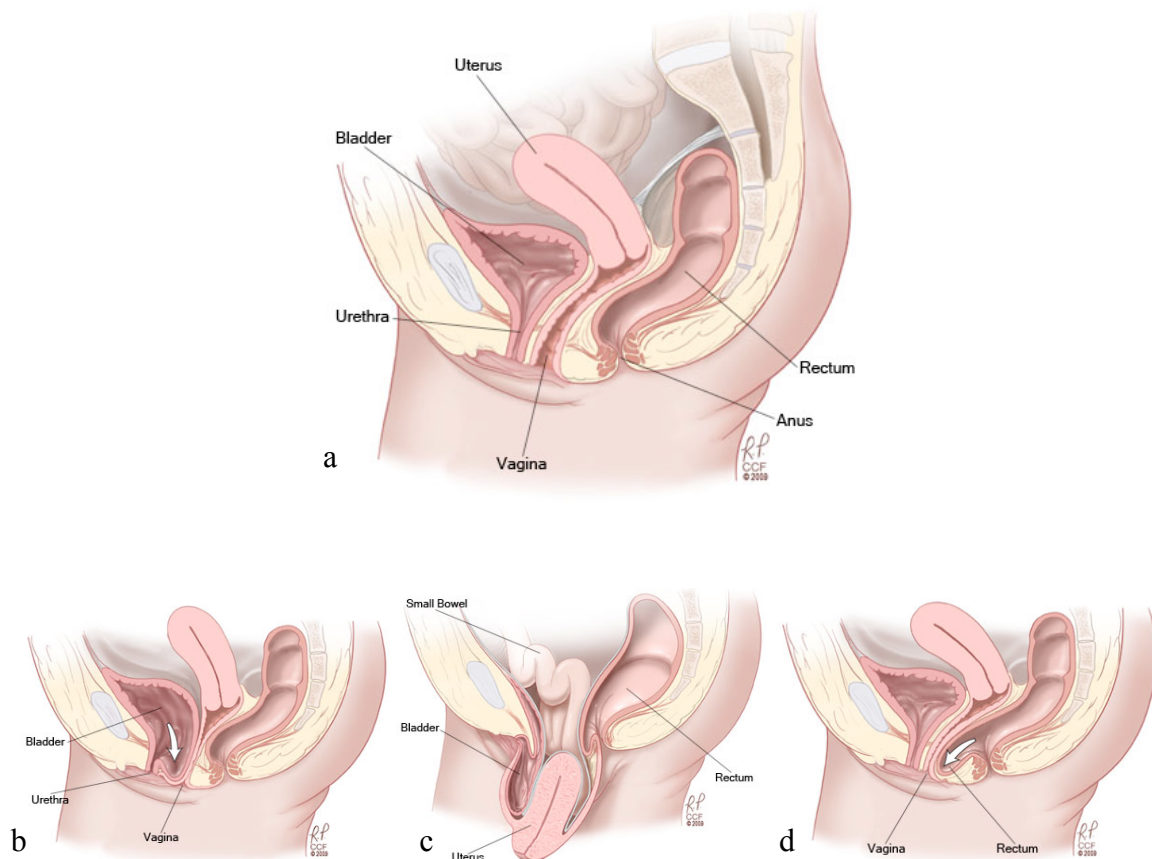


Figure 1: Illustration des différentes formes anatomiques de prolapsus génital. (a) statut pelvien normal, (b) cystocèle, (c) hystérocele, (d) rectocèle (Copyright © 2009 Cleveland Clinic).

Introduction

Le degré de sévérité du prolapsus est, en pratique courante, le plus souvent évalué selon la classification de Baden et Walker. Cette classification définit le stade de prolapsus (de 1 à 4) en fonction de la localisation des organes pelviens par rapport à la vulve [1].

Depuis 1996, une classification plus standardisée reprenant plusieurs mesures appliquées à certains points de repères anatomiques par rapport à l'hymen (Pelvic Organ Prolapse Quantification, POP-Q) est utilisée pour homogénéiser la terminologie de l'évaluation anatomique du prolapsus génital [2,3] (figure 2 et tableau 1). Cette classification, quoique plus complexe, permet de rendre réalisable une évaluation des techniques chirurgicales et des études comparatives

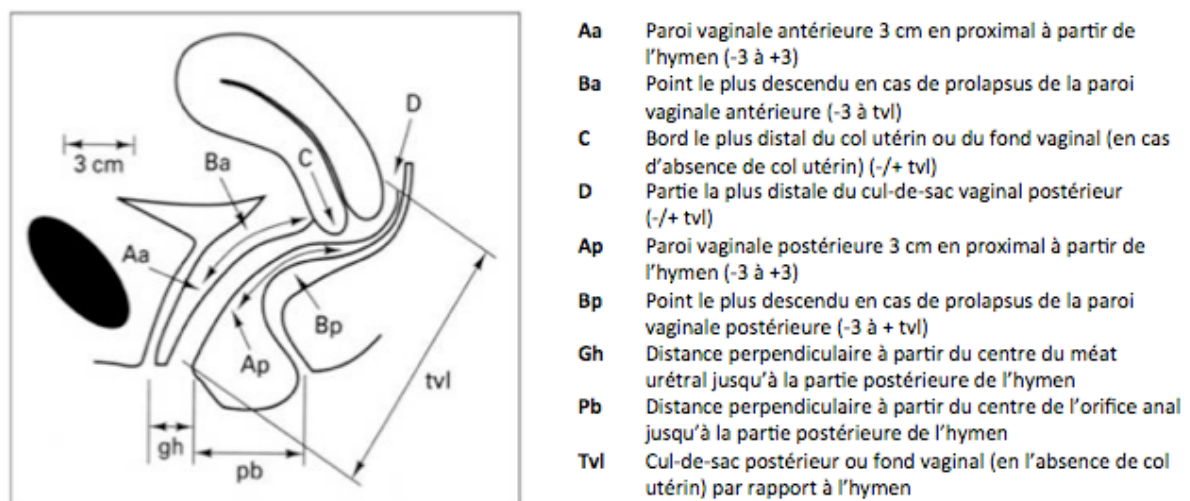


Figure 2. Aperçu anatomique du système de quantification POP-Q.

Stade 0	Aucun des compartiments ne présente d'affaissement
Stade 1	Affaissement du compartiment le plus descendu entre soutènement parfait et -1 cm ou +1 cm en proximal par rapport à l'hymen
Stade 2	Affaissement du compartiment le plus descendu entre - 1 cm et +1 cm
Stade 3	Affaissement du compartiment le plus descendu entre -2 cm et (tvI - 2cm)
Stade 4	Affaissement du compartiment le plus descendu à partir de (tvI - 2cm) jusqu'à la descente totale

Tableau 1. Les 5 stades du POP-Q utilisés pour mesurer le degré de soutènement des organes du plancher pelvien.

Les troubles de la statique pelvienne se définissent par l'ensemble des troubles de la localisation des organes pelviens entraînant une ptose de ceux-ci et/ou des troubles fonctionnels. Ils sont liés à une défaillance des systèmes de soutènement et de suspension des organes pelviens de la femme.

En effet, la statique pelvienne de la femme est gérée par un système dont l'intégrité est essentielle pour assurer un équilibre correct : un système suspensif constitué de structures ligamentaires, un système cohésif composé des fascia et un système de soutènement, musculaire, formé des muscles élévateurs de l'anus [4]. Le vagin représente la clé de voûte de l'équilibre pelvi-périnéal. Les travaux anatomiques de DeLancey ont permis de distinguer 3 niveaux dont l'altération est impliquée dans les troubles de la statique pelvienne (figure 3) [5-7].

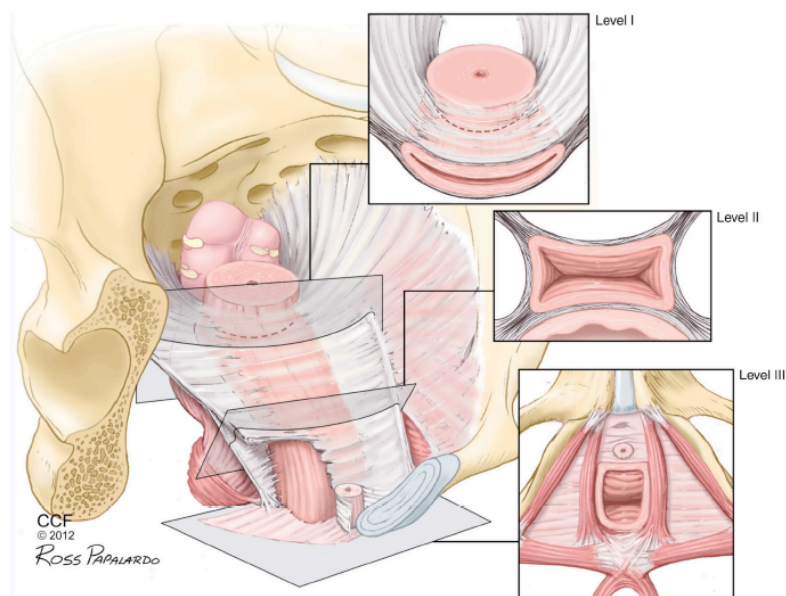


Figure 3. Les niveaux et les moyens de fixité selon DeLancey.

Le niveau I représente le tiers supérieur du vagin qui est soutenu par les ligaments cardinaux et les ligaments utéro-sacrés. Une lésion de ce système suspenseur peut induire une hystérocèle ou un prolapsus du fond vaginal post-hystérectomie. La portion moyenne du vagin (niveau II) est amarrée latéralement à l'arc tendineux du fascia pelvien (ATFP) et à la partie supérieure de l'arc tendineux de l'élévateur de l'anus. Le vagin est ainsi maintenu transversalement entre la vessie et le rectum. De plus, la vessie est supportée par le fascia pubocervical formé de la paroi vaginale antérieure et de ses connexions avec le fascia

pelvien tandis que le rectum est quant à lui supporté par le fascia rectovaginal. Ces fascias ont des insertions latérales communes et des lésions à ce niveau peuvent expliquer la formation d'une cystocèle ou d'une rectocèle. On distingue donc, selon le type et la topographie du défaut constaté, les **défauts médians** qui désignent une faiblesse de la partie médiane du tissu conjonctif vaginal et les **défauts latéraux** qui correspondent à une désinsertion du fascia au niveau de la ligne blanche. Le niveau III correspond à la fusion entre le tiers inférieur du vagin, la membrane périnéale et le corps périnéal.

Aux différentes variétés anatomiques de prolapsus se superposent sans parallélisme des troubles fonctionnels urinaires ou ano-rectaux qui peuvent être le motif principal de consultation. Le prolapsus génital est associé à des troubles de la continence urinaire dans plus de 72% des cas [8]. La plainte urinaire la plus fréquemment associée au prolapsus de stade modéré est l'incontinence urinaire à l'effort (IUE) car la perte du soutènement de la paroi vaginale antérieure ou du fond vaginal peut entraîner des répercussions sur la fonction vésicale et urétrale. En cas de prolapsus plus sévère, des difficultés de vidange vésicale peuvent apparaître, par coudure de l'urètre, entraînant des symptômes d'obstruction vésicale. D'un point de vue ano-rectal, la manifestation la plus fréquemment associée au prolapsus est la constipation [9].

Il est important de noter qu'il existe une mobilité physiologique des organes pelviens et que ceux-ci sont soumis à des sollicitations mécaniques dont la valeur est difficile à quantifier, que ce soit en position debout, lors d'activités physiques ou durant différentes fonctions physiologiques. Ces changements physiologiques rendent encore plus complexes la compréhension de ce système et le rôle de chacun de ces constituants dans la statique pelvienne.

Ces troubles de la statique pelvienne peuvent avoir un impact important sur la qualité de vie des patientes, car ils peuvent entraîner une modification de l'image corporelle et de l'estime de soi et interférer ainsi avec la vie sociale, la sexualité et l'activité physique [10]. La prise en charge des prolapsus génitaux est un enjeu majeur dans notre société car sa prévalence est importante et ne pourra que s'accroître avec le vieillissement de la population.

1.2 Epidémiologie

Bien que le prolapsus génital soit une des principales indications de chirurgie en gynécologie, sa prévalence exacte est difficile à évaluer et ce pour plusieurs raisons :

- l'utilisation de systèmes de classifications pour évaluer le degré de prolapsus peut être différent d'une étude à l'autre (Baden et Walker, POP-Q)
- les taux de prolapsus rapportés dans ces études diffèrent selon que les patientes évaluées soient symptomatiques ou asymptomatiques.
- La difficulté de quantifier le nombre de patientes qui présentent un prolapsus et qui ne consultent pas pour ce motif.
- Il n'existe pas de lien direct entre le degré de prolapsus et la symptomatologie.

A l'heure actuelle, aucune étude épidémiologique de population de grande échelle n'a été réalisée pour évaluer la prévalence du prolapsus génital [11].

On observe des troubles de la statique pelvienne chez 43 à 76% des patientes consultant en gynécologie de routine, dont 3 à 6% qui présentent un prolapsus extériorisé [12,13].

Selon l'étude de la Women Health Initiative (WHI), 41% des patientes âgées de 50 à 79 ans présentent un certain degré de prolapsus génital, correspondant à une cystocèle dans 34% des cas, une rectocèle dans 19% des cas et une hystéroptose dans 14% des cas [14]. Aux Etats-Unis, on estime que 50% des parturientes présentent un certain degré de prolapsus [15].

Le risque d'intervention chirurgicale pour prolapsus génital au cours de sa vie chez une patiente âgée de 80 ans est de l'ordre de 7% [16]. Le pic d'incidence se situe entre 60 et 69 ans (42.1 pour 10000 femmes). Toutefois, 58% des procédures sont réalisées chez des patientes âgées de moins de 60 ans [17].

On estime que 13% des patientes opérées pour prolapsus nécessiteront une seconde opération dans les 5 ans [16]. De plus, 30% des patientes opérées par des techniques traditionnelles n'utilisant pas de matériel prothétiques présenteront une récurrence au cours de leur vie [16]. Ces chiffres démontrent donc l'impact majeur que cette pathologie peut représenter en terme de Santé Publique.

1.3 Facteurs de risque

Le prolapsus génital est une pathologie multifactorielle qui résulte d'une combinaison de plusieurs facteurs de risque, présents en proportions variables d'une patiente à l'autre [18]. L'accouchement par voie basse, le vieillissement et l'obésité sont les principaux facteurs de risque de survenue du prolapsus.

Les déterminants des troubles de la statique pelvienne peuvent être divisés en 3 classes [19] (tableau 2) :

- Les déterminants de cause génétique susceptibles d'interférer avec le développement et la croissance normale du tissu conjonctif de soutien
- Les facteurs liés à la reproduction
- Les facteurs acquis de dégradation de la statique pelvienne

Facteurs de prédisposition	Facteurs génétiques HOXA11 Laminin γ1 (LAMC1) Lysyl oxydase-like 1 (LOXL1); fibulin-5; fibulin-3 Skeletal muscle heavy-chain polypeptide 3 (MYH3) Myosin binding protein H (MyBP-H) Facteurs nutritionnels
Facteurs liés à la reproduction	Facteurs de prédisposition foeto-maternel Multiparité Macrosomie foetale Facteurs obstétricaux (neuropathie pudendale) Augmentation de la durée de la 2e phase du travail Utilisation des forceps Présentation défléchie ou présentation du siège Déchirures périnéales
Facteurs de dégradation de la statique pelvienne	Vieillessement Ménopause Obésité et hypotonies abdominales Constipation chronique Pathologies pulmonaires chroniques (asthme, BPCO,...) Diabète Tabac Corticothérapie systémique Anomalies de courbure du rachis Chirurgie pelvienne (hystérectomie,...) Hyperpression abdominale chronique (haltérophilie,...)

Tableau 2 : Principaux déterminants des prolapsus génitaux, d'après Trémolières [19].

1.3.1 Facteurs génétiques

La grossesse et l'accouchement par voie basse sont considérés comme des déterminants majeurs du développement d'un prolapsus mais ces facteurs ne peuvent expliquer à eux seuls l'étiologie et la progression de troubles de la statique pelvienne. En effet, des femmes nullipares peuvent également présenter un prolapsus lié à une prédisposition génétique [20]. Il est actuellement bien établi que les patientes souffrant du syndrome de Marfan, du syndrome d'Ehlers-Danlos ou du cutis laxa ont un risque plus élevé de présenter un prolapsus génital ou une incontinence urinaire à l'effort, suggérant que ces anomalies des tissus conjonctifs pelviens participent à la pathogénèse du prolapsus génital [21].

Le collagène et l'élastine sont les principaux éléments fibrillaires qui constituent la matrice extracellulaire (MEC) des tissus conjonctifs pelviens. Des altérations de la synthèse et/ou de la dégradation des ces fibres collagènes et d'élastine sont associés à l'apparition d'un prolapsus génital [22-25]. L'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans le déséquilibre de l'homéostasie de la MEC aboutissant au prolapsus provient de l'étude des souris knockout. Plusieurs protéines ont été incriminées dans la pathogénèse du prolapsus génital, dont les protéines impliquées dans la formation de la MEC (Bone Morphogenic Protein 1, la famille des lysyl oxydases, les fibulines, fibrillines et laminines),. Par ailleurs, les molécules qui jouent un rôle dans le catabolisme et le remodelage de la MEC (les MMPs et leurs inhibiteurs TIMPs, les élastases, certains neutrophiles, les inhibiteurs de l'alpha-1 antitrypsine et les cathepsines). Nous aborderons plus en détail les principaux mécanismes qui aboutissent à ce déséquilibre du métabolisme du collagène et de l'élastine dans le chapitre sur les propriétés biochimiques du tissu vaginal.

1.3.2 Facteurs liés à la reproduction

La multiparité et les traumatismes obstétricaux sont des déterminants majeurs de développement d'un prolapsus génital. Selon l'Oxford Family Planning Study, l'augmentation du nombre d'accouchements par voie basse est le principal facteur de risque de survenue d'un prolapsus chez une femme de moins de 60 ans [26]. Comparativement aux patientes nullipares, le risque relatif de développer un prolapsus est de 8.4 pour une femme ayant 2 enfants et de 10.9 pour une femme ayant 4 enfants ou plus. Par contre, la césarienne ne peut pas être considérée comme une méthode préventive contre la survenue d'un prolapsus

[27]. L'accouchement par césarienne peut réduire le risque de prolapsus mais ne le prévient pas totalement. Certaines études montrent que la grossesse en elle-même représente un facteur de risque de troubles de la statique pelvienne [28]. Une étude a évalué l'impact de la grossesse chez des patientes nullipares par rapport à des femmes non enceintes et a montré la présence d'un prolapsus de stade II dans 24 à 40% des cas alors qu'aucune femme du groupe témoin ne présentait de prolapsus [29].

D'autres facteurs de risque obstétricaux ont aussi été incriminés comme l'utilisation de forceps et, dans une moindre mesure, comme le poids de naissance au delà de 4 kg, une augmentation de la durée de la 2^e phase du travail et un âge inférieur à 25 ans au moment du premier accouchement [12,30].

1.3.3 Facteurs de dégradation de la statique pelvienne

Les facteurs obstétricaux sont étroitement associés au prolapsus génital. Cependant, les troubles de la statique pelvienne n'apparaissent que bien après l'accouchement et la plupart des femmes qui ont accouché ne présenteront pas de prolapsus symptomatique. L'incidence et la prévalence du prolapsus génital augmentent avec le vieillissement [31]. Selon la WHI, les femmes de 60-69 ans (odds ratio 1 . 2) et de 70-79 (odds ratio 1 . 4) ont plus de risque de présenter un prolapsus que les femmes de 50- 59 ans [14]. La chirurgie du prolapsus est très rare chez des femmes de moins de 30 ans et de plus de 80 ans et son incidence augmente régulièrement dans l'intervalle [16].

L'obésité est un facteur important de risque de développement d'un prolapsus génital. Les femmes en surcharge pondérale (BMI 25-30 kg/m²) et obèses (BMI > 30 kg/m²) présentent un risque 2 fois plus élevé de prolapsus [16,12]. La régression des troubles de la statique pelvienne en cas de perte de poids importante reste encore controversée mais il semble que la chirurgie bariatrique pourrait avoir un effet favorable [32].

L'hystérectomie peut augmenter le risque de prolapsus génital, bien que le développement de ce prolapsus apparaisse bien plus tardivement après cette procédure [26,30]. Dans l'Oxford Family Planning Study, l'incidence de chirurgie pour prolapsus est de 29/1000 femmes-années dans le groupe hystérectomie contre 16/1000 femmes-années dans la

population générale [26]. Ce risque est plus élevé en cas d'hystérectomie pour prolapsus (158/1000 femmes-année). Par contre, dans l'étude WHI, la prévalence de prolapsus était plus élevée chez les patientes non-hystérectomisées par rapport aux patientes présentant un antécédent d'hystérectomie [14]. Ce résultat contradictoire pourrait s'expliquer par la réalisation d'une cure de prolapsus dans le même temps opératoire que l'hystérectomie.

L'histoire familiale joue probablement un rôle dans la prédisposition à développer un prolapsus. Une étude portant sur le registre national des jumeaux suédois a comparé les jumeaux mono- et dizygotes du même sexe et a évalué à 40% l'influence de la prédisposition génétique sur le développement d'un prolapsus et d'une IUE, tout en précisant que les facteurs environnementaux influencent également la survenue d'un prolapsus selon un même ordre de grandeur [33]. Dans une autre étude de cohorte, le risque de prolapsus est augmenté de 1.4 en cas d'histoire familiale de prolapsus et/ou d'hernie [27].

L'origine ethnique peut également influencer l'incidence du prolapsus génital. Par rapport à la population caucasienne, les femmes d'origine africaine ont un risque moindre tandis que les femmes originaires d'Asie ou d'Amérique latine ont un risque plus élevé de développer un prolapsus génital [14].

La ménopause est fréquemment citée comme un facteur de risque de prolapsus mais la plupart des études sur le sujet n'ont pas permis de déterminer un lien entre le statut hormonal et les troubles de la statique pelvienne [11]. Dans un sous-groupe de patientes de l'étude WHI qui ne présentaient pas d'antécédent d'hystérectomie et qui étaient randomisées traitement hormonal vs placebo, on n'observait pas de différence significative en terme de survenue de prolapsus [14]. Le rôle du traitement hormonal de substitution reste par contre très controversé et la plupart des études n'ont pas démontré d'association entre THS et prolapsus [34-36].

D'autres facteurs de risque qui entraînent des contraintes répétitives abdominales peuvent aussi jouer un rôle dans le développement du prolapsus comme la constipation chronique, l'exercice physique intensif ou l'activité professionnelle nécessitant le port de charges lourdes [37-39]. Le tabagisme et la bronchite chronique obstructive peuvent également être des facteurs contributifs sans pour autant être des facteurs déterminants [34,40].

1.4 Prise en charge du prolapsus génital

Le traitement du prolapsus génital dépend fortement de la symptomatologie présentée par la patiente. Cette symptomatologie peut se traduire par des plaintes liées au prolapsus génital (pesanteur pelvienne, gêne vaginale) ou par des symptômes en relation avec une dysfonction urinaire, ano-rectale ou sexuelle. Les différentes options de prise en charge seront proposées en fonction du degré de sévérité du prolapsus et de son impact sur la qualité de vie des patientes. Dans certains cas, une simple surveillance peut être proposée si la patiente présente un prolapsus génital de stade III ou IV bien toléré sur le plan symptomatique et si elle ne souhaite pas de traitement. En effet, il n'y a pas de lien direct entre le degré de sévérité du prolapsus et sa symptomatologie. Le choix du type de prise en charge s'efforcera de tenir compte des attentes de la patiente quant à l'impact du traitement ou de l'absence de traitement sur sa qualité de vie.

La prise en charge du prolapsus génital consiste principalement en des traitements conservateurs (de type pessaire ou rééducation périnéale) ou chirurgicaux. Les traitements chirurgicaux sont réalisés par voie vaginale (avec ou sans utilisation de prothèses transvaginales) ou par voie abdominale, le plus souvent par promontofixation coelioscopique.

1.4.1 Prise en charge conservatrice

Les traitements conservateurs sont souvent la première ligne de prise en charge du prolapsus génital. Le traitement chirurgical étant par définition associé à des risques de complication ou de récurrence. Toutefois, le prolapsus étant typiquement une pathologie chronique, de nombreuses patientes préféreront la chirurgie au traitement conservateur.

En cas de prise en charge non-chirurgicale, notamment si la patiente est âgée de plus de 65 ans et présente des comorbidités sévères ou simplement si elle refuse un traitement chirurgical, l'utilisation d'un pessaire peut être recommandée. Il existe une grande variété de pessaires de différentes formes, les plus fréquemment utilisés étant les pessaires anneaux ou cubes. Leur utilisation nécessite une bonne oestrogénisation de la muqueuse vaginale chez les femmes ménopausées ainsi que des mesures d'hygiène strictes afin d'éviter des

infections ou des ulcérations. Les pessaires peuvent aussi être utilisés à titre de test thérapeutique pré-chirurgical pour évaluer les résultats attendus d'une correction chirurgicale et son impact sur la continence urinaire.

La rééducation périnéale peut également améliorer les symptômes associés au prolapsus génital mais son impact réel est difficile à déterminer car les études dans ce domaine sont souvent basées sur un petit nombre de patientes [41]. La rééducation peut soulager efficacement la symptomatologie liée au prolapsus et peut constituer un atout supplémentaire en cas de problèmes mictionnels, ano-rectaux ou sexuels associés.

1.4.2 Prise en charge chirurgicale

La prise en charge chirurgicale du prolapsus génital a fortement évolué ces dernières années depuis l'apparition des techniques de mise en place de prothèses par voie vaginale et plus récemment par une actualisation des recommandations de l'utilisation de ces prothèses suite aux alertes de la FDA et de l'HAS [42,43].

Traditionnellement, la voie d'abord privilégiée est la voie vaginale qui représente 80 à 90% des interventions pour prolapsus [16]. La voie vaginale a l'avantage de durées opératoires inférieures à celles de la voie haute et d'une reprise d'activité plus rapide [44]. Cependant, les techniques chirurgicales conventionnelles s'accompagnent d'un taux de récurrence de l'ordre de 30% ce qui a motivé l'utilisation de matériel de renfort prothétique par voie vaginale [16,45]. Dès le début des années 2000, le groupe « TVM (Tension free Vaginal Mesh) » composé de 9 chirurgiens français expérimentés en statique pelvienne (dont les Professeurs Bernard Jacquetin et Michel Cosson) a mis au point une technique très standardisée de traitement du prolapsus par prothèse antérieure transobturatrice et postérieure transpérinéale [46]. Plusieurs études ont démontré sa faisabilité et son efficacité pour des taux de complications acceptables dans des équipes expérimentées [47-49]. L'apparition de cette technique a considérablement modifié la pratique chirurgicale à l'échelle mondiale.

Toutefois, l'utilisation de prothèses synthétiques par voie vaginale est associée à un risque de complications spécifiques (érosion prothétique vaginale, vésicale ou rectale, infection prothétique, rétraction prothétique douloureuse) ou non spécifiques comme pour toute chirurgie vaginale du prolapsus (dyspareunie, incontinence urinaire de novo, douleurs pelviennes, plaie vésicale ou rectale peropératoire, hématome) [50]. En 2012, nous avons publié une étude rétrospective reprenant les taux de réintervention de 524 patientes opérées d'un prolapsus génital par prothèses transvaginales (Prolift®) [51] (**annexe 1**). Cette étude a montré que le taux de réintervention global étaient de 11.6%, avec un suivi médian de 3 ans. Les indications de réopération sont principalement l'incontinence urinaire à l'effort (6.9%), les complications liées à l'utilisation de prothèses (3.6%) ou les récives (3%) et sont relativement faibles dans une équipe expérimentée.

La généralisation de l'utilisation des prothèses a provoqué une augmentation du nombre de complications spécifiques qui ont alerté l'HAS dès 2007, aboutissant à des recommandations restrictives dans l'utilisation des prothèses par voie vaginale, principalement en deuxième intention après un échec de traitement chirurgical antérieur ou risque élevé de récive [43]. En juillet 2011, la FDA a publié une alerte pour évènements indésirables graves qui a une nouvelle fois entraîné des répercussions importantes dans la pratique chirurgicale du prolapsus [42]. Premièrement par la recrudescence des procès aux Etats-Unis de patientes porteuses de prothèses vaginales. Deuxièmement par l'arrêt de la commercialisation des prothèses Prolift® de la firme Ethicon [52]. Ces récentes alertes de l'HAS et de la FDA et les résultats de la méta-analyse de la Cochrane review de 2010 ont abouti à l'émission de nouvelles recommandations des principales sociétés savantes anglo-saxonnes et francophones d'urogynécologie [50] ainsi qu'à l'élaboration d'une terminologie et d'une classification des complications liées à l'utilisation de prothèses en chirurgie du prolapsus génital [53].

D'après la Cochrane review actualisée en 2013, la promontofixation coelioscopique présente de meilleurs résultats par rapport à différentes procédures vaginales, notamment la sacrospinofixation de Richter ou la mise en place de prothèses transvaginales en cas de prolapsus utérin ou du fond vaginal après hystérectomie [54]. Cependant, ces effets bénéfiques doivent être mis en balance avec l'augmentation de la durée de procédure, du

délai de reprise des activités et des coûts plus élevés de la promontofixation par rapport à la voie vaginale.

En cas de traitement des cystocèles par voie vaginale, l'utilisation de prothèses synthétiques réduit les risques de symptômes du prolapsus et diminue le risque de récurrence par rapport à la chirurgie traditionnelle. Toutefois, une augmentation de la durée opératoire, des taux de prolapsus du compartiment apical ou postérieur, d'incontinence urinaire de novo ou de réintervention pour érosion est observée en cas d'utilisation de prothèses.

En cas de traitement des rectocèles par voie vaginale, la mise en place d'une prothèse ne diminue pas le risque de récurrence et n'est pas recommandée en première intention.

En conclusion, la promontofixation devient l'intervention de référence du traitement du prolapsus utérin ou du fond vaginal chez la femme jeune [54]. L'utilisation des prothèses par voie vaginale pour le traitement des cystocèles n'est pas justifiée en première intention et peut être une option raisonnable en cas de cystocèle récurrente ou en cas de large cystocèle extériorisée. Par contre, la mise en place d'une prothèse postérieure n'est pas recommandée en cas de rectocèle en dehors de quelques situations particulières (rectocèle récurrente essentiellement) [50].

La prise en charge chirurgicale dépend donc de plusieurs critères de choix dont l'âge, le type de prolapsus, les comorbidités et le caractère récurrent. L'équipe du Professeur Michel Cosson a récemment publié une stratégie chirurgicale illustrée dans le tableau 3 [55].

PRINCIPALES INDICATIONS DES TECHNIQUES CHIRURGICALES DE TRAITEMENT DU PROLAPSUS VAGINAL RETENUES DANS NOTRE SERVICE (grade de Baden et Walker)		
Femme jeune avec désir de grossesse		Plicature sous-vésicale/Richardson
Femme < 50 ans		PF coelioscopique
Femme entre 50 et 60 ans	<i>Selon état général, comorbidité, taille de la cystocèle, présence d'un défaut latéral, activité sportive</i>	Promontofixation coelioscopique ou voie basse (si cystocèle prédominante ou défaut latéral, préférer voie basse avec prothèse)
Femme > 60 ans	<i>Prolapsus grade 2</i>	HV, Campbell, Richter, périnéorraphie postérieure
	<i>Prolapsus grade 3/4</i>	Prothèses par voie vaginale
Prolapsus récurrent	<i>Après voie basse sans prothèse</i>	Techniques prothétiques par coelioscopie (PF) ou voie basse, selon âge, état général, etc.
	<i>Après chirurgie prothétique</i>	Utiliser une voie d'abord différente
PF : promontofixation HV : hystérectomie vaginale		

Tableau 3 : Principales indications des techniques chirurgicales du traitement du prolapsus génital retenues dans le service de Chirurgie gynécologique de l'Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France [55].

1.5 Histologie de la paroi vaginale

Le vagin est un canal fibromusculaire composé de quatre couches (figure 4).

- un épithélium pavimenteux pluristratifié non kératinisé (malpighien)
- une couche sous-épithéliale, la lamina propria, correspondant à du tissu conjonctif dense composé principalement de collagène et d'élastine, richement vascularisé principalement par des veines et veinules et contenant relativement peu de fibroblastes.
- une couche musculaire composée de faisceaux de cellules musculaires lisses disposés en couches mal définies, circulaires internes et longitudinales externes, et entourés de tissu conjonctif.
- une couche conjonctive lâche externe appelée adventice contenant des fibres élastiques, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des groupes de cellules ganglionnaires.

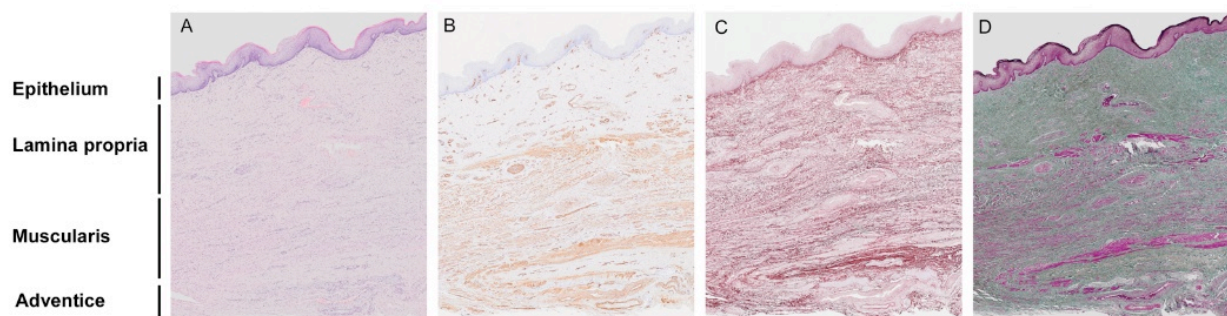


Figure 4 : Histologie du tissu vaginal d'une patiente présentant un prolapsus génital. La paroi vaginale est constituée de 4 couches : épithélium et lamina propria (muqueuse vaginale), muscularis et adventice. (A) Coloration à l'hématoxyline éosine, (B) Immuno-marquage par l' α -SMA, (C) Coloration des fibres élastiques à l'orcéine, (D) Coloration au Trichrome de Masson (grossissement x10). (LBTD, données personnelles).

Les couches sous-épithéliale et musculaire forment une couche fibromusculaire sous l'épithélium vaginal, apportant une grande solidité à la paroi vaginale [5]. Plusieurs auteurs ont étudiés l'histologie du « fascia endopelvien pubocervical » utilisé par les chirurgiens lors de colporraphies et il semble que ce fascia n'existe pas comme un tissu à proprement parler mais représente plutôt la composante fibromusculaire des couches musculaire et adventitielle [56,57].

L'analyse histologique de ce fascia pubocervical peut avoir des implications directes dans la prise en charge chirurgicale des cystocèles. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, les cystocèles médianes sont secondaires à une dégradation du tissu conjonctif de ce même fascia [57] tandis que les cystocèles latérales correspondant à une désinsertion de ce fascia par rapport à l'arc tendineux du fascia pelvien (ATFP). Le traitement chirurgical de ces 2 types de défauts est très différent et consistera en une colporraphie antérieure en cas de cystocèle médiane ou une réparation paravaginale en cas de cystocèle latérale.

L'étude des propriétés histomorphométriques des différentes couches de ce tissu vaginal et l'amélioration de la compréhension des remaniements de ces régions plus fragilisées peuvent permettre d'améliorer la prise en charge chirurgicale de ce type de prolapsus par réparations plus ciblées, à une époque où l'utilisation des prothèses est remise en question.

Notons toutefois que ces considérations concernent principalement les atteintes vaginales localisées au niveau II selon DeLancey [5], correspondant aux lésions du vagin et des fascias pubocervical ou rectovaginal [4]. Ce niveau d'atteinte ne peut expliquer à lui seul l'ensemble des prolapsus génitaux, qui résultent le plus souvent d'un déséquilibre, à des degrés divers, des systèmes de suspension, de cohésion et de soutènement. Nous avons donc favorisé une approche globale du prolapsus génital en étudiant le comportement biomécanique des différentes structures impliquées dans la statique pelvienne.

1.6 Propriétés biochimiques du tissu conjonctif vaginal

Les tissus conjonctifs sont constitués en proportion variable de cellules séparées par la matrice extracellulaire qui est formée de fibres de collagène, d'élastine et de constituants non fibrillaires correspondant à la substance fondamentale. Les éléments cellulaires sont principalement des fibroblastes. Ils présentent un aspect en faisceau et sont riches en organites nécessaires à la synthèse des constituants fibrillaires et non fibrillaires de la matrice extracellulaire. La substance fondamentale est une substance homogène qui occupe les espaces compris entre les fibres et les cellules du tissu conjonctif. Elle contient des glycoprotéines, des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes associés à l'acide hyaluronique.

Les principaux constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire du vagin sont les collagènes I, III, V et l'élastine. Ces fibres contribuent majoritairement au comportement biomécanique du tissu vaginal. Les fibres collagènes sont très rigides et présentent une grande résistance aux contraintes mécaniques tandis que l'élastine confère élasticité et résilience au tissu.

La matrice extracellulaire est en remodelage constant et son homéostasie dépend de l'équilibre entre synthèse et dégradation par les métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont elles mêmes contrôlées par des activateurs et des inhibiteurs (TIMPs). Ces activités sont modulées par des médiateurs solubles comme les facteurs de croissances et leurs récepteurs ainsi que par des signaux provenant de la MEC elle-même reconnues par des récepteurs transmembranaires appelés intégrines. Ces interactions cellules-matrice sont de puissants régulateurs du phénotype des cellules et de leur activité métaplasique. Ces mécanismes participent à la dégradation des tissus conjonctifs de la paroi vaginale.

1.6.1 Le collagène

Les fibres collagènes sont les protéines les plus abondantes de la matrice extracellulaire. Ces fibres sont considérées comme très rigides et faiblement déformables et confèrent au tissu vaginal une résistance mécanique élevée à l'étirement [58]. Elles peuvent atteindre des déformations avant rupture de l'ordre de 10% [59].

Les collagènes sont synthétisés sous forme de précurseur, le procollagène. L'unité de base des procollagènes est un polypeptide qui consiste en une séquence répétée (glycine – X – Y)_n où X est souvent la proline et Y l'hydroxyproline. Les fibres de procollagène sont formées dans le réticulum endoplasmique puis sont soumises à des modifications post-translationnelles telles que l'hydroxylation des résidus proline et lysine, la glycosylation des hydroxylysines. Trois chaînes alpha identiques ou parentes s'assemblent pour former une triple hélice qui est stabilisée par des liaisons hydrogènes et des ponts disulfures. La triple hélice alpha est ensuite sécrétée dans l'espace extracellulaire où des enzymes clivent les 2 terminaux amino- et carboxy- propeptides, permettant la formation de collagène mature. Ces molécules de collagène s'associent entre elles pour former des fibrilles. Les fibrilles de collagène s'agrègent pour former les fibres de collagène qui seront stabilisées par des liaisons croisées et présentent des propriétés remarquables de résistance mécanique (figure 5).

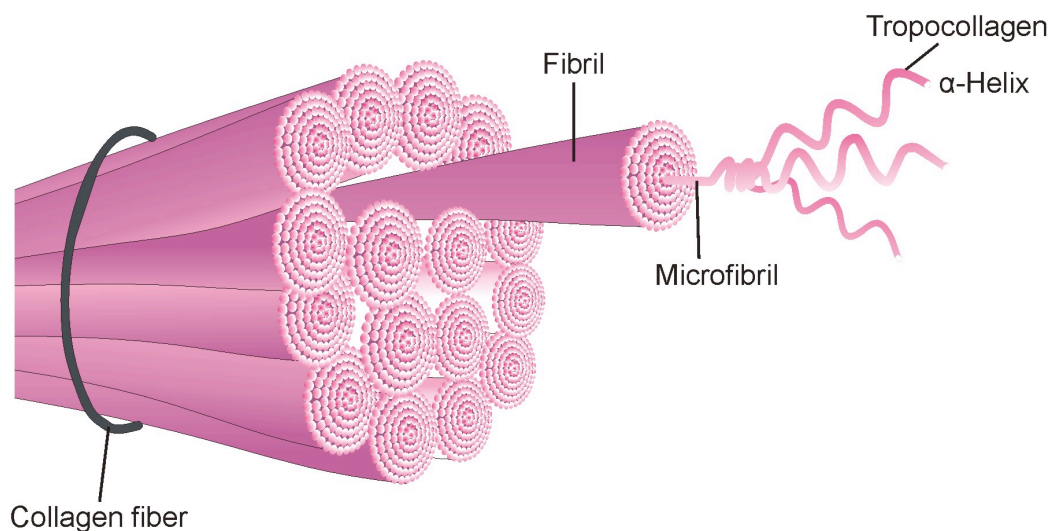


Figure 5 : Structure du collagène. La triple hélice de collagène (tropocollagène) polymérise pour former des microfibrilles puis des fibrilles qui s'organisent en faisceaux (fibres collagènes) progressivement stabilisées par des cross-link dépendant de l'activité de lysyloxidase (LOX). (LBTD, données personnelles).

Les collagènes I, III et V sont les principaux sous-types présents dans la paroi vaginale. Le collagène I forme de larges fibres et faisceaux responsables de la résistance mécanique du tissu (figure 6). Ce sous-type est abondant dans la peau, les ligaments, les tendons et les os. Le collagène III forme des fibres de plus petit calibre et se retrouvent dans les organes mobiles ou soumis à des étirements cycliques comme les vaisseaux sanguins [60]. Le collagène de type I confère au tissu sa solidité tandis que le collagène III contribue à son élasticité. Le collagène V forme des fibres de faible résistance, son rôle est encore imprécis. Il est présent en moindre quantité dans les tissus vaginaux. Les collagènes I, III et V copolymérisent entre eux pour former des fibrilles. Le collagène V forme le noyau de la fibrille et est entouré de copolymères de collagène I et III. La proportion de chacun des sous-types détermine la taille des fibres ce qui influence le comportement biomécanique du tissu [61,62].

Plusieurs études ont analysé par immuno-histologie les modifications du tissu conjonctif vaginal dans le cadre du prolapsus génital [24]. Ces études ont souvent été réalisées à partir de populations de patientes souvent différentes en âge ou en statut ménopausique. Les biopsies vaginales ont également été réalisées dans différentes régions du vagin, en utilisant des protocoles de colorations ou d'immuno-histochimies très variables (Weigert Van Gieson, Trichrome de Gomori, Picrosirius). De plus, ces études utilisent différentes méthodes d'analyses (microscopie optique, confocale, immunofluorescence), le plus souvent subjectives par quantification visuelle, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. Certaines de ces études tendent à montrer une augmentation de la quantité totale de collagène [63,64], d'autres n'observent pas de différence significative [65,66]. Plusieurs équipes ont également analysé les sous-types de collagène et observent une diminution significative du collagène III [65,67] alors que d'autres constatent une expression plus élevée de ce même collagène III [68].

Ces résultats conflictuels illustrent la difficulté et la nécessité de réaliser des études analysant de manière standardisée les prélèvements d'une même région, sous contrôle histologique préalable, utilisant des méthodes de quantification validées, pour des populations de patientes d'âge et de statut ménopausique équivalents.

1.6.2 L'élastine

Les fibres élastiques (0.1 à 1 μ m) sont les éléments clés de l'architecture des tissus conjonctifs qui sont sujets à des contraintes mécaniques. Ces fibres sont de faible rigidité et ont de grandes capacités à se déformer sans se rompre [58]. L'élastine présente une déformation limite de 150% qu'elle ne peut dépasser sans se rompre [69]. Dans sa conformation naturelle, libre d'effort et de déformation, l'élastine s'organise sous forme d'une pelote qui tend à minimiser l'entropie de la chaîne macromoléculaire qui la constitue. La grande déformation de l'élastine est alors possible grâce à une première phase de « déroulement » de la pelote puis une seconde phase de mise en tension effective des macromolécules d'élastine justifiant ainsi une très grande déformation avant rupture.

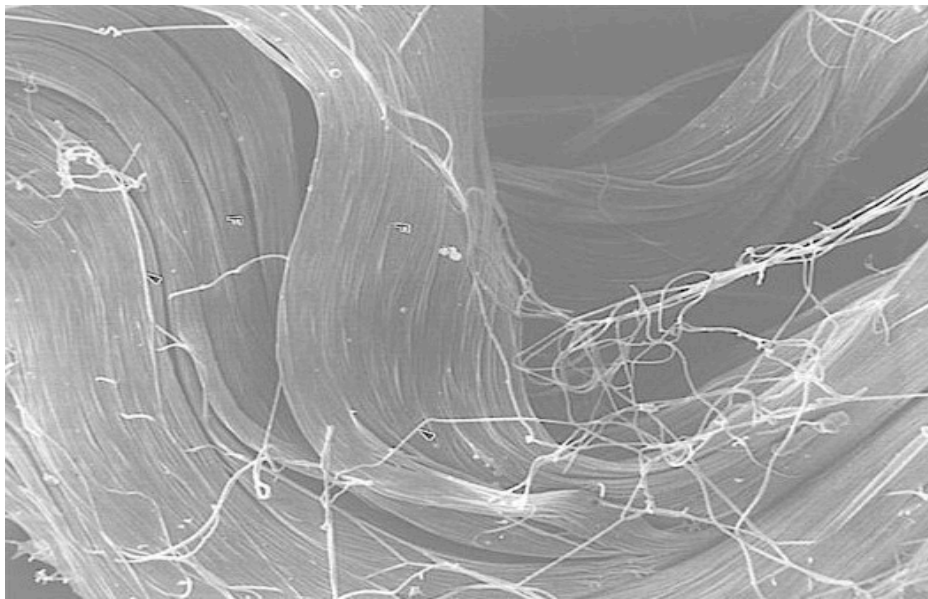


Figure 6 : Illustration de faisceaux de collagènes et de fibres d'élastine par microscopie électronique à balayage. (Piérard et al, *Mircoanatomy of the dermis in relation to relaxed skin tension lines and Langer's lines*, Am J Dermatopathol, 1987 Jun ;9(3) :219-24).

Les fibres élastiques sont constituées d'un composant amorphe principal : l'élastine, associée à des éléments microfibrillaires et à des constituants situés à l'interface élastine – microfibrilles. Les fibres élastiques sont formées par un processus complexe et hautement régulé qui fait intervenir de multiples étapes impliquant des éléments régulant la synthèse et le transport de la tropoélastine, précurseur soluble de l'élastine.

L'agencement de ces monomères de tropoélastine sur le manteau de microfibrilles suivi par leur cross-linking enzymatique contribue à la formation d'un polymère insoluble d'élastine (figure 7).

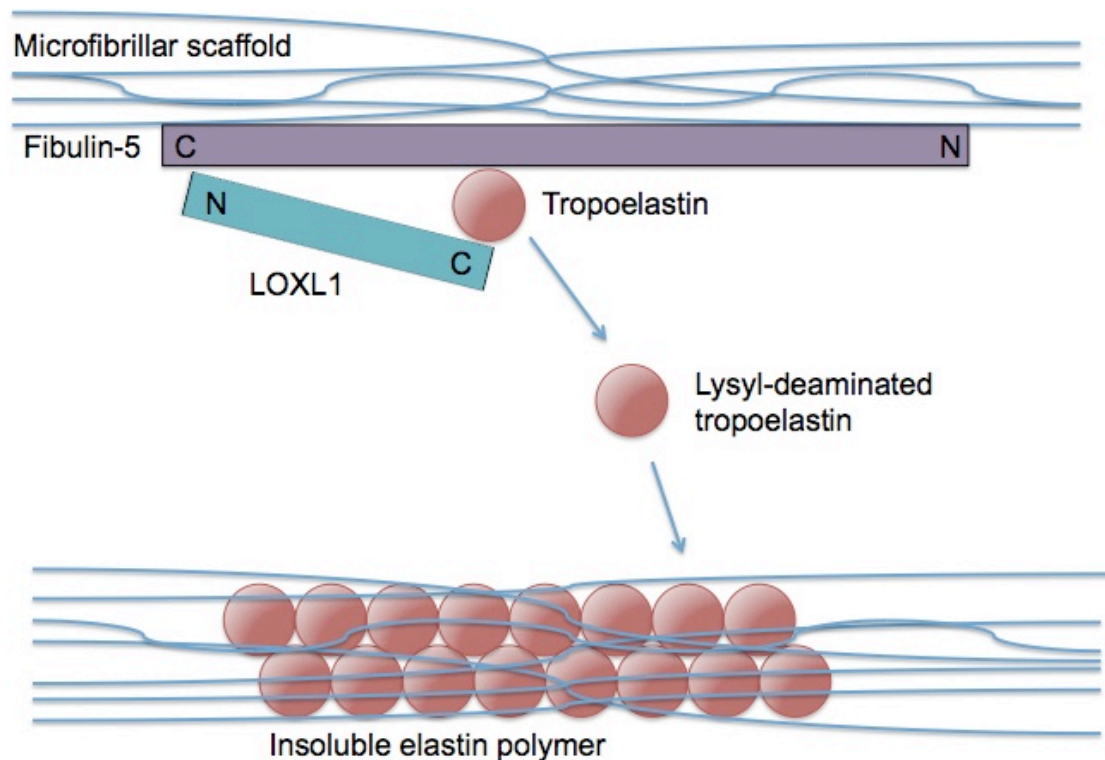


Figure 7 : Modèle simplifié de l'élastogénèse. Les fibres d'élastine sont formées étape par étape par un processus hautement régulé incluant la formation initiale d'un squelette de microfibrilles sur lesquels viennent se déposer les monomères de tropoélastine qui s'assemblent par un cross-link catalysé par les lysyloxydases (24).

Plus de 30 protéines de structure de cette charpente microfibrillaire ont été identifiées, parmi lesquelles les fibrillines 1 et 2, les lysyl oxydases (LOX), les lysyl oxydases-like (LOXL-1 à 4) et les protéines de la famille des fibulines 1-5. En plus de leur rôle structural, ces microfibrilles riches en fibrilline possèdent une fonction de signalisation par leur capacité à se lier au complexe latent du TGF- β (LTBPs) et aux bone morphogenic proteins (BMPs) pour réguler leur biodisponibilité.

L'élastogenèse débute in utero et se termine après la croissance. Il est généralement admis qu'à l'âge adulte, nous disposons d'un capital en élastine non-renouvelable, à l'exception de la grossesse et en post-partum. En effet, durant cette période, on assiste à une importante synthèse suivie d'une dégradation lors de l'accouchement puis une resynthèse d'élastine. Plusieurs études montrent que les protéines LOXL-1 et fibuline 5 semblent jouer un rôle important dans le remodelage du tissu vaginal après l'accouchement [70,71]. Une majorité de souris Knock-out LOXL-1^{-/-} vont développer un prolapsus à l'âge de 12 semaines ou après un premier ou un second accouchement. Ces souris présentent un contenu en élastine diminué par rapport à des souris de type sauvage. Une proportion encore plus importante de souris knock-out fibuline 5 vont développer un prolapsus en vieillissant lié à une formation de fibres élastiques anormales associée à une dégradation plus importante par la MMP-9 dont l'activité est up-régulée par la perte du feed-back négatif de la fibuline 5 sur la MMP-9. Ces modèles de mutations génétiques chez la souris illustrent la complexité des mécanismes de régulation de l'homéostasie des fibres élastiques et soulignent leur rôle potentiel dans la physiopathologie du prolapsus génital.

Les mesures d'élastine dans la paroi vaginale par les taux d'ARN messager ne reflètent probablement pas la quantité réelle d'élastine présente dans le tissu puisque l'élastine n'est plus produite, même si son ARNm est exprimé. L'évaluation de l'expression en élastine du tissu vaginal par immuno-histochimie a fait l'objet de quelques études et les résultats sont, comme pour l'évaluation du collagène, relativement discordants.

Certaines équipes ont montré une diminution de l'expression d'élastine ainsi que de la largeur des fibres élastiques [72] ou encore une diminution de l'intensité de coloration de la fibuline 5 [73] alors que d'autres ne retrouvent pas de différence significative [64,67,74]. D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des protéines associées à la régulation de l'homéostasie de l'élastine et l'impact des changements de la composition en élastine du tissu vaginal sur la genèse du prolapsus.

1.6.3 Analyse morphométrique de la paroi vaginale

L'analyse histomorphométrique peut être utilisée pour observer les changements des différents composants (collagène, élastine, cellules musculaires lisses, vaisseaux, fibres nerveuses) du tissu vaginal de patientes présentant un prolapsus génital.

Boreham et al. ont été les premiers à évaluer spécifiquement les données histomorphométriques de la paroi antérieure et postérieure du vagin chez des patientes présentant ou non un prolapsus [75,76]. Ils ont observé une diminution de l'aire occupée par les cellules musculaires lisses dans la couche musculaire ainsi qu'une désorganisation des faisceaux de muscles lisses chez les patientes présentant un prolapsus génital. Plusieurs équipes ont ensuite publié des résultats concordants démontrant une altération des caractéristiques morphométriques de la couche musculaire en cas de prolapsus [73,77-79].

Des mesures de l'épaisseur de la paroi vaginale ont aussi été effectuées pour rechercher des différences morphométriques entre les tissus vaginaux prolapsés ou non [78-80]. Da Silva et al. ont observé une augmentation de l'épaisseur de la paroi vaginale en cas de prolapsus chez les patientes en post-ménopause par rapport à des patientes pré-ménopausées [80]. Cet épaissement serait principalement lié à une accumulation de fibrose dans la couche musculaire. Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études et les mesures précises de l'épaisseur d'une coupe histologique sont difficiles à obtenir car elles doivent comprendre l'ensemble des couches de la paroi et être parfaitement perpendiculaires au tissu afin d'éviter une surestimation si la coupe est oblique.

1.6.3.1 Vascularisation de la paroi vaginale

La paroi vaginale est richement vascularisée. Les artères proviennent des couches musculaire et adventitielle et s'étendent en un réseau de capillaires dans la lamina propria formant un plexus veineux qui se draine dans de plus larges veines qui traversent la muscularis pour atteindre l'adventice.

Peu d'études ont évalué les différences potentielles de vascularisation entre des patientes présentant ou non un prolapsus. Boreham et al. ont observé plus fréquemment de larges veinules dilatées dans la lamina propria de patientes présentant des prolapsus sévères,

suggérant que cette vascularisation résulterait d'une stase veineuse plus importante des tissus vaginaux [75]. D'autres équipes comme Lin et al. ont observé que les capillaires entourant les artérioles étaient moins nombreux en cas de prolapsus antérieur par rapport à un groupe contrôle [67]. Ils ont émis l'hypothèse d'une diminution de l'apport sanguin de la partie haute du vagin antérieur.

1.6.3.2 Innervation de la paroi vaginale

L'innervation de la paroi vaginale a été peu évaluée par des études histologiques. Pourtant, l'intégrité des terminaisons nerveuses du vagin et des tissus conjonctifs de soutien est essentielle au maintien d'une fonction et d'une anatomie normale des organes pelviens. Des branches des plexus hypogastriques innervent les muscles releveurs de l'anus ainsi que le vagin postérieur [81]. Lors de l'accouchement, des lésions nerveuses peuvent contribuer à la perte du soutien des tissus vaginaux et ainsi intervenir dans la genèse du prolapsus [82,83].

Zhu et al. ont étudié l'innervation de la paroi vaginale antérieure de patientes présentant ou non une cystocèle par marquage du PGP 9.5, une protéine neuronale qui met en évidence les nerfs périphériques et les ganglions dans les tissus [84]. Ils ont observé une diminution significative de l'innervation de la muqueuse vaginale chez des patientes présentant une IUE et un prolapsus génital.

Inal et al. ont également observé, en utilisant le même marqueur, une diminution du nombre et du diamètre des fibres nerveuses de la lamina propria au niveau de la paroi vaginale antérieure de patientes présentant un prolapsus [79].

Deux études ont évalué l'innervation de la paroi vaginale postérieure. Boreham et al. ont utilisé le marqueur S100 qui met en évidence les cellules gliales et les astrocytes et constatent que les faisceaux nerveux sont moins nombreux et plus petits dans la couche musculaire de la paroi vaginale postérieure [76]. Altman et al. ont quant à eux observé des résultats opposés en utilisant le PGP 9.5, avec une augmentation de la densité des fibres nerveuses dans la lamina propria de patientes présentant une rectocèle [85]. Ils émettent l'hypothèse d'une régénération neuronale compensatoire après un traumatisme nerveux qui pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du prolapsus. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les différences de marqueurs utilisés, de localisation et de méthodes de prélèvements des tissus vaginaux.

1.7 Propriétés biomécaniques du tissu vaginal

L'étude du comportement mécanique du vagin est une autre approche permettant de mieux comprendre des phénomènes responsables de la survenue du prolapsus génital. En effet, le vagin peut être considéré comme une interface dans la transmission des forces entre les organes pelviens et comme l'un des acteurs majeurs du soutènement. Le comportement mécanique du tissu vaginal dépend de nombreux facteurs dont il est important de tenir compte lors de protocoles expérimentaux.

L'équipe de Lille a mis au point et validé un protocole d'essais de caractérisation des tissus mous définissant les conditions optimales de réalisations des tests biomécaniques afin de standardiser et d'améliorer la reproductibilité des techniques d'expérimentation [86].

1.7.1 Protocole expérimental d'analyse biomécanique

Dans un premier temps, ce protocole a été développé sur un modèle animal (à partir de tissu vaginal de brebis) afin d'obtenir une quantité importante de tissu et ainsi assurer la reproductibilité de ces tests. Le protocole a été défini après avoir étudié l'influence potentielle de l'ensemble des paramètres qui pourraient influencer les résultats mécaniques : conditions de prélèvement, de conservation et de stockage, conditions expérimentales d'essais (température, hydrométrie, vitesse d'essai, forme des éprouvettes d'essais, conditions de préhension).

Suite à cette étude, les conditions d'essais optimales ont été définies et seront utilisées pour chacune des campagnes de tests biomécaniques réalisés dans ce travail. Les tissus prélevés sont placés dans du sérum physiologique (NaCl 9 %) puis congelés à une température de -18°C. En vue de la réalisation des essais mécaniques, les prélèvements sont décongelés à température ambiante pendant neuf heures, le temps de décongélation avant essai mécanique ne devant pas dépasser 24 heures. Les échantillons sont alors conservés à température ambiante (20°C) dans du sérum physiologique. La taille des prélèvements vaginaux peut être variable, de l'ordre de 30x10mm. Afin d'obtenir une zone de sollicitation homogène au centre des échantillons lors de l'essai de traction, les prélèvements sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce en forme d'altère et placés entre deux mors pour éviter que les tissus ne soient sollicités avant l'essai et également éviter des glissements durant ces mêmes essais. La zone étudiée mesure alors 14x4mm (Figure 7).

L'épaisseur moyenne des tissus vaginaux est ensuite mesurée à l'aide d'un palmer. La connaissance de la largeur et de l'épaisseur du tissu permet de connaître la section initiale, S_0 , mise en jeu au cours de l'essai.

Les tissus vaginaux sont soumis à des tests de traction uniaxiale jusqu'à rupture, à des taux de déformations constants, sur une machine conventionnelle « Instron 5882 » (figure 8).

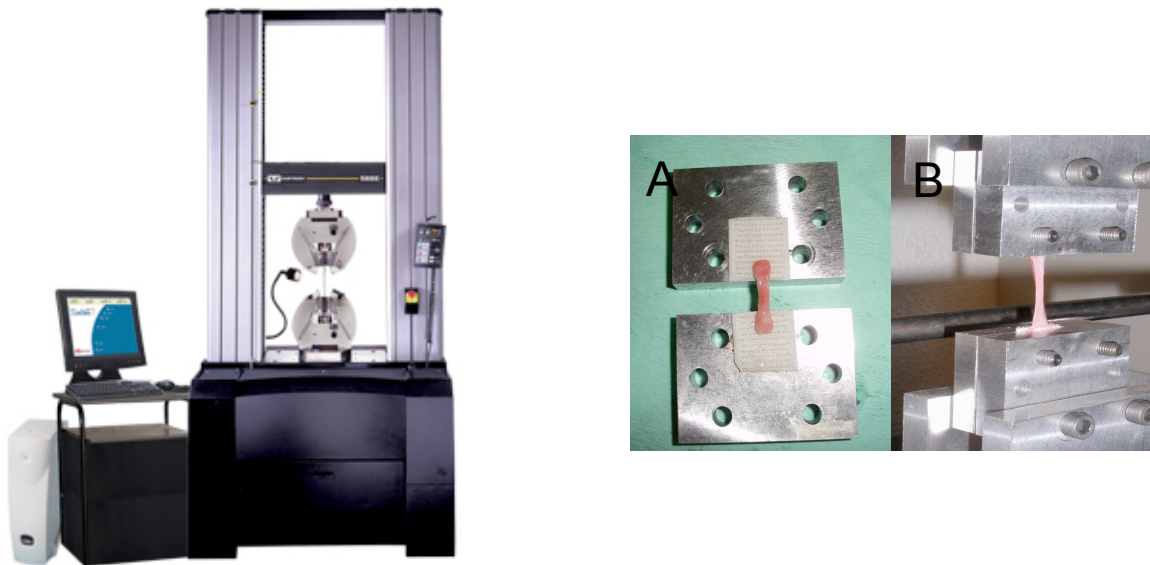


Figure 8 : (1) Illustration du matériel utilisée lors des tests mécaniques (Instron 5882). (2A) Prélèvement de tissu vaginal préparé pour un test biomécanique. (2B) Illustration d'un test de traction unidirectionnel [86].

Les mesures des efforts, F , sont effectuées à l'aide d'une cellule de charge de faible capacité, (1kN) disposée sur la machine de traction. La mesure de la force permet alors de calculer la contrainte nominale $\sigma = F / S_0$, au cours de l'essai. La vitesse de déformation, contrôlée par un dispositif de vidéo extensométrie, est constante à $2 \cdot 10^{-2}$ seconde⁻¹. Les déformations, $\epsilon = 1 + \lambda$, ont été mesurées à l'aide d'un vidéo-extensomètre sans contact. Les courbes contrainte-déformation, permettant de caractériser les matériaux, sont alors obtenues et analysées.

1.7.2 Caractérisation des propriétés biomécaniques du tissu vaginal

Les premiers résultats des travaux réalisés par Rubod et al. ont donc permis de caractériser le comportement du tissu vaginal dans des conditions expérimentales parfaitement contrôlées permettant ainsi une très grande reproductibilité des essais mécaniques comme le montre la figure 9 [86].

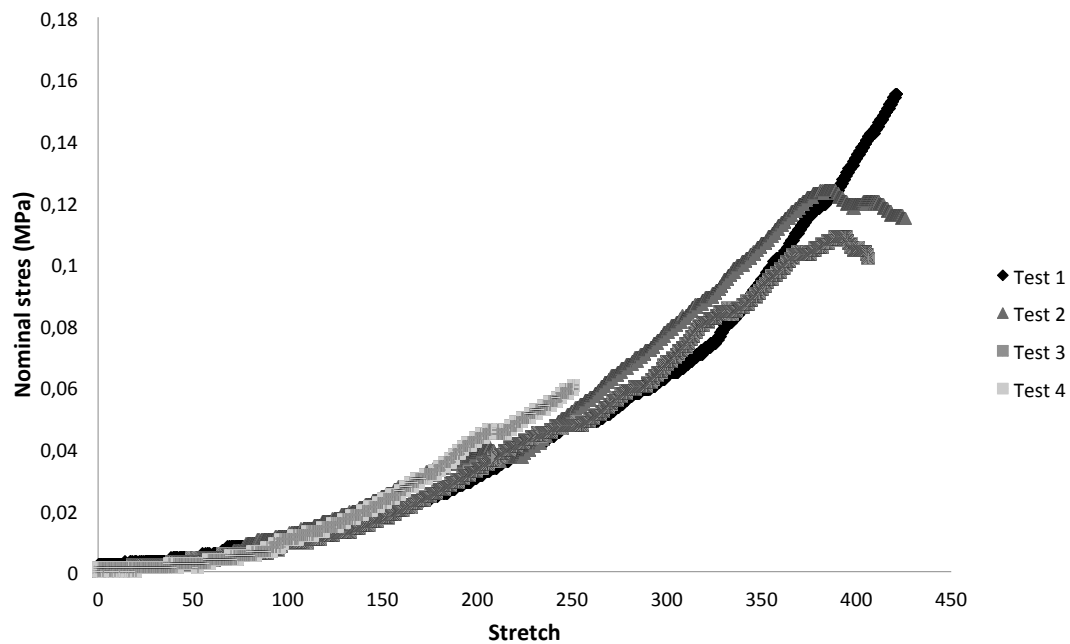


Figure 9 : Essais de traction à rupture sur du tissu vaginal prélevé sur une même patiente – Mise en évidence de la reproductibilité des essais [86].

Les essais sur cette figure ont été réalisés à partir de tissus prélevés sur une seule patiente et la superposition des courbes met en évidence la qualité des mesures.

Une réponse contrainte-déformation non-linéaire est observée lors des essais de traction uniaxiale jusqu'à rupture sur le tissu vaginal, présentant ainsi un **comportement élastique non linéaire dit « hyperélastique »**.

D'un point de vue modélisation, le comportement hyperélastique ne peut être caractérisé par un module de Young ou module de rigidité qui se définit par une relation linéaire entre contrainte et déformation. Le module de Young ne permet donc de définir qu'une droite allant de l'état libre de contrainte et de déformation (contrainte et déformation nulle) à la contrainte maximale considérée dans le domaine élastique. L'observation de la figure 8

montre une relation non linéaire entre contrainte et déformation, qualifiée donc d'élasticité non linéaire, et des tissus très grandement déformables avant rupture, qu'il convient de modéliser autrement. L'étude globale de la réponse élastique est une source d'information bien plus riche que la simple contrainte maximale, qui est une information très ponctuelle.

Des essais de traction uniaxiale à rupture ont ensuite été réalisés à partir de tissus vaginaux de patientes présentant un prolapsus génital ou de tissu vaginal sain prélevé post-mortem (figure 10) [87].

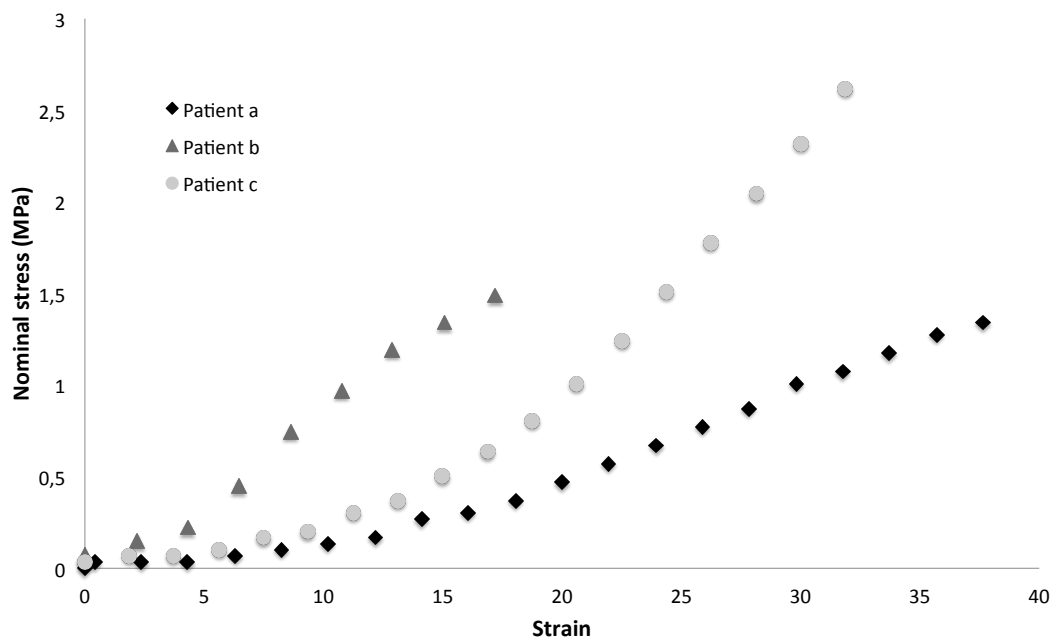


Figure 10 : Essais de traction à rupture sur du tissu vaginal prélevé sur différentes patientes – Mise en évidence de la dispersion inter individuelle [87].

Cette figure présente des résultats obtenus sur des échantillons vaginaux prélevés sur différentes patientes et met ainsi en avant une **très grande dispersion interindividuelle** prévisible des propriétés biomécaniques des tissus vaginaux.

Pour autant, au delà de la particularité de chaque personne, on peut constater une caractéristique commune à l'ensemble de ces essais : la relation entre contrainte et déformation n'est pas linéaire. A noter que cette relation non linéaire est également constatée pour l'ensemble des tissus pelviens [88]. Ainsi, une caractérisation des propriétés

mécaniques des tissus pelviens par le seul module de Young ne permettra donc pas de résumer le comportement de ces tissus et une modélisation élastique non linéaire est requise.

Des essais de traction uniaxiale cyclique à des niveaux de déformations maximales imposées croissantes ont été également réalisés pour rechercher une dépendance temporelle de la réponse mécanique (figure 11) [87].

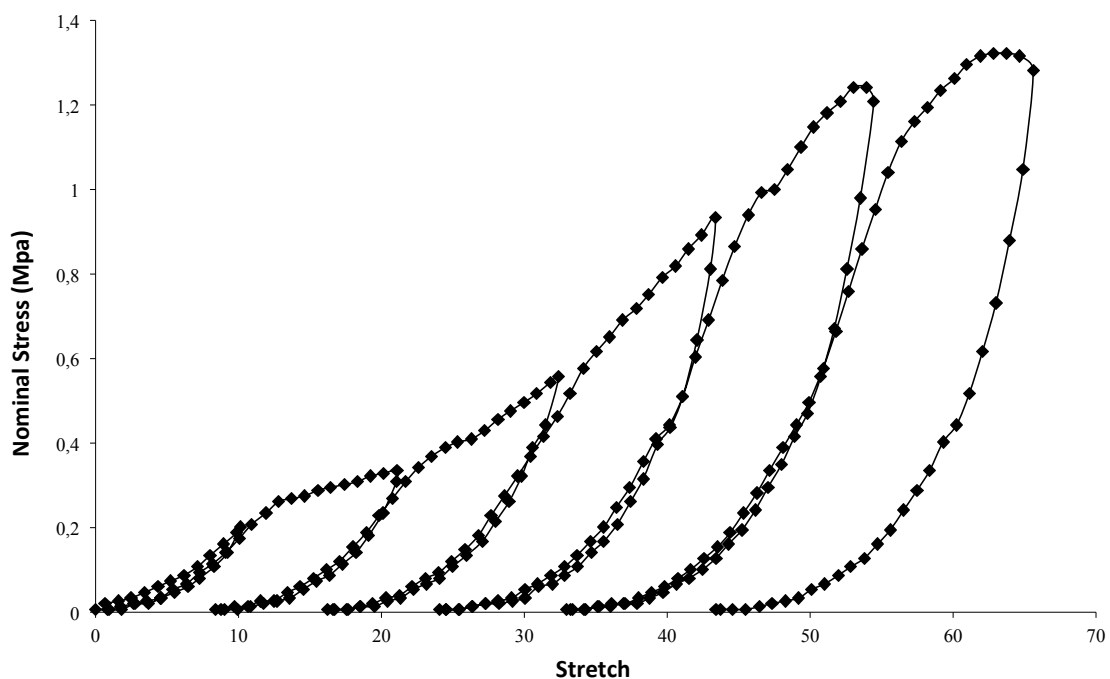


Figure 11 : Essais de traction cyclique à déformation maximale imposée croissante – Mise en évidence de la visco-hyperélasticité [89].

On constate en étudiant la réponse mécanique contrainte-déformation que les réponses lors de la phase de charge et lors de la phase de décharge sont différentes. Le comportement du tissu n'est donc pas, en toute rigueur, un comportement purement élastique.

En effet, d'un point de vue mécanique, on entend par comportement élastique un comportement qui induit une évolution de la contrainte liée à une évolution de la déformation qui se fait de manière totalement réversible, c'est à dire avec un retour à une position libre de contrainte et de déformation si on relâche la contrainte, et sans la moindre perte d'énergie, ce qui impose que la courbe de charge et de décharge doivent parfaitement coïncider. On constate que ce n'est pas le cas des tissus vaginaux.

En réalité, de la même manière que pour d'autres polymères grandement déformables d'une toute autre origine, comme par exemple les élastomères, le tissu vaginal a en réalité un **comportement élastique non linéaire et visqueux** [90]. Le caractère visqueux du comportement des tissus mous se traduit par une relation entre temps et réponse mécanique. Cela sous entend que le matériau requiert un certain temps pour revenir à un état libre de contrainte. Cela explique, en partie, que lors de sollicitations les organes ne se repositionnent pas instantanément, comme cela aurait été le cas si les matériaux étaient purement élastiques. Les matériaux constitutifs des organes, ont un **comportement visco-hyperélastique** [89]. Soumis à un effort, un certain temps est requis pour qu'ils se déforment. Réciproquement, lorsque l'effort est relâché, il faut également un certain temps pour qu'ils reviennent à leur position d'origine.

Pour autant, la modélisation de la visco-élasticité non linéaire reste encore aujourd'hui d'une très grande complexité pour l'ensemble de la communauté scientifique des mécaniciens. Ainsi, compte tenu de ces difficultés et du caractère très dispersif interindividuel, nous avons choisi dans un premier temps de ne nous intéresser qu'au caractère hyperélastique de ces milieux en étudiant essentiellement des comportements monotones et en conséquence en négligeant le caractère visqueux de ces milieux.

1.7.3 Comportement élastique non linéaire du tissu vaginal

Afin de permettre une étude statistique comparative de l'ensemble des données expérimentales, il est nécessaire d'introduire un modèle de comportement permettant de rendre compte des phénomènes d'élasticité non linéaire en grande déformation. Le modèle utilisé est de type Mooney-Rivlin [91,92]. Deux paramètres C_0 et C_1 correspondant respectivement à la rigidité des matériaux à faibles et forts niveaux de déformation ont été identifiés sur les courbes par une méthode des moindres carrés:

$$\sigma = 2 (\lambda - 1 / \lambda^2) [C_0 + C_1 (\lambda^2 + 2 / \lambda - 3)]$$

Ces paramètres sont relatifs à la rigidité à faible (C_0) et forte (C_1) déformation. Ce modèle à 2 paramètres permet de rendre compte des non-linéarités du comportement des tissus mou comme le montre la figure 12.

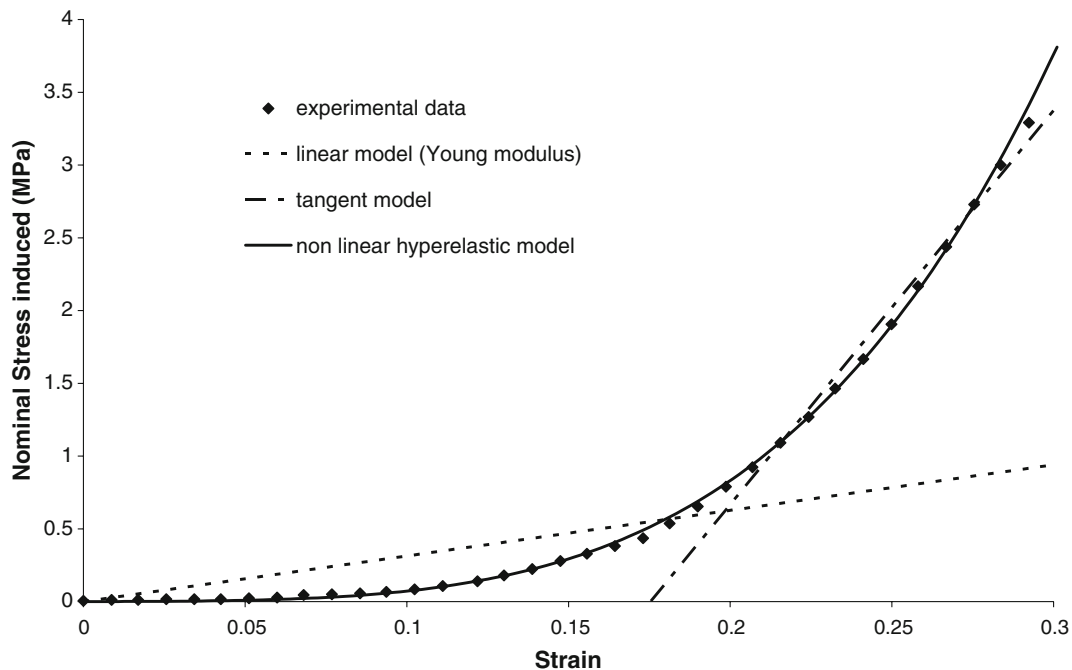


Figure 12 : Comparaison entre des modélisations élastiques linéaires et non linéaires [87].

1.7.4 Propriétés biomécaniques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital

Dans une étude préliminaire, le comportement du tissu vaginal en cas de prolapsus génital a été évalué en comparant les propriétés biomécaniques du tissu vaginal de 30 patientes présentant un prolapsus et de 10 biopsies vaginales prélevées post-mortem, chez des patientes indemnes de prolapsus [93].

Une comparaison statistique de la rigidité des tissus à faible (C_0) et forte déformation (C_1) a montré que **les tissus vaginaux des patientes présentant un prolapsus sont significativement plus rigides** que les tissus non prolapsés, aussi bien au niveau de la paroi vaginale antérieure que postérieure. Ce résultat nous permet de définir un modèle de comportement biomécanique propre au tissu vaginal en cas de prolapsus génital [87] qui peut ainsi être mis en relation avec les propriétés histologiques de ce même tissu dans notre protocole de recherche PROLILLUS (figure 13).

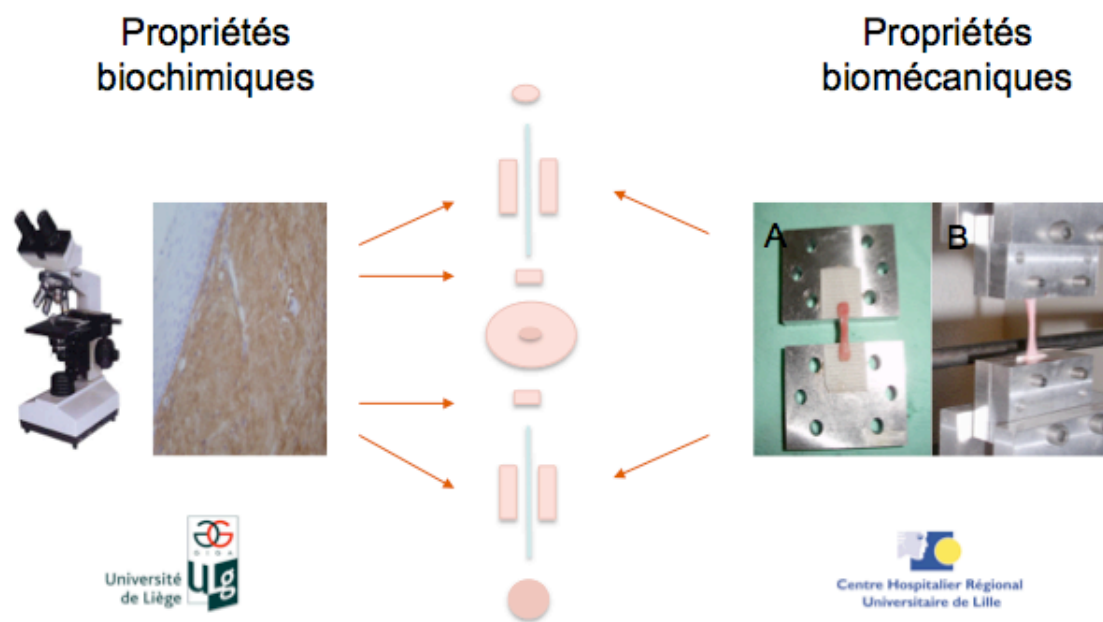


Figure 13 : Représentation schématique de notre protocole de recherche sur la corrélation entre les propriétés biomécaniques et biochimiques du tissu vaginal dans le cadre du prolapsus génital.

1.7.5 Corrélation entre les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital

Notre protocole d'étude cherche à déterminer les modifications histomorphométriques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital et de corréler ces résultats aux propriétés biomécaniques de ce même tissu. Cette approche peut apporter de nouveaux éléments dans le but de mieux comprendre la physiopathologie du prolapsus, de développer des stratégies préventives et d'améliorer le développement de prothèses utilisés dans ce type de chirurgie.

A l'heure actuelle, les données de la littérature ne permettent pas d'établir un lien formel entre les modifications de composition du tissu vaginal en cas de prolapsus génital et les propriétés biomécaniques de ce même tissu. Notre travail tend à apporter des éléments de réponse à cette question.

2. Buts et plan

Ce travail est le reflet d'une étroite collaboration entre les Départements de Gynécologie et Obstétrique des services universitaires de Liège et de Lille. Ce doctorat a permis de réunir deux pôles de compétences très complémentaires dans un même objectif de recherche des causes et conséquences du prolapsus génital (Projet Prolillus).

En effet, les connaissances actuelles de la physiopathologie du prolapsus génital sont encore très limitées. Des éléments de réponses peuvent être apportés par l'analyse approfondie du tissu vaginal et des tissus conjonctifs pelviens, selon différentes approches.

L'étude histologique du tissu vaginal permet d'analyser sa composition mais aussi sa structure architecturale afin de la comparer à des tissus sains pour observer les changements entre ces deux entités. Les analyses biochimiques ont été réalisées au sein du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (LBTD) de l'Université de Liège sous la direction des Professeurs Jean-Michel Foidart et Agnès Noel ainsi qu'avec l'expertise de Carine Munaut, Silvia Blacher, Betty Nusgens et du Professeur Michelle Nisolle.

L'étude biomécanique de ces tissus permet quant à elle de définir le comportement de ce tissu lorsqu'il est soumis à des contraintes et d'apprécier le rôle du tissu vaginal dans le maintien du support pelvien. Les prélèvements biologiques de ces études ont été collectés à l'Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille. Les tests biomécaniques ont été réalisés au Laboratoire de Mécanique de Lille (Ecole Centrale) sous la direction des Professeurs Mathias Brieu et Michel Cosson ainsi qu'avec l'expertise de Chrystèle Rubod, Jean Gilibert et Pauline Lecomte-Grosbras.

La recherche d'une corrélation entre la composition du tissu vaginal et son comportement biomécanique est une approche originale pour mieux comprendre quels éléments constitutifs de ce tissu sont impliqués dans la physiopathologie du prolapsus génital.

Au travers d'une présentation des différents articles publiés, fruits de la collaboration entre les départements de Lille et Liège, nous allons parcourir l'ensemble des travaux réalisés durant ce Doctorat.

Buts et plan

Dans un premier temps, nous avons dressé un état des lieux des connaissances des propriétés biochimiques du tissu vaginal puis nous décrivons notre expérience de l'analyse histologique et immuno-histologique de la paroi vaginale dans le cadre du prolapsus génital (Publication 1). Cet article a déjà été mentionné dans l'Introduction de ce mémoire et nous discuterons principalement de l'implication de ces résultats dans les perspectives de nos futurs travaux de recherche.

Publication n°1:

« *Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review* »

de Landsheere L., Munaut C., Nusgens B., Maillard C., Rubod C., Nisolle M., Cosson M., Foidart JM.

Int Urogynecol J, 2013;24(12):2011-20

A partir de ces données histologiques, nous avons analysé les modifications de la composition des différents constituants du tissu vaginal en comparant deux régions de la paroi vaginale chez une même patiente présentant un prolapsus génital (Publication 2). Nous décrivons les résultats de cette étude qui tend à démontrer que l'élastine joue un rôle important dans l'intégrité du tissu vaginal.

Publication n°2:

« *Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse* »

de Landsheere L., Blacher S., Munaut C., Nusgens B., Rubod C., Noel A., Foidart JM., Cosson M., Nisolle M.

Int Urogynecol J, 2014, May 28

Ensuite, nous avons approfondi les connaissances des propriétés biomécaniques du tissu vaginal comme il a été fait mention dans l'introduction. En effet, nous avons comparé les propriétés biomécaniques du tissu vaginal par rapport à la peau et aux ligaments utérins ainsi qu'aux organes qui sont impliqués dans la statique pelvienne dans des conditions expérimentales bien définies et validées par de nombreux travaux antérieurs.

Buts et plan

Afin de définir la contribution du vagin dans le maintien des structures pelviennes, nous avons effectué des tests biomécaniques comparant le vagin, les aponévroses et la peau.

Publication n°3:

« *Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties?* »

Gabriel B., Rubod C., Brieu M., Dedet B., de Landsheere L., Delmas V., Cosson M.

Int Urogynecol J, 2011;22(1):23-7

Nous avons également mené une étude comparative des propriétés biomécaniques des différents ligaments utérins, le ligament rond, le ligament large et le ligament utéro-sacré.

Publication n°4:

« *Caractérisation biomécanique des ligaments utérins. Implications en statique pelvienne* »

Rivaux G., Rubod C., Dedet B., Brieu M., Gabriel B., de Landsheere L., Devos P., Delmas V., Cosson M.

Pelvi-Périnéologie, 2011;6:67-74

Ensuite, nous avons comparé les propriétés biomécaniques du vagin, de la vessie et du rectum.

Publication n°5

« *Biomechanical properties of Human pelvic organs* »

Rubod C., Brieu M., Cosson M., Rivaux G., Clay JC., de Landsheere L., Gabriel B.

Urology, 2012;79(4):968.e17-22

Le but final de ce travail est donc de tirer le meilleur parti possible de l'expertise de chacun afin de définir avec précision les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal dans le cadre du prolapsus génital puis de rechercher s'il existe une corrélation entre les variations observées en histologie et le comportement biomécanique de ce même tissu.

Publication n°6

« Elastin density: the link between biochemical and biomechanical properties of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse? »

de Landsheere L, Brieu M., Blacher S, Munaut C, Nusgens B, Rubod C, Noel A, Foidart JM, Nisolle M, Cosson M.

Article soumis pour publication

3. Résultats

Publication n°1

Int Urogynecol J
DOI 10.1007/s00192-013-2111-1

REVIEW ARTICLE

Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review

**Laurent De Landsheere • Carine Munaut • Betty Nusgens •
Catherine Maillard • Chrystèle Rubod • Michelle Nisolle •
Michel Cosson • Jean-Michel Foidart**

Received: 28 January 2013 / Accepted: 3 April 2013
© The International Urogynecological Association 2013

Introduction :

Le prolapsus génital est une pathologie complexe et encore imparfaitement comprise. Sa survenue est la résultante d'une multitude de facteurs de risque comme principalement la multiparité, les traumatismes obstétricaux, l'obésité, le tabagisme, les pathologies pulmonaires chroniques et le vieillissement. A côté de ces facteurs environnementaux, une prédisposition génétique est également largement reconnue comme un important facteur contributif dans l'apparition d'un prolapsus. La fréquence plus élevée de prolapsus chez des patientes présentant une maladie des tissus conjonctifs comme le syndrome de Marfan, Ehlers-Danlos ou le Cutis Laxa en est une parfaite illustration.

Les anomalies du tissu conjonctif du vagin et des tissus pelviens sont donc probablement impliquées dans la genèse du prolapsus génital. Un autre argument qui soutient cette hypothèse est le taux élevé de récurrence, de l'ordre de 30%, des cures de prolapsus traditionnelles par voie vaginale, utilisant des tissus autologues, c'est à dire des tissus provenant de la patiente elle-même déjà fragilisés par cette pathologie.

L'intégrité des tissus conjonctifs pelviens et vaginaux conditionne la stabilité du plancher pelvien. Des altérations structurelles de ces tissus sont probablement responsables de modifications de leurs propriétés biomécaniques et contribuent à l'apparition d'un prolapsus génital dont les mécanismes physiopathologiques sont encore à préciser.

L'objectif de cette revue de littérature est de décrire les connaissances actuelles de l'histologie de la paroi vaginale et de ses modifications en cas de prolapsus génital.

Résultats et Discussion :

Les résultats de cette étude ont largement été décrits dans l'introduction de ce travail car ils sont à la base de nos recherches portant sur le versant biochimique des modifications du tissu vaginal en cas de prolapsus génital.

En résumé, les investigations menées dans ce domaine sont encore limitées et produisent des résultats parfois très contradictoires ne permettant pas de définir de modèle d'altération des propriétés biochimiques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital. En

effet, certaines études mettent en évidence une augmentation de la proportion de collagène III alors que d'autres décrivent une diminution de ce même sous-type de collagène.

Ces résultats conflictuels s'expliquent principalement par des différences importantes de méthodologie utilisée dans ces études. Les sites de prélèvements de tissu vaginal sont très variables et parfois mal définis par histologie ce qui permet difficilement de déterminer avec précision la couche de la paroi vaginale effectivement analysée. Les coupes histologiques sont le plus souvent analysées subjectivement par un anatomo-pathologiste ou mesurées à partir de champs sélectionnés de manière aléatoire ce qui rend difficile l'interprétation des résultats et la comparaison des études. Dans la plupart de ces études, le nombre de patientes étudiées est relativement limité ce qui diminue la portée des conclusions.

De plus, un autre élément important relevé dans cette revue est la large variation en âge et en statut ménopausique des populations étudiées. Généralement, les patientes présentant un prolapsus sont souvent plus âgées et en post-ménopause que les patientes contrôles. De ce fait, il est difficile de déterminer si ces changements observés sont liés au prolapsus ou simplement au vieillissement des tissus.

En conclusion, l'hétérogénéité des populations de patientes étudiées, des sites de prélèvements des tissus vaginaux et la grande variabilité des méthodes de quantification ne permettent pas de tirer des conclusions fiables sur les mécanismes qui aboutissent au prolapsus génital.

Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review

Laurent De Landsheere · Carine Munaut · Betty Nusgens · Catherine Maillard · Chrystèle Rubod · Michelle Nisolle · Michel Cosson · Jean-Michel Foidart

Received: 28 January 2013 / Accepted: 3 April 2013
© The International Urogynecological Association 2013

Abstract

Introduction and hypothesis The pathophysiology of pelvic organ prolapse (POP) is incompletely understood. The purpose of this study is to describe the current knowledge about histology of the vaginal wall and its possible involvement in the pathogenesis of pelvic organ prolapse.

Methods Eligible studies were selected through a MEDLINE search covering January 1986 to December 2012. The research was limited to English-language publications.

Results Investigations of changes in the vaginal tissue that occur in women with genital prolapse are currently still limited and produced contrary results. The heterogeneity of the patients and the control groups in terms of age, parity and hormonal status, of the localization of biopsies and the histological methods as well as the lack of validation of the

quantification procedures do not allow clear and definitive conclusions to be drawn.

Conclusions This review shows that current knowledge of the histological changes observed in women with POP are inconclusive and relatively limited. More studies are needed in this specific field to better understand the mechanisms that lead to POP.

Keywords Vagina · Pelvic organ prolapse · Collagen · Elastin · Connective tissue · Extracellular matrix

Abbreviations

POP	Pelvic organ prolapse
ECM	Extracellular matrix
MMP	Matrix metalloproteinase
LOX	Lysyloxidase
GSI	Genuine stress incontinence
FBN	Fibrillin
Latent	TGF- β binding protein
BMP	Bone morphogenic protein
EFW	Elastic fiber width
PGP 9.5	Protein gene product 9.5

Introduction

Pelvic organ prolapse (POP) is a common problem that can have a serious impact on quality of life in women. The lifetime risk of undergoing surgery for prolapse or incontinence is 11% [1]. Environmental factors such as multiparity, trauma, obesity, and aging are important risk factors in developing POP. However, genetic predisposition is widely recognized as a determinant contributing factor to the progression of POP. The significant frequency of POP in genetic diseases of connective tissues such as Ehlers–Danlos, Marfan syndrome, and cutis laxa, as well as in models of

L. De Landsheere (✉) · M. Nisolle · J.-M. Foidart
Department of Obstetrics and Gynecology,
CHR La Citadelle, Boulevard du 12e de ligne,
n°1, 4000 Liège, Belgium
e-mail: ldelandsheere@chu.ulg.ac.be

L. De Landsheere · C. Munaut · C. Maillard · M. Nisolle ·
J.-M. Foidart
Laboratory of Tumor and Development Biology,
CHU, GIGA-Cancer, University of Liège,
Sart-Tilman, Belgium

B. Nusgens
Laboratory of Connective Tissues Biology,
GIGA-Cancer, University of Liège,
Sart-Tilman, Belgium

C. Rubod · M. Cosson
Department of Gynecologic Surgery,
Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier
Régional Universitaire de Lille, Avenue Oscar
Lambret, n°2, 59037 Lille Cedex, France

Published online: 07 May 2013

 Springer

mice deleted for extracellular matrix (ECM) molecules, points to connective tissue disorder as the most likely etiological factor in POP. It is also supported by the high recurrence of POP after traditional surgical repair (nearly 30%), using weak native tissue [2]. Structural components forming the vaginal wall and its supportive connective tissue condition their biomechanical properties. Their alterations are most probably involved in the physiopathology of POP and need to be better specified.

Assessing changes in the composition of the vaginal ECM in POP is challenging. The fibrillar components, collagen and elastin, are highly insoluble. Measuring hydroxyproline for quantifying collagen content will give a total amount in the tissue without any distinction between the various types and any picture of tissue organization. Similarly, elastin can be measured indirectly through their specific cross-links, a technique that can lead to misleading results if the cross-linking process is altered in POP. The vaginal ECM also contains less abundant molecules, such as the elastic fibers-associated microfibrils, small and large proteoglycans and hyaluronic acid that play a major role in the architectural organization of mechanically competent fibrillar elements and in signaling to the cells. Investigating gene expression at the mRNA level has tentatively circumvented these difficulties. However, this approach provides a snapshot of the current metabolic activities of the cells that can be unspecifically altered by the weakened mechanical resistance of the tissue, and does not trace the long-term history of the disease. Histological and immunohistochemical analyses, although semi-quantitative, have been widely used to study tissue alteration in POP.

The purpose of this study is to summarize the anatomy and current knowledge about histological alterations of the vaginal wall and their involvement in the pathogenesis of pelvic organ prolapse.

Materials and methods

We performed a MEDLINE search using the terms “vagina, vaginal wall, histology, morphometry, morphometric, pelvic organ prolapse, collagen, elastin, vaginal smooth muscle, connective tissue, extracellular matrix and biochemical properties”. Free text and Mesh terms were used. The research was limited to English-language publications from 1986 to 2012.

Results

Anatomy of the vaginal wall

The human vagina is a fibromuscular canal composed of four layers. As can be seen in Fig. 1 showing a full-thickness

section of the vaginal wall, the epithelial layer is a superficial nonkeratinized, stratified, squamous epithelium. The subepithelial layer or lamina propria is a dense connective tissue layer mainly composed of fibrillar collagens and elastin populated by fibroblasts. The lamina propria is perforated by small arterioles and venules. The muscularis is composed of inner circular and outer longitudinal smooth muscle cells surrounded by connective tissue. The adventitia is a loose connective tissue layer that separates the muscularis of the vagina and the paravaginal tissue. The lamina propria and muscularis are the two important layers that confer a great tensile strength to the vaginal wall [3]. Several authors investigated histology of the “endopelvic fascia” used by gynecological surgeons for colporrhaphy [4–6]. This fascia may not exist as a specific tissue, but represents the fibromuscular layer of the vaginal wall (muscularis and adventitia). The adventitia is variably discrete and does not form a true fascial layer.

Biochemical aspects of the vaginal connective tissue

The connective tissue of the vagina is composed in varying proportions of cellular elements, fibroblasts, and smooth muscle cells, surrounded by an extracellular matrix (ECM). Although fibroblasts are the main cells responsible for the synthesis and secretion of fibrillar (collagen and elastin) and less abundant non-fibrillar components, smooth muscle cells can also synthesize these molecules. Collagen and elastin are fundamental components that control the biomechanical properties of the vaginal tissue. Collagen fibers are very rigid and do not easily distort while elastic fibers provide elasticity and recoil to the tissue. The ECM is in constant remodeling, and its homeostasis depends on the balance between synthesis and degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) further controlled by activators and inhibitors (TIMPs). Both processes are modulated not only by soluble biological mediators such as growth factors and their receptors, but also by the chemical and mechanical signaling issued from the ECM itself and recognized by transmembrane receptors to the ECM components, integrins. This latter mechanism participates in the degradation of the vaginal wall.

Collagen

Fibrillar collagens are the principal determinants of vaginal tissue strength. Collagen molecules are homo- or heterotrimers made of three polypeptidic α -chains coiled together to form a triple-helix [7]. These molecules spontaneously polymerize upon cleavage of the amino- and carboxy-terminal propeptides by specialized enzyme to form microfibrils, fibrils and bundles of fibrils progressively stabilized by cross-link upon the activity of lysyloxidase (LOX; Fig. 2) [8]. Collagen I, III, and V are the main collagen subtypes

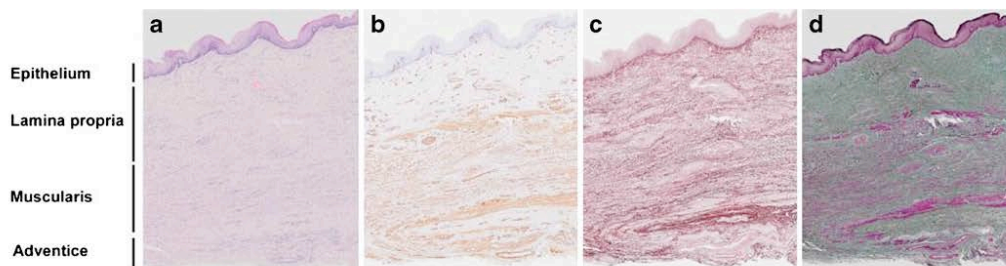


Fig. 1 Histology of full-thickness biopsy specimens obtained from cross-sections of the anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. The vaginal wall consists of four layers: the epithelium and lamina propria (vaginal mucosa), muscularis, and adventia. a

Hematoxylin-eosin staining, **b** staining for smooth muscle α -actin, **c** orcein stain for detection of elastic fibers, **d** Masson's trichrome stain. Original magnification, $\times 10$

present in the vagina. Collagen I forms large and strong fibers responsible for the mechanical resistance of the tissue. This subtype is abundant in skin, ligament, tendon, and bone. Collagen III forms smaller fibers of lower tensile strength and is present in mobile organs and cyclically stretched tissues such as blood vessels [9]. Type I collagen confers strength to tissues while type III contributes to elasticity. Type V collagen forms small fibers of low tensile strength. Collagens I, III, and V copolymerize to form hybrid fibrils. Type V collagen forms the core of the fibril surrounded by co-polymers of collagen type I and type III. The proportion of each subtype of collagen determines the fiber size and has an impact on the biomechanical strength of the tissue [10, 11]. The collagen fibers are further covered by FACIT collagens XII and XIV and small leucine-rich proteoglycans such as decorin, which also participate in the control of fibrillogenesis.

Several studies have analyzed changes in the vaginal connective tissue of patients with and without POP by histology [12–19] using various methods and stainings to assess changes in collagen content in the vaginal wall. The results of these studies are described in Table 1.

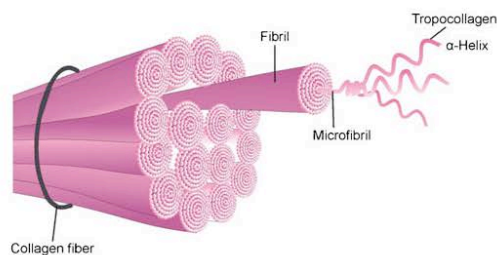


Fig. 2 The structure of collagen. Triple helical collagen molecules (tropocollagen) polymerize to form microfibrils, fibrils, and bundles of fibrils (collagen fiber) progressively stabilized by cross-link upon the activity of lysyl oxidase (LOX)

Makinen et al. reported an increased amount of collagen fibers and a rarefaction of fibroblasts in the vaginal fascia of women with POP, using a Weigert Van Gieson stain [12]. In agreement with this study, Kökçü et al. compared connective tissue components of the vaginal tissue samples in the precervical region with Gomori's one-step trichrome and described higher "scores" of collagen and lower "scores" of fibroblasts in patients with POP [13]. They postulated, although with no supportive data, that the fibroblasts in patients with POP might be producing a high amount of weak collagen, probably type III, leading to pelvic support disorders.

Picrosirius red stain can also be used to visualize collagen fibers from the vaginal tissue. Contrasting with the above studies, Takano et al. did not find any significant difference between the POP and control groups [14]. By using a Picrosirius polarization method, Borges et al. observed a molecular disorganization and fragmentation of the collagen fibers in the lamina propria of women with POP [15].

Liapis et al. analyzed type III collagen in the vagina around the urethra by immunohistochemistry and reported a severely reduced visual score in patients with POP and genuine stress incontinence (GSI) and a moderate reduction in patients with POP alone compared with the control group [16]. From the study by Goepel et al. who investigated several collagen types in the periurethral vagina wall in continent and incontinent postmenopausal women with POP, it seems that tissues from POP patients with GSI showed weaker immunostaining for types I, III, and IV collagens [17]. In agreement with these results, by investigating the same molecules and analyzing the immunostaining by automatic digital image analysis, Lin et al. observed a significant reduction in only collagen III in the apex of the anterior vaginal wall in patients with POP [18].

In contrast to these results, Moalli et al., by using semi-quantitative immunofluorescence staining for collagen types I, III, and V in full-thickness biopsies of the vaginal apex,

Table 1 Collagen analysis by histology in biopsy specimens from vaginal tissue in patients with prolapse or without prolapse

Study	Target population and sample size	Menopausal status	Mean age (years)	Parity	Biopsy localization	Histological localization	Analytical methods	Findings: patients with POP compared with controls
[12]	10 women with POP 10 controls	Not described	60.1	Not described	Anterior precervical vaginal fascia	Not described	Histology with HE, Weigert Van Gieson, PAS and Gomori	Increased collagen fibers and decreased amount of fibroblasts
[16]	34 women with POP	16 pre- and 18 post-menopausal	54.4±7.1	2.4±1.2	Anterior paravaginal fascia at the level of the bladder neck	Not described	Immunohistochemistry	Decreased collagen III in women with POP and prolapse, no significant difference in women with prolapse alone compared with controls
	32 women with POP	15 pre- and 17 post-menopausal	55.4±7.4	2.5±1.1				
	28 controls	10 pre- and 18 post-menopausal	53.6±6.7	2.3±1.0				
[13]	24 women with POP	Premenopausal	44.4±5.2	3.0±1.1	Precervical vaginal fascia	Not described	Histology with HE, Gomori's trichrome	Increased total collagen (subtypes not assessed)
[14]	21 controls	Premenopausal	45.6±4	2.9±0.8				
	45 women with POP	22 premenopausal 23 postmenopausal	42.7 (35–49) 65.6 (47–85)	Not described	Fragments of vaginal apex	Not described	Histology with Picrosirius	No statistically significant difference in total collagen between the groups
	10 controls	Premenopausal	41.9 (32–50)					
[17]	29 patients with POP (15 with POP and 14 without POP)	Postmenopausal	61.9 (49–74)	Not described	Perineurthral vaginal fascia	Mucosa	Immunohistochemistry	Decreased collagen I, III, and VI in women with POP. No difference in collagen IV and V
[19]	37 patients with POP	11 premenopausal 13 postmenopausal (no HT) 13 postmenopausal (on HT)	42.7±7.1 68.1±9.4 64.4±8.6	2 (1.4) 3 (2.4) 3 (2.4)	Full-thickness vaginal apex at one of the lateral fornices	Subepithelium and muscularis	Histology, laser scanning confocal microscopy and immunofluorescence	Increased collagen III with no difference in collagen I and V
	11 controls	Premenopausal	39.7±7.1	3 (1.4)				
	6 women with POP	Postmenopausal	Not described	Not described	Fragments of vaginal apex	Mucosa	Picrosirius polarization staining method	Collagen fiber disorganization
	6 controls	Not described	Not described					
[18]	23 women with POP	8 pre- and 15 post-menopausal	57.4±15.1	4 (2–12)	Full-thickness precervical anterior vaginal wall	Not described	Immunohistochemistry	Decreased collagen III, collagen I and III had significant positive correlations with ageing
	15 controls	13 pre- and 2 post-menopausal	47.1±15.5	3 (0–7)				
	20 women with POP	Not described	61	1–4	Full-thickness “redundant” and non-prolapsed vaginal tissue	All Layers	Histology with HE, Masson's trichrome, Verhoeff Van Gieson, and immunohistochemistry	No significant differences in collagen content between prolapsed and nonprolapsed tissues

POP pelvic organ prolapse, POP stress urinary incontinence, HE hematoxylin and eosin, PAS periodic acid-Schiff

observed that type III collagen is the major fibrillar collagen of the vagina in patients with POP, independent of age and parity [19]. Furthermore, the total amount of collagen was increased in women with POP relative to women without POP, primarily because of increased expression of type III collagen. They postulated that the predominance of type III collagen might explain the increased flexibility and distensibility and the decreased tensile strength and therefore contribute to the progression of the disease.

These conflicting results further support the need for well-controlled studies in terms of patients, anatomical and histological definition of the tissue, and validated quantification methods.

Elastin

Elastic fibers are key architectural elements of connective tissues that are subject to mechanical strain and expansile forces. They provide extensibility and recoil to elastic tissues. This property of resilience is important for the maintenance of vaginal structural integrity against mechanical strain.

Elastin fibers are formed through a highly regulated and stepwise process including the initial formation of a microfibrillar scaffold, the guidance and deposition of tropoelastin monomers into the scaffold followed by their enzymatic cross-linking to form the functional insoluble elastin polymer (Fig. 3).

More than 30 elastic fiber-associated proteins have been identified, among which the major microfibrillar components fibrillin 1 and 2 (FBN), the cross-linking lysyl oxidases 1 4 (LOX), the lysyl oxidase-like 1 (LOXL1), and proteins of the fibulin 1 5 family. Further to their structural

role, the fibrillin-rich microfibrils possess signaling functions through their ability to bind latent TGF-  -binding proteins (LTBPs) and bone morphogenic proteins (BMPs) and regulate their bioavailability.

Several human connective tissue diseases linked to genetic alterations of molecules forming elastic fibers such as Marfan syndrome (FBN1) or cutis laxa have been associated with a high incidence of POP. This finding has motivated gene targeting studies of the proteins involved in elastogenesis [20, 21]. Elastogenesis starts at midgestation and completes during postnatal development. It is generally admitted that no new elastic fiber is formed in the adult with the exception of a remodeling of the pelvic organs during pregnancy and postpartum recovery. LOXL1 and fibulin-5 seem to be most significant factors in vaginal remodeling after parturition and in age-associated POP. A large proportion of knock-out *Loxl1*^{  /  } mice develop spontaneous POP at the age of 12 weeks or after the first and second delivery and have a significantly lower vaginal elastin content than the wild-type animals. An even higher proportion of fibulin-5 knock-out mice (90%) develop prolapse with advancing age in relation to an abnormal elastic fiber formation associated with increased degradation due to MMP9 elastolytic activity up-regulation by loss of the negative feedback control operated by fibulin-5 on MMP9. These mutant models give insights into the mechanisms controlling homeostasis of the elastic fibers and potentially underlying pelvic prolapse in women

Measuring the elastin at the mRNA level in the vaginal wall probably does not reflect the actual status of elastin in the tissue as several post-transcriptional and translational mechanisms can regulate its turnover. A few studies have investigated the elastin changes in women with POP by immunohistochemistry (Table 2) [18, 22, 23].

According to Karam et al., who compared elastin expression and elastic fiber width (EFW) in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with or without anterior prolapse [22], patients with POP had lower elastin expression and lower EFW than controls. They also found that EFW did not correlate with age in these postmenopausal women. On the contrary, Lin et al. found by immunohistochemistry high elastin expression in the POP group, but after correcting for age and menopausal status there was no difference between the two groups [18].

Fibulin-5 expression has also been investigated by immunohistochemistry in women with or without anterior vaginal wall prolapse [23]. Staining intensity for fibulin-5 was diminished in the POP group compared with controls.

The better understanding of the critical role played by elastin-associated proteins not only in the formation of elastic fibers and their ability to regulate the activity of growth factors, but also in the control of their degradation by MMPs, should open new methods of investigation in the physiopathology of POP.

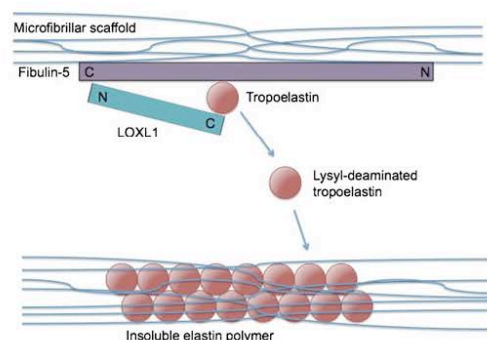


Fig. 3 A simplified model of elastogenesis. Elastin fibers are formed through a highly regulated and stepwise process including the initial formation of a microfibrillar scaffold, the deposition of tropoelastin monomers cross-linked together in a reaction catalyzed by lysyl oxidase

Table 2 Elastin analysis by histology in biopsy specimens from vaginal tissue in women with or without prolapse

Study	Target population and sample size	Menopausal status	Mean age (years)	Party	Biopsy localisation	Histological localization	Analytical methods	Findings: patients with POP compared with controls
[13]	24 women with POP 21 controls	Premenopausal	44.4±5.2	3.0±1.1	Pre-cervical vaginal fascia	Not described	Histology with Verhoeff Van Gieson elastic stains	No statistically significant difference in elastin content
[18]	23 women with POP 15 controls	Premenopausal 8 pre- and 15 post-menopausal	45.6±4 57.4±15.1	2.9±0.8 4 (2–12)	Full-thickness precervical anterior vaginal wall	Not described	Immunohistochemistry	No statistically significant difference in elastin content
[22]	33 women with POP 10 controls	Postmenopausal	70.5 (62–78)	2.5 (2–4)	Full-thickness upper lateral anterior vaginal wall	Muscularis	Immunohistochemistry	Decreased elastin content and fiber width
[28]	12 women with POP 10 controls	Postmenopausal 8 pre- and 4 post-menopausal	70.5 (56–76) 54±7	3 (1.2–3) 2 (1–6)	Full-thickness precervical anterior vaginal wall	Not described	Immunohistochemistry	Decrease staining intensity for fibulin-5
[31]	20 women with POP in prolapsed and nonprolapsed localization	5 pre- and 5 post-menopausal Not described	49±4 61	2 (0–5) 1–4	Full-thickness “redundant” and nonprolapsed vaginal tissue	All layers	Histology with Verhoeff Van Gieson elastic stains	No significant differences in elastin content between prolapsed and nonprolapsed tissues

Morphometric analysis of the vaginal wall

Little is known about the changes in the histomorphometry of the vaginal wall in women with POP. Hypoestrogenism is an important cause of structural modifications in the vaginal wall [24]. Urogenital atrophy and reduction in vaginal wall thickness has been reported to occur after menopause, although without precise morphometry. To date, the histological and morphometric analysis of the vaginal wall in women with POP is still inconclusive.

Histological analyses of the vaginal tissue of patients with or without POP can be used to observe changes in the different components (collagen, elastin, smooth muscle cells, vessels or innervation) of the tissue. Tulikangas et al. used histology to compare the vaginal wall of women with or without enterocele and observed an increase in vaginal wall muscularis thickness in the POP group [25].

Boreham et al. were the first to specifically evaluate the histomorphometric features of the anterior and posterior vaginal wall in women with and without POP [6, 26]. They observed that the morphometry of the vaginal wall muscularis is significantly altered in women presenting POP, with a decrease in the fractional area of smooth muscle in the muscularis layer and disorganized smooth muscle bundles. They suggest that the decreased staining of α -actin in prolapsed vagina may represent a loss of the differentiated phenotype of the smooth muscle cells or may result from apoptosis of smooth muscle cells. They did not find any difference in apical vaginal tissue thickness between the two groups.

Many other reports have published concordant results with the study by Boreham et al. (Table 3) [27–30]. The fraction of smooth muscle in the muscularis of the anterior vaginal wall was significantly decreased in women with POP and there was no significant difference between primary and recurrent cases. Takacs et al. also observed a statistically significantly increased smooth muscle cell apoptotic index in women with POP, suggesting that a decrease in the amount of smooth muscle in the anterior vaginal wall might be due to accelerated apoptosis [28].

Another original approach is to compare the histology of the vaginal wall in two different locations from the same patient to determine whether histological differences were due to intra- or inter-individual variability. Kannan et al. found that histological differences are very subtle and that both prolapsed and nonprolapsed tissues expressed the same changes in collagen, elastin or smooth muscle content [31].

Measurement of the distance between the surface epithelium and the nearest point of the muscularis have also been used to analyze changes in the vaginal tissue of women with or without POP [29, 30]. The mean distance of the smooth muscle fibers from the surface epithelium of the prolapsed group was significantly higher than in the control group. Da

Table 3 Smooth muscle analysis by histology in biopsy specimens from vaginal tissue in women with or without prolapse

Study	Target population and sample size	Menopausal status	Mean age (years)	Parity	Biopsy localisation	Histological localisation	Analytical methods	Findings: patients with POP compared with controls
[25]	13 women with POP 5 women undergoing hysterectomy 13 women undergoing radical hysterectomy	2 pre- and 11 post-menopausal (8 on HRT and 3 no HRT) Not described Not described	66±11 Not described Not described	3, 7±1.2	Full-thickness vagina at the leading edge of the enterocele	All layers	Histology with Movat's pentachrome	Increased muscularis thickness, no statistically significant difference in the vaginal wall thickness among the three groups
[6]	28 women with POP	14 pre- and 14 post-menopausal (5 on HRT and 9 no HRT) Prenopausal	49.3±2.6 39.5±1.5	3, 6±0.3 2, 4±0.4	Full-thickness anterior vaginal apex	Muscularis	Immunohistochemistry (A-SMA)	Decreased fraction of nonvascular smooth muscle
[26]	12 controls 15 women with POP	11 pre- and 4 post-menopausal (4 on HRT) Prenopausal	45.6±3.0 38.5±2.8	3 (0–6) 2 (0–3)	Full-thickness posterior vaginal apex	Muscularis	Immunohistochemistry (A-SMA)	Decreased fraction of nonvascular smooth muscle
[27]	8 controls 11 women with POP 8 controls	Postmenopausal (3 on HRT) 9 pre- and 2 post-menopausal (1 on HRT)	68.4±7.8 45.3±8.0	2.5±1.1 2.0±1.2	Full-thickness anterior vaginal apex	Muscularis	Immunohistochemistry (A-SMA)	Decreased fraction of nonvascular smooth muscle
[28]	6 women with POP 6 controls	Postmenopausal 1 pre- and 4 post-menopausal	61±3 46±5	1 (1–4) 1 (0–5)	Full-thickness anterior vaginal apex	Muscularis	Immunohistochemistry (A-SMA)	Decreased fraction of nonvascular smooth muscle
[32]	31 women with POP	18 Prenopausal 13 Postmenopausal	35.67±4.29 53.64±5.36	4, 7±1.54 2, 8±0.81	Full-thickness anterior and posterior vaginal wall	All layers	Histology with Masson's trichrome	Increased muscularis thickness and total vaginal thickness in the postmenopausal group
[29]	49 women with POP 40 controls	20 pre- and 29 post-menopausal (9 on HRT) 32 pre- and 8 post-menopausal (7 on HRT)	53.94±10.4 46.5±4.03	3 (1–9) 2 (1–4)	Full-thickness anterior middle portion (Aa) of the vagina	All layers	Immunohistochemistry (A-SMA)	Decreased smooth muscle content in the muscularis, increased thickening of the subepithelium
[30]	37 women with POP 47 controls	11 pre- and 26 post-menopausal 41 pre- and 6 post-menopausal	59±1.09 46.40±5.92	4 (1–9) 2 (0–5)	Full-thickness anterior vaginal apex	All layers	Immunohistochemistry (A-SMA)	No statistically significant difference in smooth muscle content, increased thickening of the subepithelium
[31]	20 women with POP in prolapsed and nonprolapsed localization	Not described	61	1–4	Full-thickness “redundant” and nonprolapsed vaginal tissue	All layers	Immunohistochemistry (A-SMA)	No significant differences in smooth muscle content

Silva et al measured vaginal wall thickness in pre- and postmenopausal women who underwent surgery for genital prolapse with grades I–II [32]. The vaginal wall was thicker in the postmenopausal than in the premenopausal group. These thicknesses seem to be due to the muscularis layer, which was also thicker in the postmenopausal group, possibly because of the accumulation of fibrosis in this layer. However, a precise measurement of total vaginal wall thickness is difficult to obtain from vaginal samples because cross-sections must be perfectly perpendicular to the tissue edge. Oblique sections would appear thicker than those perpendiculars.

Vascularization of the vaginal wall

Vascularization of the vaginal wall is extensive. Arteries arise between the muscularis and adventitial layers and spread in a richly developed subepithelial capillary network forming a venous plexus of small veins that drain into larger veins crossing into the muscularis to reach the adventitia.

Few studies have examined the potential difference in vascularization of the vagina between women with and without POP. Boreham et al. observed more frequently large dilated venules in the lamina propria of women with advanced stage anterior prolapse, suggesting that this abnormal vaginal vascularity may result from increased stasis and gravity on the prolapsed tissue [6]. The poor muscularis contractility may contribute to altered mechanical modulation of venous outflow in the prolapsed organ. The fractional area of the blood vessel was similar in the report by Badiou et al. [27].

Lin et al. observed the capillaries surrounding the arterioles in the vaginal wall and found that the number of capillaries surrounding arterioles in women with anterior vaginal prolapse was significantly less than that of the control group ($p < 0.05$) [18]. They suggested that anterior vaginal wall prolapse might result in attenuating blood supply in the upper vagina.

Innervation of the vaginal wall

The innervation of the vaginal wall in patients with POP is poorly evaluated. The integrity of the vagina and its supportive connective tissue is essential for a normal pelvic floor function and anatomy of the pelvic organs. Branches of the hypogastric plexus innervate both the levator ani and the posterior vagina [33]. Denervation injury of the pelvic floor during labor may contribute to loss of vaginal support and therefore may lead to POP [34, 35].

Several studies have evaluated the innervation of the anterior vaginal wall in women with or without POP. Zhu et al. have analyzed the staining of protein gene product 9.5 (PGP 9.5), a neuronal marker for peripheral nerves and ganglia in tissues [36]. They showed that the nerve fibers

profile of vaginal epithelium and subepithelium in women with SUI and POP were significantly lower than those in the control group. By evaluating the anterior vaginal wall innervation using PGP 9.5, Inal et al. observed a decreased number and diameter of the subepithelial nerve fibers in the anterior vaginal wall of women with anterior prolapse than in women with normal vaginal support [29]. Kaplan et al. recently confirmed their findings by describing decreased neuronization in the vaginal wall in the POP group [30].

To date, only two studies have evaluated the innervation of the posterior vaginal wall in women with or without POP. Boreham et al. have used antibodies to S100, a marker that recognizes glial cells and astrocytes, and found that nerve bundles were smaller and fewer in the vaginal muscularis of women of the POP group [26]. Altman et al. found opposite results by using PGP 9.5 antibodies, with an increased nerve fiber density in the subepithelium of the rectovaginal wall of patients with posterior vaginal wall prolapse. They postulated that a compensatory neural regeneration following nerve trauma might play a role in the pathogenic process of pelvic floor disorders [37]. These conflicting results may also be explained by the difference in the method of tissue sample collection, localization and the sensitivity of these two neuronal markers.

Discussion

The pathophysiology of pelvic organ prolapse is multifactorial. Multiparity, trauma, obesity, and aging are associated with connective, muscular, and neuromuscular alterations of the pelvic tissues that are linked to the development of POP. Besides the role of these environmental factors, intrinsic connective tissue disorder is an important contributing factor to the pathogenesis of POP.

Investigations of changes in the vaginal tissue that occur in women with genital prolapse are currently still limited. Several studies have analyzed collagen content or changes in collagen subtypes in the vagina of patients with prolapse compared with controls and produced contrary results. These conflicting results can be explained by the different methods of collagen quantification used in these reports.

Studies on the histomorphometry of the vaginal tissue also found inconclusive results. The biopsy site may vary from one study to another and specimens are not often well defined by histology, making it impossible to determine exactly which layer of the vaginal wall is being analyzed. It is therefore difficult to make comparisons between current studies. Moreover, in some studies, the histological sections are interpreted subjectively by pathologists or measured on randomly selected fields, which can lead to bias. Indeed, the proportions of each constituent of the tissue may vary depending on the layer studied and from one place to another within the same layer.

In most of these studies, the population present large variations in age and menopausal status. Patients in the POP group are older in the postmenopausal period than those in the control group. It is therefore difficult to determine whether these changes are related to POP or rather to ageing. In addition, studies are often conducted on a relatively small number of patients making it difficult to draw conclusions.

Several studies suggest that changes in the morphometry of the vagina, particularly at the muscularis layer, may affect the function of the tissue and contribute to the development of POP [6, 28]. Although these changes are often observed, the mechanism of this transformation is still unclear. On the other hand, some authors have also found normal vaginal tissue in patients with POP, suggesting that the pathophysiology of POP cannot be explained only by an alteration of the quality of the vagina [12].

According to other reviews, the heterogeneity of the patients and the control groups in terms of age, parity, and hormonal status, of the localization of biopsies and the histological methods, as well as the lack of validation of the quantification procedures do not allow clear and definitive conclusions to be drawn [38, 39]. With the present state of knowledge, it is unclear whether the changes observed in the vaginal tissue are a cause or an effect of POP. Therefore, it will be useful to integrate these concepts into studies using molecular biology and experimental basic research. Another line of research is to correlate these results with the biomechanical properties of the tissue to help determine the role of each component in the changes that we observe in POP.

Conclusion

This review shows that current knowledge of the histological changes observed in women with POP are inconclusive and relatively limited, probably because of the lack of standardization of biopsy sites and methods of quantification. More studies are needed in this specific field to better understand the mechanisms that lead to POP.

Conflicts of interest The authors have no conflicts of interests, except Michel Cosson, who is a consultant for Ethicon, AMS, Boston, Ipsen, Olympus and is a researcher for Ethicon.

References

- Bump RC, Norton PA (1998) Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am* 25:723–746
- Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO et al (1997) Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 89:501–506
- DeLancey JO (1992) Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 166:1717–1724, discussion 1724–1718
- Farrell SA, Dempsey T, Geldenhuys L (2001) Histologic examination of “fascia” used in colporrhaphy. *Obstet Gynecol* 98:794–798
- Weber AM, Walters MD (1997) Anterior vaginal prolapse: review of anatomy and techniques of surgical repair. *Obstet Gynecol* 89:311–318
- Boreham MK, Wai CY, Miller RT et al (2002) Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187:56–63
- Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20:33–43
- Colige A, Ruggiero F, Vandenbergh I et al (2005) Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I–III and V. *J Biol Chem* 280:34397–34408
- Bailey AJ (2001) Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 122:735–755
- Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP et al (1990) Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 95(Pt 4):649–657
- Wenstrup RJ, Florer JB, Brunsell EW et al (2004) Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 279:53331–53337
- Makinen J, Soderstrom KO, Kiilholma P, Hirvonen T (1986) Histological changes in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Arch Gynecol* 239:17–20
- Kökçü A, Yanik F, Cetinkaya M et al (2002) Histopathological evaluation of the connective tissue of the vaginal fascia and the uterine ligaments in women with and without pelvic relaxation. *Arch Gynecol Obstet* 266:75–78
- Takano CC, Girao MJ, Sartori MG et al (2002) Analysis of collagen in parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 13:342–345, discussion 345
- Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR (2007) Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron* 38:580–583
- Liapis A, Bakas P, Pafiti A et al (2001) Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97:76–79
- Goepel C, Heffler L, Methfessel HD, Koelbl H (2003) Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:659–664
- Lin SY, Tee YT, Ng SC et al (2007) Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18:43–48
- Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM et al (2005) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Obstet Gynecol* 106:953–963
- Liu X, Zhao Y, Gao J et al (2004) Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 36:178–182
- Budatha M, Roshanravan S, Zheng Q et al (2011) Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans. *J Clin Invest* 121:2048–2059
- Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmer PE (2007) Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int* 100:346–350
- Takacs P, Nassiri M, Viciana A et al (2009) Fibulin-5 expression is decreased in women with anterior vaginal wall prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:207–211

24. Calleja-Agius J, Brincat MP (2009) Urogenital atrophy. *Climacteric* 12:279–285
25. Tulikangas PK, Walters MD, Brainard JA, Weber AM (2001) Enterocele: is there a histologic defect? *Obstet Gynecol* 98:634–637
26. Boreham MK, Wai CY, Miller RT et al (2002) Morphometric properties of the posterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187:1501–1508, discussion 1508–1509
27. Badiou W, Granier G, Bousquet PJ et al (2008) Comparative histological analysis of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse or control subjects. A pilot study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19:723–729
28. Takacs P, Gualtieri M, Nassiri M et al (2008) Vaginal smooth muscle cell apoptosis is increased in women with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19:1559–1564
29. Inal HA, Kaplan PB, Usta U et al (2010) Neuromuscular morphometry of the vaginal wall in women with anterior vaginal wall prolapse. *Neurourol Urodyn* 29:458–463
30. Kaplan PB, Usta U, Inal HA et al (2011) Neuromuscular morphometry of the uterine ligaments and vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Neurourol Urodyn* 30:126–132
31. Kannan K, McConnell A, McLeod M, Rane A (2011) Microscopic alterations of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse. *J Obstet Gynaecol* 31:250–253
32. Da Silva Lara LA, da Silva AR, Rosa ESJC et al (2009) Menopause leading to increased vaginal wall thickness in women with genital prolapse: impact on sexual response. *J Sex Med* 6:3097–3110
33. Hollabaugh RS, Steiner MS, Dmochowski RR (2001) Neuroanatomy of the female continence complex: clinical implications. *Urology* 57:382–388
34. Sultan AH, Kamm MA, Hudson CN (1994) Pudendal nerve damage during labour: prospective study before and after childbirth. *Br J Obstet Gynaecol* 101:22–28
35. Tetzschner T, Sorensen M, Lose G, Christiansen J (1997) Pudendal nerve function during pregnancy and after delivery. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 8:66–68
36. Zhu L, Lang J, Chen J, Chen J (2004) Study on nerve fiber density in anterior vaginal epithelium for stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 15:272–275
37. Altman D, Zhang A, Falconer C (2006) Innervation of the rectovaginal wall in patients with rectocele compared to healthy controls. *Neurourol Urodyn* 25:776–781
38. Alperin M, Moalli PA (2006) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:544–550
39. Kerkhof MH, Hendriks L, Brolmann HA (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse—a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20:461–474

Publication n°2

Int Urogynecol J
DOI 10.1007/s00192-014-2431-9

ORIGINAL ARTICLE

Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse

**Laurent de Landsheere • Silvia Blacher • Carine Munaut •
Betty Nusgens • Chrystèle Rubod • Agnès Noel •
Jean-Michel Foidart • Michel Cosson • Michelle Nisolle**

Received: 22 January 2014 / Accepted: 1 May 2014
© The International Urogynecological Association 2014

Introduction :

L'évaluation des modifications des propriétés biochimiques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital est complexe et ce pour plusieurs raisons.

Premièrement, il est difficile d'obtenir des groupes homogènes de patientes, notamment en termes d'âge et de statut ménopausique. Comme décrit précédemment, les patientes présentant un prolapsus génital sont souvent plus âgées que les patientes contrôles opérées pour une hystérectomie. De plus, il est difficile de prélever des échantillons de tissu vaginal de bonne qualité au niveau du tiers moyen du vagin en l'absence de prolapsus.

Deuxièmement, les méthodes d'évaluation de ces prélèvements varient d'une étude à l'autre et sont souvent analysées subjectivement par un anatomopathologiste ce qui ne permet qu'une évaluation semi-quantitative. La qualité des échantillons analysés et leur localisation sont également très variables ce qui reflète l'hétérogénéité des études dans ce domaine et explique les résultats parfois très contradictoires.

Dans ce travail, nous avons utilisé une nouvelle méthode d'analyse histomorphométrique pour caractériser la composition de la paroi vaginale dans deux localisations différentes chez un même patiente présentant un prolapsus génital afin d'obtenir des échantillons de qualité équivalente et d'éviter cette variabilité interindividuelle.

Méthodologie du protocole expérimental d'analyse immuno-histologique

Nous avons mis au point un protocole de prélèvement très standardisé afin d'obtenir des prélèvements de bonne qualité lors d'interventions chirurgicales pour cure de prolapsus génital (groupe prolapsus) (figure 14).

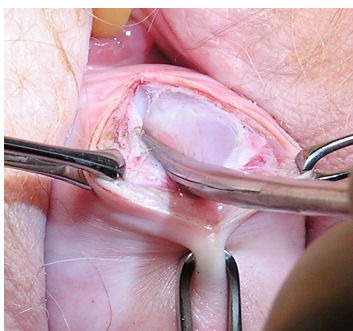


Figure 14 : Illustration de la standardisation des prélèvements réalisés lors d'une cure de cystocèle par voie vaginale. Infiltration profonde à la Xylocaïne adrénalinée diluée permettant de prélever toute l'épaisseur de la paroi vaginale antérieure (M. Cosson, données personnelles)

Nous avons sélectionné 2 régions à comparer dans le groupe prolapsus, la région la plus prolabée et la région péricervicale (figure 15).

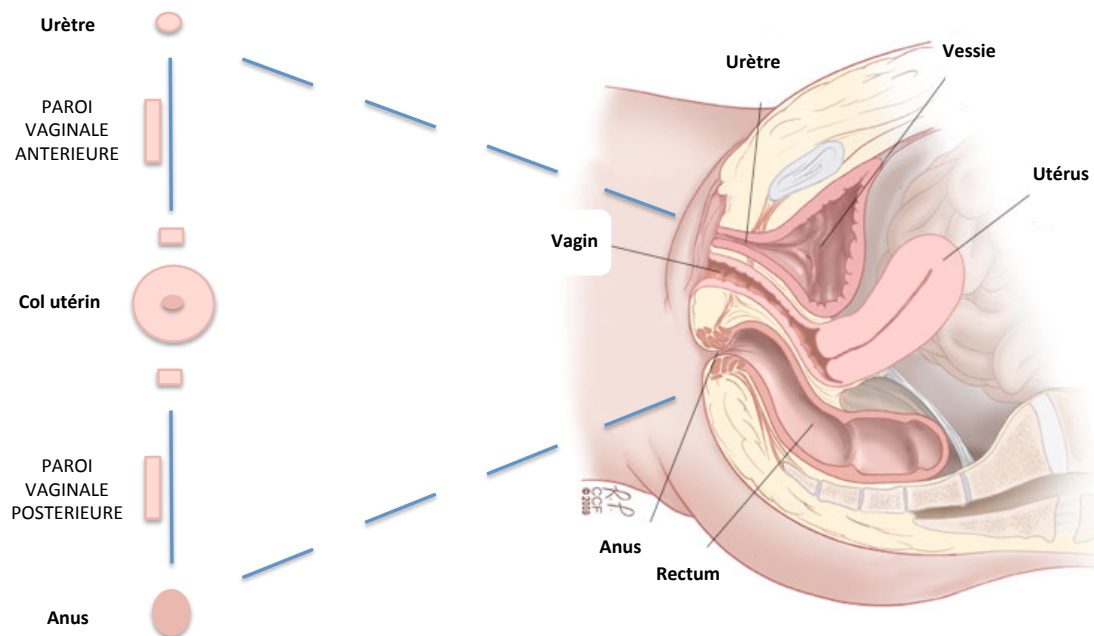


Figure 15 : Protocole de prélèvement des tissus vaginaux lors d'une cure de prolapsus (L. de Landsheere, données personnelles ; pelvis: Copyright © 2009 Cleveland Clinic).

Nous avons ensuite déterminé les colorations et immuno-marquages les plus adéquats pour mettre en évidence les différents composants du tissu vaginal (figure 4):

- L'Hématoxyline éosine (HE) qui permet de contrôler la qualité des prélèvements.
- Le Trichrome de Masson qui permet de mettre en évidence les fibres de collagènes et les fibres musculaires
- L'Orcéine qui permet de mettre en évidence les fibres élastiques
- L'Alpha-Smooth Actin (α -SMA) qui permet de mettre en évidence les cellules musculaires lisses.

Résultats

Les images des coupes histologiques ont été acquises à l'aide du système de microscopie virtuelle dotSlide (Olympus, BX51TF, Belgium) permettant de digitaliser l'entièreté d'une coupe histologique à fort grossissement (100x) produisant une image virtuelle dans laquelle la taille des pixels est de 0.65 μm .

Les différentes régions d'intérêt ont été délimitées manuellement à l'aide du logiciel de traitement d'image Adobe Photoshop CS3 (version 10.0.1) (figure 16).

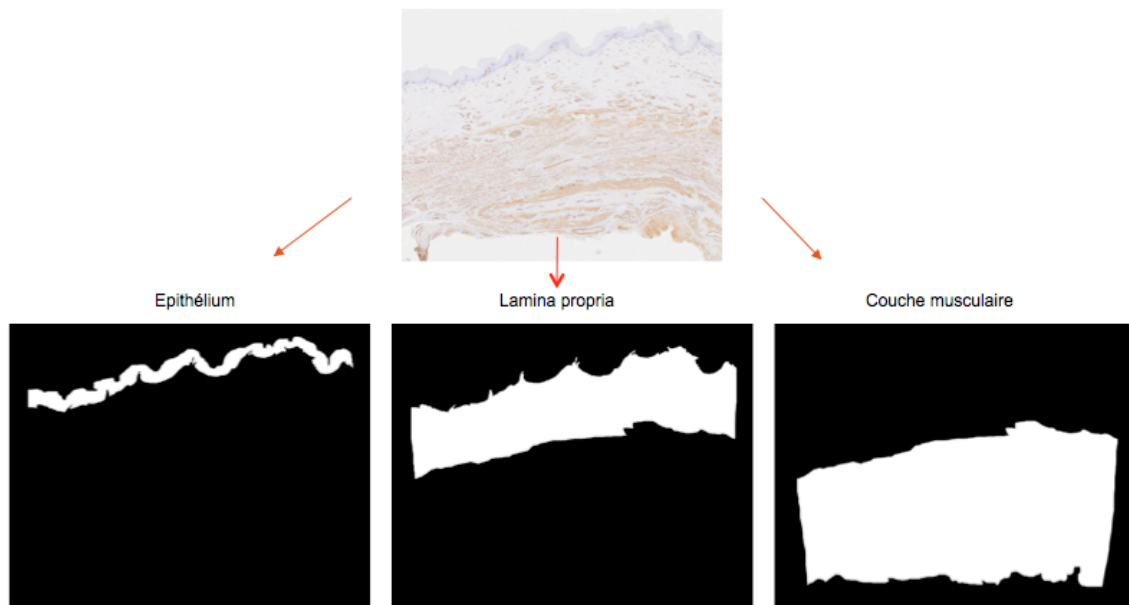
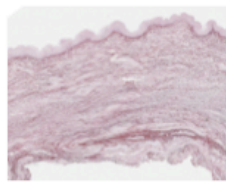


Figure 16 : Contournage manuel des couches de la paroi vaginale permettant de délimiter les régions d'intérêt (LBTB, données personnelles).

Différentes mesures de densité des différents constituants de la lamina propria et de la couche musculaire ont été effectuées par détection des composants rouges après un seuillage automatique par le logiciel d'analyse d'image MATLAB (7.9) (Mathworks, Inc.) (figures 17-19).



Lamina propria

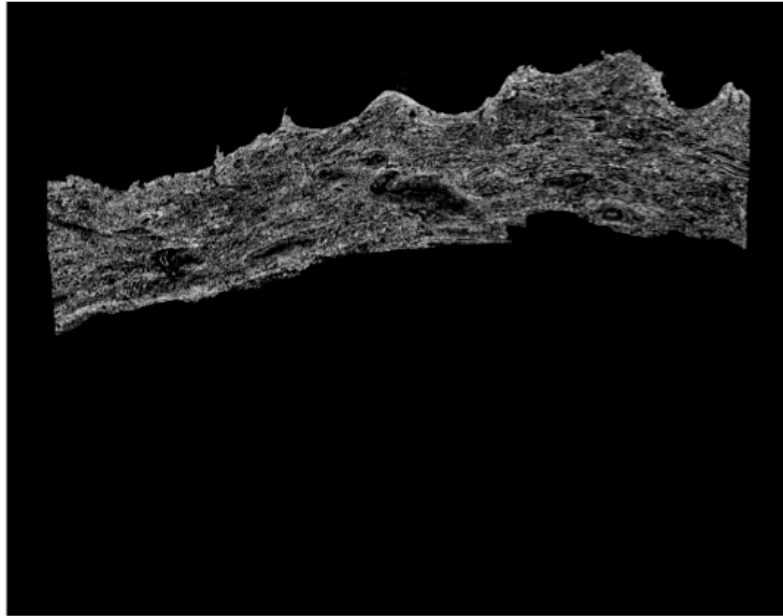
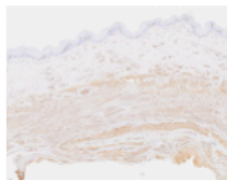


Figure 17 : Détection des fibres d'élastine dans la lamina propria à partir d'une coupe histologique après coloration à l'orcéine (LBTD, données personnelles).



Lamina propria

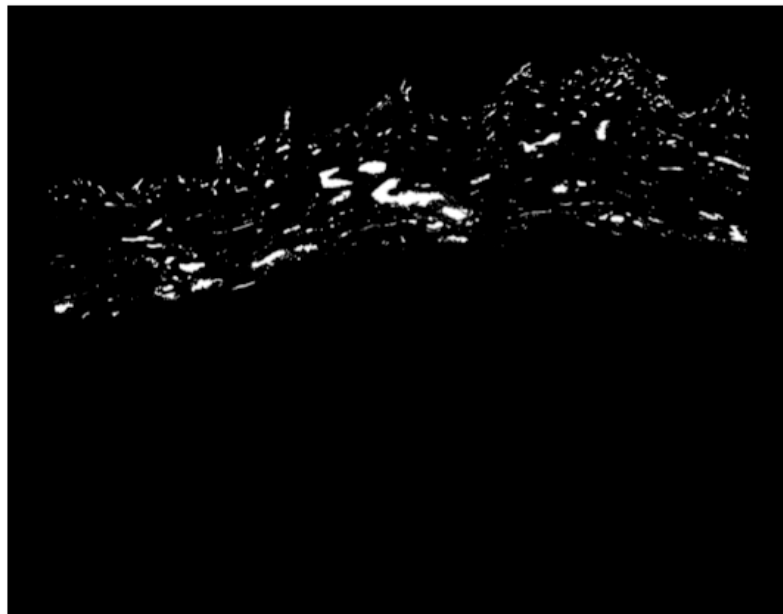


Figure 18 : Détection des vaisseaux dans la lamina propria à partir d'une coupe histologique après marquage par l' α -SMA (LBTD, données personnelles).

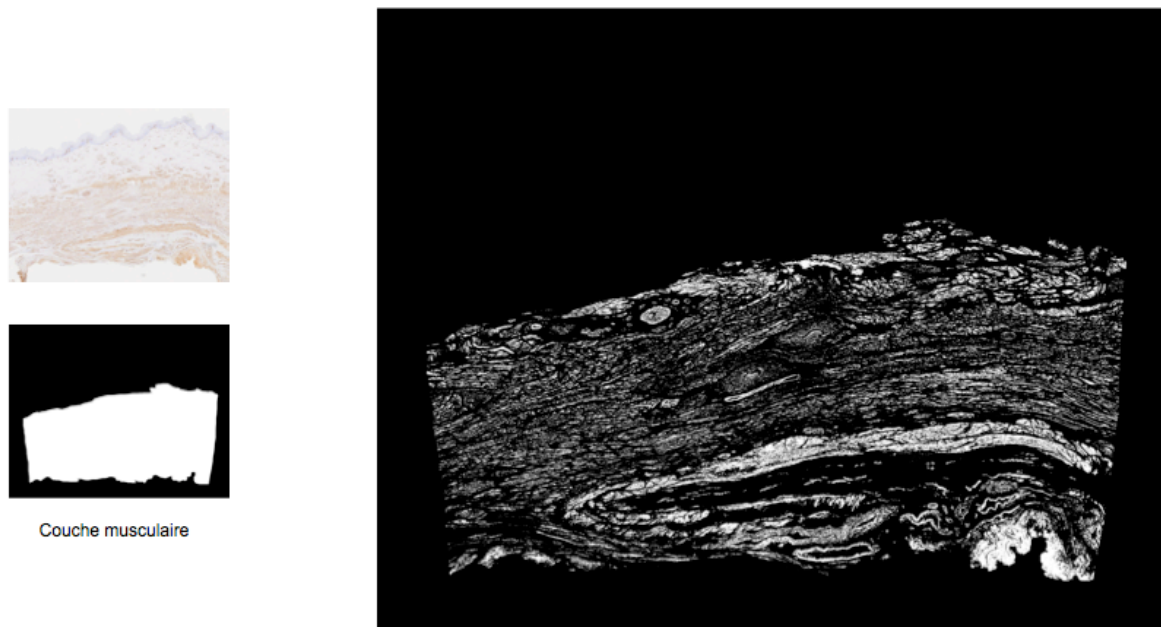


Figure 19 : Détection des cellules musculaires lisses dans la muscularis à partir d'une coupe histologique après marquage par l' α -SMA (LBTD, données personnelles).

L'ensemble de ces étapes a permis de mesurer les densités de chacun des composants de la paroi vaginale couche par couche et de réaliser une image composite qui met en évidence les fibres élastiques, les vaisseaux et les cellules musculaires lisses (figure 20).

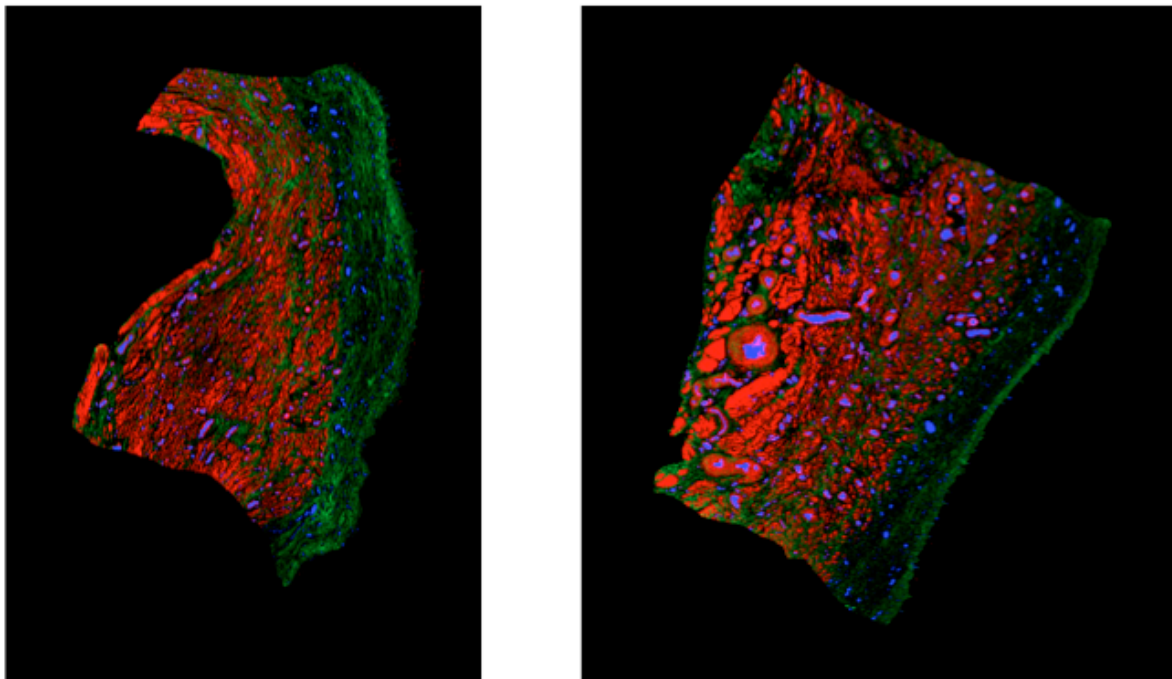


Figure 20 : Réalisation d'une image composite où les fibres musculaires apparaissent en rouge, les vaisseaux en bleu et les fibres élastiques en vert (LBTD, données personnelles).

Résumé des résultats :

Nous avons analysé les différences histomorphométriques entre deux localisations de la paroi vaginale de 15 patientes opérées pour cure de prolapsus antérieur et/ou postérieur. Les prélèvements ont été réalisés de manière très standardisée au niveau de la région la plus prolabée, correspondant aux points POP-Q Ba ou Bp et au niveau de la région péricervicale, correspondant aux points POP-Q C ou D. Les proportions de collagène, d'élastine, de vaisseaux et de cellules musculaires lisses ont été comparées dans la lamina propria et dans la couche musculaire de ces deux localisations.

Nous n'avons pas observé de différence significative de proportion de collagène, de vaisseaux et de cellules musculaires lisses entre ces deux régions considérées comme « prolabées » et « non-prolabées ».

Par contre, une diminution de la quantité d'élastine a été observée dans la lamina propria et dans la couche musculaire des tissus vaginaux de la région la plus prolabée par rapport à la région péricervicale. Cette différence était significative dans la lamina propria pour la paroi vaginale antérieure ($p < 0.05$) et postérieure ($p < 0.05$) et dans la couche musculaire de la paroi vaginale antérieure ($p < 0.01$). Les densités d'élastine ont également été analysées pour chaque patiente individuellement et nous avons constaté que la densité d'élastine était systématiquement plus faible dans les tissus prolabés par rapport aux non-prolabés.

Discussion :

Le principal résultat de cette étude est la mise en évidence d'une diminution significative de la densité d'élastine de la région la plus prolabée de la paroi vaginale par rapport à la région péricervicale chez des patientes présentant un prolapsus génital.

L'élastine semble être un élément déterminant du maintien de l'intégrité des tissus conjonctifs qui sont soumis à des contraintes. La diminution de la proportion en élastine du tissu le rendrait plus rigide et moins résistant aux forces mécaniques.

Cette étude présente cependant certaines limites dont la principale est l'absence de groupe contrôle. Les prélèvements proviennent d'une même patiente présentant un prolapsus génital et de ce fait, la région considérée comme « non-prolabée » n'est pas sensu stricto

une région « contrôle ». Il est donc impossible de déterminer par cette étude si ces changements de composition entre ces deux régions sont physiologiques ou pathologiques.

De plus, le nombre restreint de patientes incluses dans cette étude, bien que comparable à celui de la littérature dans ce domaine, en limite la puissance statistique. Ceci pourrait expliquer que nous n'avons pas observé de différence significative de densité de collagène, de vaisseaux ou de cellules musculaires lisses.

L'originalité de ce travail réside cependant dans l'utilisation d'une nouvelle méthode de quantification des constituants des tissus conjonctifs de la paroi vaginale qui permet d'analyser l'entièreté de la coupe histologique. Cette méthode d'analyse permet d'éviter les limites d'interprétation liées à l'étude de « hot spots » qui ne reflètent pas nécessairement la composition réelle du tissu et de proposer une quantification plus reproductible et moins observateur-dépendant.

En conclusion, cette étude souligne le rôle prépondérant de l'élastine dans la physiopathologie du prolapsus génital sans toutefois pouvoir déterminer si la diminution d'élastine est une cause ou une conséquence dans l'apparition de ce prolapsus. Ce travail souligne également la difficulté de mener des études sur les changements histologiques du tissu vaginal dans cette pathologie et l'importance de standardiser les méthodes d'analyse et de quantification lors de futures recherches dans ce domaine.

Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse

Laurent de Landsheere · Silvia Blacher · Carine Munaut · Betty Nusgens · Chrystèle Rubod · Agnès Noel · Jean-Michel Foidart · Michel Cosson · Michelle Nisolle

Received: 22 January 2014 / Accepted: 1 May 2014
© The International Urogynecological Association 2014

Abstract

Introduction and hypothesis The purpose of this study was to analyze the histomorphometric properties of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse (POP).

Methods In 15 women undergoing surgery for POP, full-thickness biopsies were collected at two different sites of location from the anterior and/or posterior vaginal wall. Properties of the precervical area (POP-Q point C/D) were compared with the most distal portion of the vaginal wall (POP-Q point Ba/Bp) using histological staining and immunohistochemistry. The densities of total collagen fibers, elastic fibers, smooth muscle cells, and blood vessels were determined by combining high-resolution virtual imaging and computer-assisted digital image analysis.

Results The mean elastin density was significantly decreased in the lamina propria and muscularis layer of the vaginal wall from the most distal portion of the prolapsed vaginal wall compared with the precervical area. This difference was statistically significant in the lamina propria

for both anterior (8.4 ± 1.2 and 12.1 ± 2.0 , $p=0.048$) and posterior (6.8 ± 0.5 and 10.1 ± 1.4 , $p=0.040$) locations, and in the muscularis for the anterior (5.2 ± 0.4 and 8.4 ± 1.2 , $p=0.009$) vaginal wall. There were no statistically significant differences in the mean densities of collagen fibers, smooth muscle cells or blood vessels between the two locations.

Conclusions In this study, we observed changes in elastin density in two different locations of the vaginal wall from women with POP. The histomorphometric properties of the vaginal wall can be variable from one place to another in the same patient. This result supports the existence of most vulnerable locations within the vaginal wall and the potential benefit of site-specific prolapse surgery.

Keywords Vagina · Pelvic organ prolapse · Collagen · Elastin · Connective tissue

Abbreviations

POP	Pelvic organ prolapse
ECM	Extracellular matrix
α SMA	Alpha smooth actin
RGB	Red green blue

Introduction

The pathophysiology of pelvic organ prolapse is multifactorial. Multiparity, trauma, obesity, and aging are associated with alterations in the pelvic tissues that lead to the development of pelvic organ prolapse (POP) [1]. In addition to these environmental factors, genetic predisposition is an important contributing factor to the pathogenesis of POP [2].

Pelvic organ support is the result of a complex balance and interactions between the connective tissue of the pelvic support structure [3]. The loss of pelvic support holding the

L. de Landsheere (✉) · J.-M. Foidart · M. Nisolle
Department of Obstetrics and Gynecology, University of Liège, CHR
La Citadelle, Boulevard du 12e de ligne, no. 1, 4000 Liège, Belgium
e-mail: ldelandsheere@gmail.com

L. de Landsheere · S. Blacher · C. Munaut · A. Noel ·
J.-M. Foidart · M. Nisolle
Laboratory of Tumor and Development Biology, CHU,
GIGA-Cancer, University of Liège, Avenue de l'Hôpital,
3—Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, Belgium

B. Nusgens
Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-Cancer,
University of Liège, Avenue de l'Hôpital, 3—Pathology Tower
(B23), Sart-Tilman, Belgium

C. Rubod · M. Cosson
Department of Gynecologic Surgery, Hôpital Jeanne de Flandre,
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Avenue Oscar
Lambret, no. 2, 59037 Lille Cedex, France

Published online: 28 May 2014

 Springer

bladder in place may cause cystocele [4]. Two theories have been proposed to explain the etiology of anterior vaginal wall prolapse. The lateral wall defect theory suggests that cystocele results from the detachment of the lateral vaginal support to the arcus tendineus fasciae pelvis (ATFP) [5]. The central defect theory is based on the site-specific weakness of the pubocervical fascia [6]. Improving knowledge about changes in the composition of the vaginal wall may help to better understand the anatomical changes that lead to POP.

Histologically, the vaginal wall is composed of four layers. The epithelial layer is a superficial nonkeratinized stratified squamous epithelium. The subepithelial layer, or lamina propria, is a dense connective tissue layer primarily composed of fibrillar collagens and elastin populated by fibroblasts. The muscularis is composed of inner circular and outer longitudinal smooth muscle cells surrounded by connective tissue. The adventitia is a loose connective tissue layer that separates the vaginal wall muscularis and the paravaginal tissue [7].

The connective tissue of the vagina is composed in varying proportions of cellular elements surrounded by an extracellular matrix (ECM). Collagen and elastin are fundamental fibrillar components of the ECM that play an important role in the mechanical strength of the vaginal tissue [7]. Collagens I, III, and V are the primary collagen subtypes present in the vagina. Elastic fibers are key architectural elements of connective tissues. These fibers provide extensibility and recoil ability to elastic tissues [8]. This property of resilience is important for the maintenance of the structural integrity of the vagina when subjected to mechanical strain.

Boreham et al., by specifically evaluating the histomorphometric features of the vaginal wall in women with POP, suggested that the characteristics of the vaginal wall might be significantly altered in women with POP [9, 10]. However, assessing the changes in the vaginal tissue that occur in women with POP is challenging for many reasons. The methodology varied greatly from one study to another. The biopsy sites and sample sizes can be variable, and specimens are not often well defined histologically, making it impossible to determine which layer of the vaginal wall is being analyzed [11].

In this work, a novel histomorphometric analysis method was used to characterize the histomorphometric properties in two different locations of the vaginal wall from women with POP. This methodology combines high-resolution virtual imaging of full-thickness biopsies and computer-assisted image analysis [12, 13].

Materials and methods

Patients

From February to May 2012, a total of 15 women underwent vaginal surgical procedures for pelvic organ prolapse at the

Department of Gynecological Surgery of the University Hospital Jeanne de Flandre, Lille, France. Institutional Review Board approval was obtained prior to the start of the study (CPP 09/62) and all patients signed an informed consent form prior to surgery. Demographic characteristics (age, parity, BMI, menopausal status, POP-Q stage, and type of surgery) were collected prospectively and stored in a dedicated database. Study exclusion criteria were previous pelvic surgery, connective tissue disease, and history of endometriosis or pelvic cancer. All patients underwent an assessment of their POP stage according to the International Pelvic Organ Prolapse Quantification system [14].

Tissue collection

Full-thickness vaginal tissue samples were taken from each woman at two different sites of the vaginal wall. Biopsies were collected only in the compartment involved during the POP repair. The first sample was obtained with Metzenbaum scissors, after carrying out deep infiltration with diluted lidocaine solution followed by a sagittal midline incision, in the most distal portion of the anterior (POP-Q point Ba) and/or posterior (POP-Q point Bp) vaginal wall. The second sample was collected from the precervical area of the anterior (POP-Q point C) and/or posterior (POP-Q point D) vaginal wall. Each specimen measured $\geq 10 \times 5$ mm. We performed standard light microscopic techniques to confirm that all the layers were present in the collected tissues.

Histological material

Human biopsy specimens were fixed in buffered 4 % formalin, embedded in paraffin, and serially sectioned at a thickness of 5 μ m. After sectioning, the samples were stained with routine dyes (hematoxylin-eosin) for conventional histopathological evaluation or with specific stains, such as Masson's trichrome or orcein, to evaluate collagen and elastic fibers respectively [15].

Alpha SMA immunohistochemistry

To unmask antigens in paraffin-embedded sections, the slides were autoclaved for 11 min at 126 °C and 1.4 bar in citrate buffer (S 2032; Dako, Glostrup, Denmark). To analyze alpha smooth muscle actin, a mouse monoclonal antibody was used (α SMA, clone 1A4, M 0851; Dako). The slides were washed in Tris-HCl, pH 7.6. Endogenous peroxidases were blocked with 3 % H₂O₂ for 20 min at room temperature (RT). The slides were incubated with normal goat serum (NGS; Hormonology Laboratory, Marloie, Belgium) before being incubated with the second primary Ab, α SMA (1/400 in NGS/Tris 10 %), for 90 min at 37 °C. A goat anti-mouse Ab conjugated to biotin (E 0433; Dako) diluted 1/400 in Tris

buffer for 30 min at RT was used as the secondary Ab, followed by incubation for 30 min at RT with streptavidin-alkaline phosphatase (P 0397; Dako) diluted 1/500. DAB + (Liquid DAB + substrate chromogen system, K3468; Dako) was applied for 15 min at RT in the dark as a chromogen, and the sections were rinsed in H₂O. The slides were finally counterstained with hematoxylin and mounted with Eukitt medium for microscope observation. Negative controls were performed both by omission of the primary antibody and by replacement of this primary antibody by an appropriate isotype control (mouse IgG2, kappa; Dako).

Image acquisition

Virtual images were acquired with the fully automated digital microscopy system dotSlide (BX51TF; Olympus, Aartselaar, Belgium) coupled with a Peltier-cooled high-resolution digital color camera (1,376 x 1,032 pixels; XC10, Olympus). Images of the whole tissue sections were digitized at high magnification (×100), producing virtual images in which the pixel size was 0.65 μm.

Image processing and measurements

Image processing consisted of the transformation of an original color image into a binary image in which all pixels belonging to the objects of interest, i.e., smooth muscle cells, elastic fibers, and blood vessels in the present case, took a value of 1 and those of the background a value of 0. Images were registered in full red/green/blue (RGB) color.

Smooth muscle cells in the muscularis layer were identified by immunohistochemical staining with αSMA antibodies and could be distinguished by a brownish color. Because structure detection was primarily based on color segmentation, weakly stained regions could have remained unrecognized. To increase the contrast between the muscle and the surrounding tissue, the excess red component (two times the red value minus the blue value minus the green value) was calculated. After splitting the resulting color image into its RGB components, muscular structures were extracted from the enhanced red component using automatic entropy thresholding [16]. Finally, an erosion filter was used to eliminate small artifacts, and the resulting image was used as a marker for a geodesic reconstruction of the final binary image [17]. It is worth noting that the vaginal muscularis consisted of smooth muscle bundles and vascular complexes, both of which were composed of smooth muscle cells detected by αSMA antibodies. Therefore, the staining of these two structures was similar.

Orcein appears to be an appropriate specific stain, providing optimal contrast between elastic fibers and the tissue background. After splitting the original color image into its RGB components, elastic fibers could be directly extracted from the red component using automatic entropy thresholding

[16]. In only a few cases did the operator have to increase the contrast.

Blood vessel lumens were identified as the lightest structures in the tissue (the value of the threshold depended on the average value of the background). To avoid the selection of other structures (for example, holes in the tissue), only lumens neighboring previously detected vessel walls were considered. Finally, the resulting binary images were systematically compared with the corresponding originals, and lumen vessels not detected automatically were added manually by a single physician (L.d.L.).

Masson's trichrome staining identified vaginal wall collagen fibers, which appeared green. This stained area represents the non-elastic fraction of the ECM and does not allow the determination of the density of each subtype of collagen fiber. The green component of the RGB color image was first extracted, and a median filter was applied to eliminate noise [17]. Collagen fibers were then extracted using automatic entropy thresholding [16]. The resulting binary images were systematically compared with the corresponding originals, and in cases in which the detection of collagen fibers was not accurate, the threshold was fixed manually.

To perform local measurements, the boundary between the two layers of interest, i.e., the lamina propria and the muscularis layer, was drawn manually on each histological section image by the same physician (L.d.L.).

The following values were determined:

1. Proportions of the area occupied by the lamina propria and the muscularis in relation to the total histological section
2. Muscle density in the muscularis: area occupied by smooth muscle cells in the muscularis layer divided by the area of the muscularis layer.
3. Vessel density in the muscularis: area occupied by blood vessels in the muscularis layer divided by the area of the muscularis region.
4. Vessel density in the lamina propria: area occupied by blood vessels divided by the area of the lamina propria.
5. Elastin density in the muscularis: area occupied by elastic fibers divided by the area of the muscularis.
6. Elastin density in the lamina propria: area occupied by elastic fibers divided by the area of the lamina propria.
7. Total collagen density in the muscularis: area occupied by the total collagen content divided by the area of the muscularis.
8. Total collagen density in the lamina propria: area occupied by the total collagen content divided by the area of the lamina propria.

Image processing and measurements were performed using the image analysis toolbox of MATLAB (7.9; Mathworks). Statistical analysis was performed with the statistics toolbox

of the Matlab (9.2) (Mathworks). Previously described densities were first calculated for each patient at each considered location. Mean densities were determined by each location. The results were expressed as the means \pm standard error of the mean (SEM). The Mann–Whitney test was used to compare the mean parameters values for the two groups. The results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The demographic and surgical characteristics of the women included in the study are presented in Table 1. Most of the patients were postmenopausal (86.7 %), and none of the patients had received any hormonal treatment in the 3 months prior to surgery.

Among the 15 patients, 6 patients (40 %) underwent isolated anterior repair, 5 patients (33.3 %) underwent isolated posterior repair, and 4 patients (26.7 %) underwent combined anterior and posterior repair. Tissue samples were only taken from the compartment involved in the POP repair at two different sites from the anterior vaginal wall in 10 cases and from the posterior vaginal wall in 9 cases.

In order to prove the homogeneity of the standardized tissue collection from the two predefined locations, we evaluated the mean area of the two layers of interest, the muscularis and lamina propria, in all biopsies ($n=38$; Fig. 1). No significant difference was observed in terms of sample size, either in the anterior ($p=0.30$) or the posterior region ($p=0.80$).

Smooth muscle cells, blood vessels, elastic and collagen fibers were first detected in the muscularis and lamina propria in histological sections in the anterior and/or the posterior regions from each patient (Fig. 2, 3). The corresponding

densities in each layer were calculated, and the mean values for each location, middle third or precervical portion of the anterior ($n=10$) and the posterior vaginal wall ($n=9$) are reported in Table 2.

The total collagen content of the two tissue locations was not statistically significantly different. The mean smooth muscle and blood vessel density were not significantly different for the middle third portion of the vaginal wall and the precervical region (Table 2).

A lower mean elastin density was observed in the lamina propria and in the muscularis layer of the most distal portion of the vaginal wall. This difference was statistically significant in the lamina propria for both anterior ($p=0.048$) and posterior ($p=0.040$) locations and in the muscularis for the anterior ($p=0.009$) vaginal wall.

More detailed analysis was performed to compare the elastin densities in the two regions for each patient individually. We found that for all the studied cases, the elastin density was systematically lower in the middle third portion of the vaginal wall (Fig. 4).

Discussion

The main finding of this study is the significant decrease in the elastin density in the lamina propria and muscularis layer in the most distal portion of the vaginal wall of women suffering from POP. This difference was statistically significant for the muscularis of the anterior vaginal wall and for the lamina propria of both the anterior and posterior vaginal wall. Elastic fibers are the key architectural elements of connective tissues that are subjected to mechanical strain, providing extensibility and recoil ability to elastic tissues. The decrease in elastin content may cause changes in the properties of the vaginal wall, making it more rigid and less resistant to mechanical forces.

Elastin density was lower in the anterior vaginal wall, but the degree of prolapse is often greater in the anterior vaginal wall than in the posterior vaginal wall. To assess the correlation with the severity of POP, we calculated the elastin density based on the POP-Q stage. We did not find any relationship between these variables, but the number of patients in the present study is most likely too low to be able to draw reliable conclusions.

The finding of this study allows the variability of vaginal composition to be highlighted in different locations of the vaginal wall from the same women presenting with POP. Tissue quality is worse at the most distal portion of the vaginal wall compared with regions where stress is lower. This observation confirms that the repair of this damage by the technique of site-specific repair must be a good option in the surgical management of genital prolapse, at a time when the use of synthetic mesh is controversial.

Table 1 Demographic and surgical characteristics

Characteristic	<i>n</i> =15
Age, years (mean \pm SD)	62.2 \pm 10.8
BMI, kg/m ² (mean \pm SD)	29.3 \pm 2.5
Vaginal parity, median (range)	3 (1–8)
Menopause, <i>n</i> (%)	13 (86.7)
POP stage, median (range)	3 (2–3)
Type of surgery, <i>n</i>	
Anterior colporrhaphy	2
Anterior Prolift®	4
Posterior colporrhaphy	1
Posterior Prolift®	4
Anterior and posterior Prolift®	4

SD standard deviation, BMI body mass index, POP pelvic organ prolapse

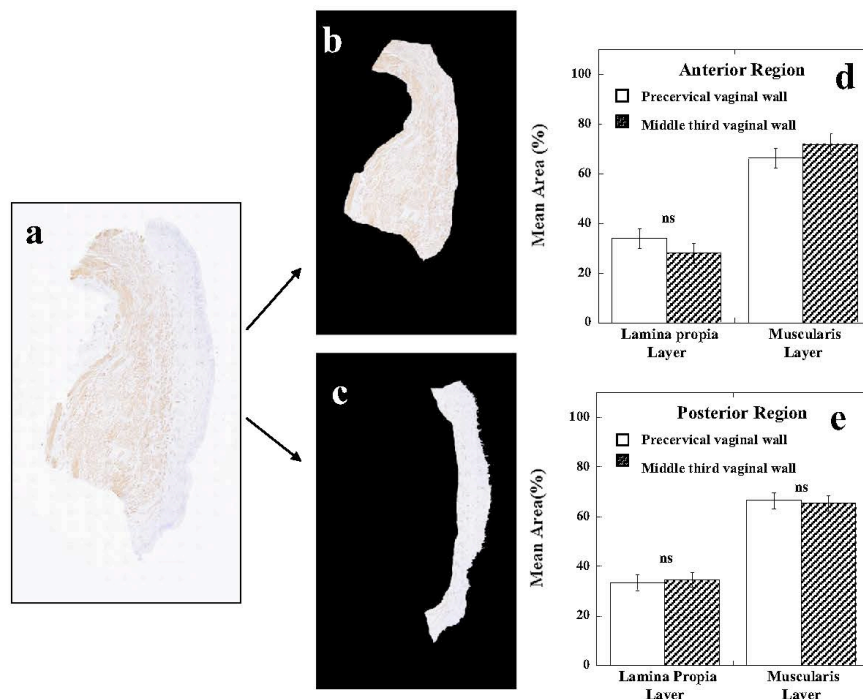


Fig. 1 **a** αSMA-stained histological section, **b** muscularis layer, **c** lamina propria. Mean area of lamina propria and muscularis for precervical and middle third portion of **d** the anterior ($n=10$) and **e** the posterior vaginal

wall ($n=9$). The mean area is expressed as a percentage of the total histological section

The mean strength of this study is the comparison of two different biopsy sites from the same patient, thus avoiding interindividual variability and allowing the collection of samples of similar quality. In previous studies, the major limitation was matching the prolapsed and control groups in terms of age, menopausal status, hormone therapy, and sample location because the characteristics of patients treated for POP are often different from those of control patients for several reasons [9, 18–20]. First, patients undergoing surgery for POP are frequently postmenopausal and older than patients undergoing hysterectomy for benign reasons. Second, it is difficult to obtain full-thickness and large-sized biopsies from the middle third portion of the vaginal wall from patients without POP. Samples taken from the control group are most often collected from the vaginal apex during hysterectomy for benign disease, limiting the sample size [20]. However, we cannot determine whether these changes are related to other factors that could potentially influence the histological properties of the vaginal tissue such as age, menopausal status, previous surgery for POP, etc. A larger study is required to

assess the relative contribution of these factors in the vaginal tissue composition.

The major limitation of this study is that the two biopsies were obtained from patients presenting with genital prolapse without any comparison with control patients without POP. Therefore, the absence of a control group prevents us from determining whether these changes are a cause or an effect of POP. The main reasons for the lack of control group are ethical, as collecting large tissue samples at the middle third vaginal wall of patients operated for reasons other than POP can be considered to be too invasive. In our experience, biopsies obtained at this level in patients without POP do not have the same quality as those of patients with POP and cannot be compared without introducing bias. Using a similar methodology of sample collection, Kannan et al. found very subtle changes between prolapsed and non-prolapsed tissues [21]. In a previous report, Karam et al. found a significant difference in elastin expression in the vaginal wall of patients with cystocele compared with control patients of similar age (10.6 vs 14.4, $p=0.049$) [22]. In the control group, vaginal

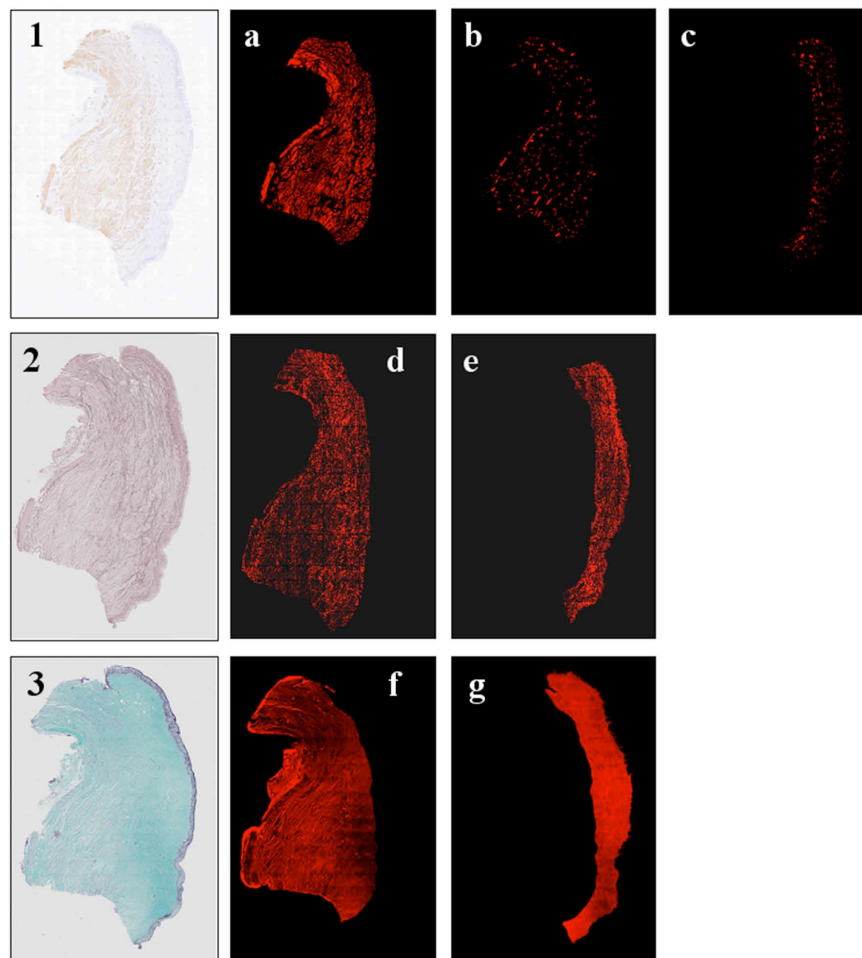


Fig. 2 1 α SMA-stained histological section of the precervical vaginal tissue in the anterior region. Binary images corresponding to a smooth muscle cells and b blood vessels in the muscularis layer and blood vessels in c the lamina propria. 2 Orcein-stained histological section of the same

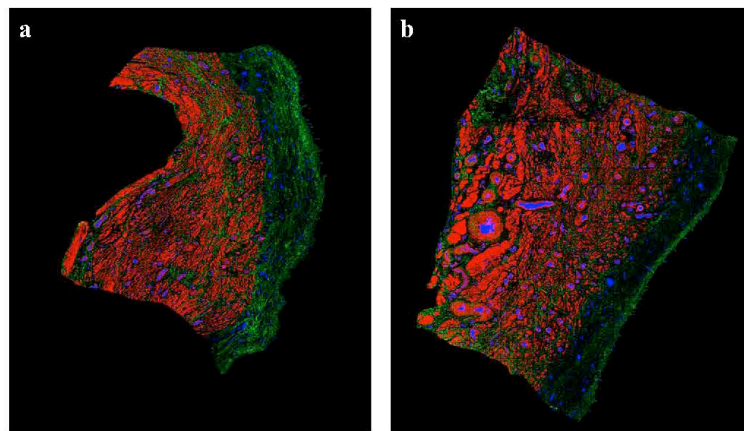
patient. d Binary images corresponding to elastic fibers in the muscularis layer and in e the lamina propria. 3 Masson's trichrome-stained histological section of the same patient. Binary images corresponding to collagen fibers in f the muscularis layer and in g the lamina propria

tissue was obtained from the same location in patients with no prolapse undergoing radical cystectomy for bladder urothelial carcinoma. It is interesting to note that the mean elastin expression in the muscularis layer of the upper lateral anterior vaginal wall in the prolapse group (10.6 ± 5.0) was comparable to our results (8.4 ± 1.2). However, for both studies, the biopsy sites and/or analytical methods were different, and it is therefore difficult to make comparisons with our findings.

In the study outlined herein, we used high-resolution and computerized image analysis to provide an objective

assessment of the different component densities of the vaginal wall without using subjective visual scales for density. In addition, the whole histological section was analyzed, rather than randomly selected fields, allowing the more accurate analysis of each component from the full-thickness vaginal tissue. However, another limitation of this study is the small number of patients and the lack of power statistical calculation, although the number of subjects is comparable to that used in other studies in the same field. These small sample populations highlight the difficulty of obtaining good-quality

Fig. 3 Composed images of **a** the precervical area and **b** the middle third portion of the anterior vaginal wall from the same patient. Smooth muscle cells are represented in *red*, elastic fibers in *green*, and blood vessels in *blue*



samples from two different sites from the same patient. However, it is important to note that the decrease in elastin density was found in all cases, as shown in Fig. 4. This consistency further supports our observations, despite the small number of tissue samples.

Unlike previous studies, ours did not find any significant differences in the smooth muscle cell density between the two locations [9, 18, 19, 23, 24]. However, the muscularis layer architecture was globally altered, and the smooth muscle bundles appeared disorganized. It is unclear whether these changes are related to the pathogenesis of genital prolapse or simply to the aging of the tissues.

We did not observe any significant differences in the distribution or density of blood vessels between the two locations of the vaginal wall. Boreham et al. observed large dilated veins more frequently in the lamina propria of women with POP and suggested that these dilated vessels are related to an increase in stasis and gravity, but we could not confirm this hypothesis [9]. We observed very subtle changes in the smooth muscle cell and blood vessel densities, suggesting that the fibrillar components might play important roles in the integrity of the pelvic connective tissue and that the alteration of these components is most likely involved in the development of POP.

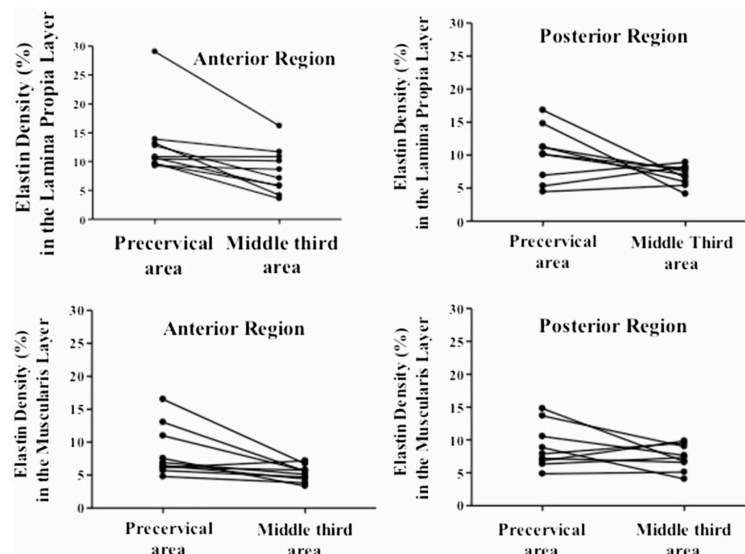
Table 2 Density measurement of collagen, elastin, blood vessels, and smooth muscle cells in the lamina propria, and the muscularis layer of the precervical and middle third anterior ($n=10$) and posterior ($n=9$) vaginal wall

	Lamina propria			Muscularis layer		
	Middle third area	Precervical area	<i>P</i> value	Middle third area	Precervical area	<i>P</i> value
Mean collagen density						
Anterior vaginal wall	88.6±1.2	84.3±1.9	0.18	75.3±1.6	74.2±1.7	0.79
Posterior vaginal wall	87.8±1.5	90.9±0.6	0.11	75.1±1.8	73.4±1.7	0.60
Mean elastin density						
Anterior vaginal wall	8.4±1.2	12.1±2.0	0.048*	5.2±0.4	8.4±1.2	0.009*
Posterior vaginal wall	6.8±0.5	10.1±1.4	0.040 *	7.3±0.6	9.0±1.1	0.44
Mean blood vessels density						
Anterior vaginal wall	2.7±0.2	2.9±0.2	0.35	3.4±0.4	3.3±0.2	0.85
Posterior vaginal wall	2.1±0.3	2.0±0.3	0.39	4.7±0.3	4.4±0.8	0.30
Mean smooth muscle cells density						
Anterior vaginal wall	—	—	—	14.1±1.0	14.7±1.8	0.74
Posterior vaginal wall	—	—	—	12.1±1.7	12.7±1.9	0.54

Data are presented in percent (mean ± SD)

*Statistically significant

Fig. 4 Elastin density measurement from each patient in the lamina propria and the muscularis layers form the precervical and middle third portion of the anterior ($n=10$) and posterior vaginal wall ($n=9$). Elastin densities are presented as percentages



There was no significant difference in the total amount of collagen between the two tissue locations. The collagen content measured in the present study corresponds more precisely to the area occupied by the non-elastic fraction of the ECM and was not assessed by specific immunohistochemical staining of collagens I, III, and V. Indeed, in our experience, the immunohistochemical study of collagen subtypes is nonspecific. Therefore, one shortcoming of this study is that it did not specifically assess changes in densities of the different collagen subtypes, including collagen III, which is often involved in the pathogenesis of prolapse [25]. We did not observe significant changes in the total amount of collagen or in the vaginal thickness between the two locations, but, as previously mentioned, the sample size of this study is limited.

In this study, a new method for quantifying the components of vaginal tissue in women with POP was applied. The whole-slide image acquisition method enabled the inspection of entire histological sections. This whole-slide imaging overcomes the limitations of the commonly used "hot spot" approach, which is reported to be observer-dependent and thus lacks reproducibility [12, 13, 26, 27]. The development of image processing algorithms, adapted to the specific immunohistochemical staining of the tissue, allows the automated detection and quantification of the elastin, collagen, smooth muscle cell, and vessel densities. The precise quantification of these parameters can be used to improve our knowledge of the vaginal wall's properties and integrate these elements with other methods of analysis, such as molecular biology or biomechanical assessments.

In conclusion, genital prolapse is a complex disease whose pathophysiology is poorly understood. This study suggests that elastin might play a role in this pathological condition because its density was significantly lower in the most distal portion of the vaginal wall. These findings illustrate the existence of more vulnerable locations within the vaginal tissue and support the central defect theory. However, this study is not conclusive of a causal effect of low elastin in POP and also highlights the difficulty of studying histological changes in vaginal tissue. Further studies are needed to determine the mechanisms that cause these changes and lead to POP.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. P. Sobarzo Martinez (University of Concepcion, Chile) for his logistical and technical assistance with the study protocol and L. Poma, I. Dasoul, E. Feyereisen, and P. Gavitelli (Laboratory of Tumor and Development Biology, LBTB, Liège, Belgium) for their excellent technical assistance with the immunohistochemistry studies. We are also indebted to all the staff of the Departments of Obstetrics and Gynecology in Lille and Liège.

Conflicts of interest none

References

1. Mant J, Painter R, Vessey M (1997) Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford family planning association study. *Br J Obstet Gynaecol* 104(5):579–585
2. Buchsbaum GM, Duecy EE, Kerr LA, Huang LS, Perevich M, Guzick DS (2006) Pelvic organ prolapse in nulliparous women and their parous sisters. *Obstet Gynecol* 108(6):1388–1393. doi:10.1097/01.AOG.0000245784.31082.ed

3. DeLancey JO (1992) Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 166(6 Pt 1):1717–1724, discussion 1724–1718
4. Weber AM, Walters MD (1997) Anterior vaginal prolapse: review of anatomy and techniques of surgical repair. *Obstet Gynecol* 89(2): 311–318. doi:10.1016/S0029-7844(96)00322-5
5. Richardson AC, Lyon JB, Williams NL (1976) A new look at pelvic relaxation. *Am J Obstet Gynecol* 126(5):568–573
6. Shaw W (1949) Vaginal operations for cystocele, prolapse of the uterus and stress incontinence. *Surg Gynecol Obstet* 88(1):11–22
7. Alperin M, Moalli PA (2006) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18(5): 544–550. doi:10.1097/01.gco.0000242958.25244.ff
8. Kiely CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2817–2828
9. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JL, Word RA (2002) Morphometric properties of the posterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187(6):1501–1508, discussion 1508–1509
10. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JL, Word RA (2002) Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187(1): 56–63
11. de Landsheere L, Munaut C, Nussgens B, Maillard C, Rubod C, Nisolle M, Cosson M, Foidart JM (2013) Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review. *Int Urogynecol J* 24(12):2011–2020
12. Balsat C, Blacher S, Signolle N, Beliard A, Munaut C, Goffin F, Noel A, Foidart JM, Kridelka F (2011) Whole slide quantification of stromal lymphatic vessel distribution and peritumoral lymphatic vessel density in early invasive cervical cancer: a method description. *ISRN Obstet Gynecol* 2011:354861. doi:10.5402/2011/354861
13. Chantaine F, Blacher S, Berndt S, Palacios-Jaraquemada J, Sarioglu N, Nisolle M, Braun T, Munaut C, Foidart JM (2012) Abnormal vascular architecture at the placental-maternal interface in placenta increta. *Am J Obstet Gynecol* 207(3):188.e1. doi:10.1016/j.ajog.2012.06.083, 188.e9
14. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, Shull BL, Smith AR (1996) The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 175(1):10–17
15. Bancroft JD, Stevens A (1982) Theory and practice of histological techniques, 2nd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh
16. Kapur JN, Sahoo PK, Wong AKC (1985) A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram computer vision. *Graphics Image Processing* 29: 273–285
17. Soille P (2003) Morphological image analysis: principles and applications, 2nd edn. Springer, Berlin
18. Badiou W, Granier G, Bousquet PJ, Monrozier X, Mares P, de Tayrac R (2008) Comparative histological analysis of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse or control subjects. A pilot study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19(5):723–729. doi:10.1007/s00192-007-0516-4
19. Kaplan PB, Usta U, Inal HA, Tastekin T, Tokuc B (2011) Neuromuscular morphometry of the uterine ligaments and vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *NeuroUrol Urodyn* 30(1): 126–132. doi:10.1002/nau.20972
20. Meijerink AM, van Rijssel RH, van der Linden PJ (2013) Tissue composition of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Gynecol Obstet Invest* 75(1):21–27. doi:10.1159/000341709
21. Kannan K, McConnell A, McLeod M, Rane A (2011) Microscopic alterations of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse. *J Obstet Gynaecol* 31(3):250–253. doi:10.3109/01443615.2011.553690
22. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmern PE (2007) Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int* 100(2):346–350. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.06998.x
23. Takacs P, Gualtieri M, Nassiri M, Candiotti K, Medina CA (2008) Vaginal smooth muscle cell apoptosis is increased in women with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19(11):1559–1564. doi:10.1007/s00192-008-0690-z
24. Inal HA, Kaplan PB, Usta U, Tastekin E, Aybatli A, Tokuc B (2010) Neuromuscular morphometry of the vaginal wall in women with anterior vaginal wall prolapse. *NeuroUrol Urodyn* 29(3):458–463. doi:10.1002/nau.20779
25. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM, Gordy SC, Meyn LA (2005) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Obstet Gynecol* 106(5 Pt 1):953–963. doi:10.1097/01.AOG.0000182584.15087.dd
26. Labiche A, Elie N, Herlin P, Denoux Y, Crouet H, Heutte N, Joly F, Heron JF, Gauduchon P, Henry-Amar M (2009) Prognostic significance of tumour vascularisation on survival of patients with advanced ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 24(4):425–435
27. Elie N, Plancoulaine B, Signolle JP, Herlin P (2003) A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. *Cytometry Part A J Int Soc Anal Cytol* 56(1):37–45. doi:10.1002/cyto.a.10075

Publication n°3

Int Urogynecol J
DOI 10.1007/s00192-010-1237-7

ORIGINAL ARTICLE

Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties?

**Boris Gabriel · Chrystèle Rubod · Mathias Brieu ·
Bruno Dedet · Laurent de Landsheere ·
Vincent Delmas · Michel Cosson**

Received: 17 March 2010 / Accepted: 30 July 2010
© The International Urogynecological Association 2010

Introduction :

L'amélioration des connaissances des propriétés biomécaniques du tissu vaginal est un autre enjeu de ce travail. Les premiers travaux de l'équipe du Professeur Cosson à Lille ont montré une réponse contrainte-déformation non linéaire lors des essais de traction uniaxiale jusqu'à rupture sur le tissu vaginal, présentant ainsi un comportement élastique non linéaire qualifié d'hyperélastique.

Une autre approche afin de mieux définir le comportement du vagin lors des tests biomécaniques est de le comparer à d'autres tissus comme la peau de la paroi abdominale et l'aponévrose des muscles grands droits de l'abdomen.

Résumé des résultats :

Les tissus cutanés, ligamentaires et vaginaux ont été prélevés *post-mortem* chez 11 sujets féminins indemnes de prolapsus génital et des tests de traction uniaxiale ont été réalisés permettant d'obtenir des courbes contrainte-déformation. Les propriétés biomécaniques du vagin, de l'aponévrose et de la peau diffèrent significativement. Le tissu aponévrotique est bien plus rigide et moins extensible que le tissu vaginal et la peau. Le tissu vaginal est moins rigide et plus extensible que la peau. Les différences entre le vagin et la peau ne sont pas significatives à faible déformation ($p=0.341$) mais bien à forte déformation ($p=0.005$). La peau et l'aponévrose ne sont donc pas appropriées pour prédire le comportement biomécanique du vagin.

Discussion :

Cette étude a permis de mettre en évidence les différences entre les propriétés biomécaniques du tissu vaginal par rapport à la peau et l'aponévrose et l'impossibilité d'extrapoler le comportement de ces tissus par rapport à celui du vagin. De ce fait, il est clair que les connaissances de la chirurgie correctrice des hernies de la paroi abdominale ne sont pas adaptables telles quelles à la chirurgie vaginale reconstructrice. La conception et

l'utilisation de prothèses dans les cures de prolapsus doivent être réalisées en tenant compte des propriétés biomécaniques du tissu vaginal.

De plus, dans la mise au point de futurs tests non-invasifs, il sera nécessaire de développer des outils de mesure adaptés au vagin plutôt qu'à la peau.

Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties?

Boris Gabriel · Chrystèle Rubod · Mathias Brieu ·
Bruno Dedet · Laurent de Landsheere ·
Vincent Delmas · Michel Cosson

Received: 17 March 2010 / Accepted: 30 July 2010
© The International Urogynecological Association 2010

Abstract

Introduction and hypothesis Despite minimal fundamental works, there is an increasing use of meshes in urogynecology. The concept is mainly based on experiences with abdominal wall surgery. We aimed to compare the biomechanical properties of vaginal tissue, abdominal aponeurosis, and skin.

Methods Samples from 11 fresh women cadavers without prolapse were collected. Uniaxial tension tests were performed and stress–strain curves were obtained.

Results Biomechanical properties of the vagina, aponeurosis, and skin differed significantly. The aponeurosis was much more rigid and less extendible than the vagina and skin. Vaginal tissue was less rigid but more extendible than

skin. There was no difference between the vagina and skin at low strains ($p=0.341$), but a highly significant difference at large strains ($p=0.005$).

Conclusions Skin and aponeurosis are not suited to predict vaginal tissue biomechanics. We should be cautious when transferring experiences from abdominal wall surgery to vaginal reconstructive surgery.

Keywords Biomechanics · Mesh · Prosthetic material · Stress–strain relations · Vaginal surgery · Vaginal tissue

Introduction

Pelvic organ prolapse (POP) constitutes a major health issue and significantly contributes to a decrease in the quality of life of aging women [1, 2]. There is now strong evidence that abnormalities of the connective tissue composition may contribute to the genesis of POP [3–5]. Such alterations can have a direct impact on the biomechanical properties of pelvic floor supportive tissues, subsequently leading to the development of a clinically relevant POP [6].

In POP surgery, native vaginal tissue is widely used as a corrective support, while its biomechanical properties are unknown. In an attempt to improve outcomes and durability of surgery, and in spite of minimal fundamental work, there is now increasing use of prosthetic materials in the management of POP. However, the mechanical characteristics of these materials have not yet been compared with those of the vagina. To date, the majority of observations on synthetic prostheses have come from the field of abdominal wall surgery and the repair of groin hernias [7, 8], and prostheses currently used in POP surgery are not designed to mirror the biomechanics of “normal vaginal tissue” [9].

B. Gabriel (✉) · C. Rubod · B. Dedet · L. de Landsheere ·
M. Cosson (✉)
Clinique de chirurgie gynécologique, Hôpital Jeanne de Flandre,
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille,
2, av. Oscar Lambret,
59037 Lille Cedex, France
e-mail: boris.gabriel@uniklinik-freiburg.de
e-mail: m-cosson@chru-lille.fr

M. Brieu
Laboratoire de Mécanique de Lille, CNRS UMR 8107,
Ecole Centrale de Lille,
Lille, France

V. Delmas
Laboratoire d'anatomie, Faculté de médecine René-Descartes,
Université Paris-V,
Rue des Saints-Pères 45,
75006 Paris, France

B. Gabriel
Universitäts-Frauenklinik Freiburg,
Hugstetter Str. 55,
79106 Freiburg, Germany

Published online: 27 August 2010

 Springer

A better understanding of vaginal and abdominal wall tissue biomechanics could enhance the development of “more functional” prostheses designed for use in vaginal prolapse surgery in the future. If vaginal and abdominal wall tissues were comparable from a biomechanical point of view, it would be tempting to speculate on a simple skin test in order to predict vaginal tissue properties. Moreover, the investigation of vaginal tissue biomechanics can provide new insights into the pathophysiology of POP. However, to date, there is a paucity of data on these issues.

Therefore, we aimed to test if tissues from the abdominal wall can be studied to extrapolate the biomechanics of vaginal tissue. To reach this goal, we characterized and compared the biomechanical properties of tissues derived from the vagina, the abdominal aponeurosis, and skin of 11 fresh women cadavers without POP.

Materials and methods

Recently, we were able to establish and validate a new experimental protocol for the biomechanical characterization of vaginal tissue [10]. Tissues were obtained from 11 fresh women cadavers without a clinically relevant POP, which was excluded by gynecological examination and using a Pozzi clamp to pull the cervix. The cadavers were not formalized but frozen for conservation and unfrozen just before the dissection. Each patient consented prior to death to have their cadaver used for medical purposes according to the legislation in force. The institutional review board approved the experimental protocol. Vaginal specimens were collected from the anterior and posterior vaginal wall by the vaginal route. A midline incision was performed in the longitudinal axis of the vaginal wall. The bladder or rectum was reflected off the vaginal wall before the full-thickness vaginal tissue was excised. Tissue measuring at least 3×1 cm was excised in the longitudinal axis of the vagina with the initial midline incision as the medial border. Abdominal skin was obtained after excision of a rectangularly shaped tissue matrix from the lower part of the abdomen at the level of the halfline distance between the pubic symphysis and the umbilicus. The skin was excised in longitudinal direction and was carefully separated from any surrounding fatty tissue. Subsequently, tissue of at least 5×3 cm from the subjacent aponeurosis was excised in a longitudinal direction starting from a midline incision. All samples were orientated and marked before being frozen in 0.9% salt solution at -18°C . The excised tissues were used to carry out uniaxial tension tests to the point of rupture as previously described [10]. Importantly, all parameters that could alter tissue behavior during the test (e.g., conditioning of tissue before test, conditions of tension test such as temperature, rate of deformation,

hydrometry) have been exhaustively studied before [10]. Briefly, the tissue samples were unfrozen 9 h before the tests. In order to obtain an area of uniform stress in the center of the test samples during the tension test, standardized 25×4 -mm test samples were excised from the tissues using a punch (Fig. 1a). The thickness of each sample was measured with palmer to further determine the nominal stress (F/S_0 , where F is the load and S_0 is the size of the initial cross section). The thickness varied between 1 and 2 mm depending on the tissue, while the controlled width was equal to 4 mm, as determined by the punch. Each sample was clamped in a tightening grip and strained at a constant strain rate ($2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) at ambient temperature (20°C) within 24 h after unfreezing. The distance between the tightened grips was 15 mm, and 5 mm of tissue was clamped on each end. The grips fixture has been designed in a way that prevents tissue slippage during the test (Fig. 1b) [10]. Samples were directly loaded, without preloading phase. The presented results are taking into account the complete response from zero force up to rupture. The rupture tests were performed using a conventional tension machine (Instron 4302TM). Each test was repeated for each tissue on different samples from the same cadaver, at least twice (range, 2–5). A low capacity load cell (1 kN) was used to measure the nominal stress (force per unit of surface) during the test, knowing the forces and the initial cross section of the samples. The load cell sensitivity was 0.01 N (0.001 class) and is in agreement with the quantity measured. Strains ($(l-l_0)/l_0$ where l is the length and l_0 the initial length) were measured with a contactless video extensometer. Subsequently, the stress–strain curves were obtained and analyzed to characterize the biomechanical behavior of the considered tissues. The mechanical response of the specimens before rupture was then studied. The fact of studying nonlinear elasticity required at least the application of two parameters: C0 and C1. The stress–strain curves allowed calculation of

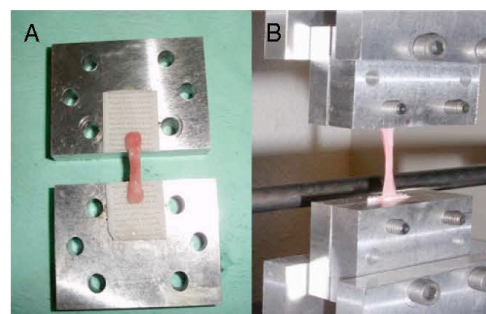


Fig. 1 Test arrangement: **a** test sample of vaginal tissue; **b** unidirectional tension test

these values which are identified on the complete mechanical response, thanks to a least-squared roots method (Mooney–Rivlin model) [11–13]. C0 characterizes the stress–strain curve at its beginning phase (i.e., low strains, under 5%), whereas C1 characterizes the form of the asymptote towards the end of the stress–strain curve (i.e., large strains).

For statistical analysis, the SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Homogeneity between the 11 cadavers with respect to their biomechanical properties (i.e., C0 and C1 values obtained for vaginal tissue, skin, and aponeurosis, respectively) was analyzed using nonparametric Kruskal–Wallis tests. Mann–Whitney *U* test was performed to reveal potential differences in biomechanical properties among the different tissues investigated (i.e., vagina, abdominal skin, aponeurosis). *p* values of <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Tissue samples from the vagina, the abdominal skin, and the aponeurosis were collected from 11 fresh women cadavers without a clinically relevant POP. The mean age was 78.5 (range, 61–87) years. The 11 cadavers were homogenous regarding their biomechanical properties (all *p*>0.05).

We were able to demonstrate a nonlinear relationship between stress and strain and a hyperelastic behavior (i.e., with large deformation) of the tissues examined (Fig. 2). The tensile strength of the investigated tissues was 0.58 ± 0.07 , 0.25 ± 0.04 , and 1.25 ± 0.25 MPa for vagina, skin, and aponeurosis, respectively.

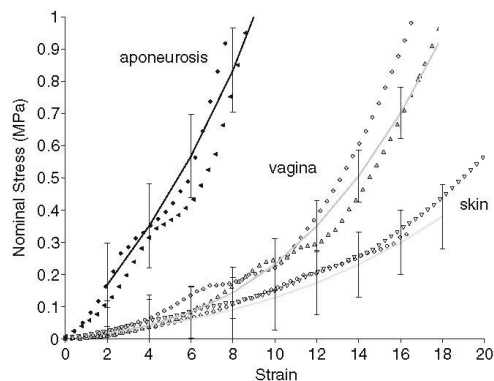


Fig. 2 Mechanical response of aponeurosis, vagina, and skin to tension loading—symbols are corresponding to experimental data and lines to the identified model

Of note, in all 11 cases, mean C0 and C1 values characterizing the biomechanical behavior of the aponeurosis before rupture were remarkably higher than those calculated for the vagina, and the same was true when comparing aponeurosis and skin in 9 out of 11 cases, both for C0 and C1. As expected, the statistical analysis confirmed that these differences were significant (all *p*<0.001) (Table 1). In line with these findings, the rupture tests on aponeurosis revealed significantly lower values for the ultimate strain compared to tissue samples derived from the vagina and skin, respectively (all *p*<0.01) (Table 1). Thus, the aponeurosis was much more rigid and less extendible than skin regarding low and also large strain levels.

When comparing vaginal tissue and skin, there was no difference with regard to C0 [i.e., low strain levels (*p*=0.341)], but a highly significant difference with regard to C1 [i.e., large strain levels (*p*=0.005)] (Table 1). The rupture tests revealed a significantly higher ultimate strain for vaginal tissue compared to skin (17% vs. 12%, *p*<0.001). Concluding, vaginal tissue was less rigid and significantly more extendible than skin at the level of large strains.

Discussion

In the present study, we were able to demonstrate that the biomechanical properties of vaginal tissue, abdominal aponeurosis, and skin differed significantly. Although at first glance this result might not be surprising, our primary rationale for investigating these tissues was to test if the abdominal wall can be studied to extrapolate the biomechanics of vaginal tissue. This was not the case. The aponeurosis was much more rigid and less extendible compared to skin and vaginal tissue. This was true for low as well as for large strain levels.

We were also able to reveal a significant difference between abdominal skin and vaginal tissue on C1 level. Such large deformations can occur in physiological situations (e.g., delivery or intercourse) or during pathological

Table 1 Biomechanical properties of the studied tissues derived from 11 cadavers without POP

	C0 (MPa)	C1 (MPa)	Ultimate strain at rupture (%)
Aponeurosis	1.40±0.49	15.65±8.04	8
Skin	0.14±0.041	3.75±0.2	12
Vagina	0.35±0.25	1.32±0.057	17

Mean C0 and C1 values (±SD) and ultimate strains at tissue rupture are given

conditions (e.g., POP). Therefore, the abdominal skin, although easily accessible, does not appear to represent a suitable tool to extrapolate the biomechanical properties of the vagina. In line with this, we found a significantly higher ultimate strain at rupture for vaginal tissue compared to skin. Thus, the vagina was less rigid and significantly more elastic than abdominal skin at large strain levels. However, we were not able to detect a significant difference between skin and vagina on C0 level with our sample size. Despite this, and especially from a mechanical perspective, it is evident that both stress–strain curves are in fact not truly congruent, especially for low strains (Fig. 2). Our study could also be underpowered to detect such a difference on C0 level, and therefore, we might have succumbed to a type II error. However, this does not change substantially our conclusion, because even if skin is considered to be up to 5% of strain equivalent to vaginal tissue, the skin parameters would also have to satisfy vaginal behavior in all strains available (i.e., on C1 level, too), and this was virtually not the case.

To date, there are no valid estimations of the strain levels occurring in POP. Parente et al. investigated the effects that the passage of a fetal head can induce on the muscles of the pelvic floor, from a mechanical point of view [14]. The authors were able to show that the maximum deformation obtained was 0.66 for a vertical displacement of the fetal head of approximately 60 mm. However, the biomechanical characteristics in physiological conditions such as intercourse or delivery might be quite different from those in pathological situations like POP. Abdominal skin and aponeurosis taken together cannot be used to extrapolate the biomechanical properties of the vaginal tissue. Therefore, we have to study the biomechanics of the vagina itself. If a noninvasive test is considered in the future, it would be reasonable to develop it for the use in the vaginal cavity, rather than on skin.

Moreover, it becomes clear that a simple transfer of knowledge from the abdominal wall to vaginal reconstructive surgery seems to be inappropriate. In this paradigm, the knowledge of biomechanical properties of normal vaginal tissue may enhance the development of more suitable and “functional” synthetic prostheses designed for use in vaginal reconstructive surgery. Increasing evidence suggests that the concept of the stress transmission at the tissue–implant interface is of outstanding importance [15]. It is characterized by the biomechanical properties of the implant and native surrounding tissue, respectively. A mismatch between both could lead to a disturbed transmission of loads at this interface and thus influence the likelihood of complications, such as erosions or poor clinical results.

We could also demonstrate a nonlinear relationship between stress and strain and a hyperelastic behavior (i.e., with large deformation) of the tissues examined, which was

in accordance with our previous data [13]. Interestingly, this kind of nonlinearity has also been observed in experimental results of polypropylene meshes [16]. In this paradigm, we believe that the appropriate mesh is not necessarily the strongest, but one which most closely resembles native human tissue. This has also been supported by the observations of other studies [16–18].

To date, there has been a paucity of literature related to the biomechanical studies of the human vagina [19–23]. Goh revealed age-related changes in full-thickness anterior vaginal wall tissue strips derived from POP surgery [21]. Unfortunately, we cannot comment on age-related effects due to our small sample size and the quite homogenous cohort of cadavers well advanced in years. Lei et al. investigated vaginal tissue derived from surgeries and revealed comparable data to ours with regard to the tensile strength and maximum elongation [23]. On the contrary, the tensile strength of skin for an average adult has typical values in the range of 2.5–16 MPa. It varies among others with site (e.g. sternum, 20 MPa; thigh, 1–5 MPa), main fiber orientation, and age [24]. These values are higher than those found in our study using cadaveric tissue. This applies also for the ultimate strain at rupture, which can reach more than 40% [24]. It is not possible to conclude if these differences are due to age-related changes, the fact of studying cadaveric tissue, or both. However, the comparison with other studies is hampered by the very different methodologies applied to investigate biomechanical properties.

Although the 11 cadavers examined in this study were biomechanically comparable, we could observe a great variability in the C0 and C1 values with a wide interindividual dispersion between minimum and maximum values. We believe that such variations are obviously induced by the physiological differences among women, and therefore, the “unique prosthesis” is probably rather a myth [25]. Also, some of the surgical failures could be attributed to such interindividual differences in tissue biomechanical properties (i.e., tissues of “poor quality”). Cosson et al. pointed to this phenomenon when studying the resistance of vaginal tissue on presurgical samples [26]. However, given our relatively low number of cases, we were not able to account for such interindividual differences by creating different patient groups and establishing a clinically meaningful “mean behavior”.

In addition to a relatively small study group, other potential limitations of this study are that the mechanical properties of the investigated specimen may not be representative of those in the entire structure. Furthermore, we cannot exclude some variability due to minimal variations at the biopsy site. We did not study the certainly much more complex interactions between vaginal tissue, ligaments, fasciae, and muscles. We investigated cadaveric

tissue of a population well advanced in years, and post-mortem changes as well as the potential effect of freezing for conservation on the biomechanical properties must be taken into account. Finally, we had no information about the use of hormone replacement therapy. The size of the error introduced by these limitations is unknown. However, these limitations do emphasize the need for in vivo measurement systems.

Our findings clearly demonstrate that vaginal tissue, abdominal skin, and aponeurosis do not exhibit similar biomechanical behavior. Therefore, caution should be exercised when transferring the knowledge derived from abdominal hernial repair to vaginal reconstructive surgery. In the future, further insights into the biomechanical properties of the normal human vagina are warranted, which may lead to the production of more “physiological” and thus functional prosthetics.

Acknowledgments BG was awarded an International Fellowship grant by the International Urogynecological Association (IUGA) in 2009, which partly funded this research project, and received also a grant for basic research from the Ministry of Health of the Czech Republic (No. 9299-3/2007). BG thanks Klaus Gabriel for the support with general mechanics understanding. The authors announce an unconditional financial support of basic research by ETHICON Women's Health & Urology.

Conflicts of interest MC is a consultant of ETHICON Women's Health & Urology.

References

- Luber KM, Boero S, Choe JY (2001) The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. *Am J Obstet Gynecol* 184:1496–1503
- Barber MD, Kuchibhatla MN, Pieper CF, Bump RC (2001) Psychometric evaluation of 2 comprehensive condition-specific quality of life instruments for women with pelvic floor disorders. *Am J Obstet Gynecol* 185:1388–1395
- Gabriel B, Denschlag D, Göbel H, Fittkow C, Werner M, Gitsch G et al (2005) Uterosacral ligament in postmenopausal women with or without pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J* 16:475–479
- Gabriel B, Watermann D, Hancke K, Gitsch G, Werner M, Tempfer C et al (2006) Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J* 17:478–482
- Kerkhof MH, Hendriks L, Brölmann HAM (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse—a review of the current literature. *Int Urogynecol J* 20:461–474
- Alperin M, Debes K, Abramowitch S, Meyn L, Moalli PA (2008) LOXL1 deficiency negatively impacts the biomechanical properties of the mouse vagina and supportive tissues. *Int Urogynecol J* 19:977–986
- Bauer JJ, Salky BA, Geleert IM (1987) Repair of large abdominal wall defects with expanded polytetrafluoroethylene (PTFE). *Ann Surg* 206:765–769
- Pans A, Albert A, Lapière CM, Nussgens B (2001) Biochemical study of collagen in adult groin hernias. *J Surg Res* 95:107–113
- Afonso JS, Jorge RM, Martins PS, Soldi MD, Alves OL, Patricio B et al (2009) Structural and thermal properties of polypropylene mesh used in treatment of stress urinary incontinence. *Acta Bioeng Biomech* 11:27–33
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, Dubois P, Cosson M (2007) Biomechanical properties of vaginal tissue. Part 1: new experimental protocol. *J Urol* 178:320–325
- Mooney M (1947) A theory of large elastic deformation. *J Appl Phys* 1940(11):582–592
- Rivlin RS (1948) Large elastic deformations of isotropic materials. I. Fundamental concepts. II. Some uniqueness theorems for pure homogenous deformations. *Philos Trans R Soc Lond Ser A: Math Phys Sci* A240:459–490
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, Clay J-C, Dubois P, Cosson M (2008) Biomechanical properties of vaginal tissue: preliminary results. *Int Urogynecol J* 19:811–816
- Parente MP, Jorge RM, Mascarenhas T, Fernandes AA, Martins JA (2008) Deformation of the pelvic floor muscles during a vaginal delivery. *Int Urogynecol J* 19:65–71
- Dietz HP, Vancaillie P, Svehla M, Walsch W, Steensma AB, Vancaillie TG (2003) Mechanical properties of urogynecologic implant materials. *Int Urogynecol J* 14:239–243
- Afonso JS, Martins PALS, Girao MJBC, Natal Jorge RM, Ferreira AJM, Mascarenhas T et al (2008) Mechanical properties of polypropylene mesh used in pelvic floor repair. *Int Urogynecol J* 19:375–380
- Neumeyer J, Abdul-Wahab W, Beer M, Speethman J, Groneberg D, Große-Siestrup C (2007) Laboratory testing of suburethral mesh slings: a comparison of their static and dynamic properties. *Int Urogynecol J* 18(Suppl 1):S111
- Krause H, Bennet M, Forwood M, Goh J (2008) Biomechanical properties of raw meshes used in pelvic floor reconstruction. *Int Urogynecol J* 19:1677–1681
- Cosson M, Lambaudi E, Boukerrou M, Lobry P, Crépin G, Ego A (2004) A biomechanical study of the strength of vaginal tissues. Results on 16 post-menopausal patients presenting with genital prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 112:201–205
- Ettema GJ, Goh JT, Forwood MR (1998) A new method to measure elastic properties of plastic-viscoelastic connective tissue. *Med Eng Phys* 20:308–314
- Goh JT (2002) Biomechanical properties of prolapsed vaginal tissue in pre- and postmenopausal women. *Int Urogynecol J* 13:76–79
- Martins P, Pena E, Calvo B, Doblare M, Mascarenhas T, Jorge RN et al (2010) Prediction of nonlinear elastic behaviour of vaginal tissue: experimental results and model formulation. *Comput Methods Biomech Biomed Eng*. doi:10.1080/10255840903208197
- Lei L, Song Y, RiQi C (2007) Biomechanical properties of prolapsed vaginal tissue in pre- and postmenopausal women. *Int Urogynecol J* 18:603–607
- Haut RC (2002) Biomechanics of soft tissue. In: Nahum AM, Melvin JW (eds) *Accidental injury. Biomechanics and prevention*. Springer, New York, pp 236–238
- Cosson M, Debodance P, Boukerrou M, Chauvet MP, Lobry P, Crépin G et al (2003) Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapse and urinary incontinence in women: which is the ideal material? *Int Urogynecol J* 14:169–178
- Cosson M, Boukerrou M, Lambaudie E, Lobry P, Crépin G, Ego A (2003) Biomécanique de la réparation et résistance des tissus biologiques dans les cures de prolapsus: pourquoi utiliser des prothèses? *J Gynecol Obstét Biol Reprod* 32:329–337

Publication n°4

Pelvi-Périnéologie (2011) 6:67-74
DOI 10.1007/s11608-010-0348-4

ARTICLE ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Caractérisation biomécanique des ligaments utérins. Implication en statique, en pelvienne

Biomechanical characterisation of uterine ligaments. Implications for the pelvic floor

G. Rivaux · C. Rubod · B. Dedet · M. Brieu · B. Gabriel · L. De Landscheere · P. Devos · V. Delmas · M. Cosson

Reçu le 27 juillet 2010 ; accepté le 5 août 2010
© Springer-Verlag France 2010

Introduction :

Les organes pelviens subissent d'importantes contraintes de pression qui relèvent essentiellement du poids des viscères et de la pression intra-abdominale. Ces viscères pelviens, situés au-dessus des orifices herniaires, sont solidement soutenus et suspendus par des systèmes d'ancrage correspondant aux ligaments pelviens.

Les propriétés mécaniques de ces ligaments pelviens sont mal connues et évaluées mais semblent jouer un rôle prépondérant dans les troubles de la statique pelvienne.

Le but de cette étude est de définir le comportement mécanique des ligaments utérins, moyens de suspension de l'utérus, afin de mieux comprendre leur contribution dans la statique pelvienne et donc leur implication dans la physiopathologie et dans la chirurgie du prolapsus génital.

Résumé des résultats :

Les ligaments utéro-sacrés, ronds et larges ont été prélevés *post-mortem* sur des bassins de 13 sujets féminins indemnes de prolapsus génital. Des tests de traction uniaxiale ont été réalisés pour chaque ligament. Les tests mécaniques réalisés sur ces ligaments ont permis de mettre en évidence un comportement mécanique élastique non linéaire avec une reproductibilité intra-individuelle satisfaisante.

Le ligament utéro-sacré apparaît comme le plus rigide des trois ligaments étudiés, que ce soit à faible ou forte déformation. Une dispersion interindividuelle a été constatée. Chacune de ces patientes présentait une latéralisation avec un côté (droite ou gauche) plus rigide que l'autre. Un prélèvement de tissu vaginal a pu être réalisé dans 11 cas sur 13, permettant ainsi de montrer que le tissu vaginal est moins rigide que le tissu ligamentaire.

Cette étude a permis de mettre en évidence un comportement hyperélastique des ligaments utéro-sacrés, ronds et larges et tend à montrer une contribution importante du ligament utéro-sacré en statique pelvienne. Précédemment, Gabriel et al. ont analysé les propriétés histomorphométriques de la portion cervicale du ligament utéro-sacré et ont montré que ce ligament était principalement constitué de tissu conjonctif et d'une importante composante

de cellules musculaires, pointant ainsi son rôle fonctionnel dans le soutien des tissus pelviens [94]. De plus, la même équipe a observé une expression plus importante de collagène III et de MMP-2 chez les patientes présentant un prolapsus génital. Ces modifications pourraient être responsables d'une plus grande laxité de ce ligament chez ces patientes [95]. Le ligament utéro-sacré est utilisé dans certaines techniques de chirurgie traditionnelle pour suspendre le dôme vaginal ou pour réaliser des plasties (interventions de Campbell ou de Shirodkar) et il semble concevable de continuer à l'utiliser comme élément d'amarrage solide dans les cures de prolapsus [96].

Caractérisation biomécanique des ligaments utérins. Implication en statique, en pelvienne

Biomechanical characterisation of uterine ligaments. Implications for the pelvic floor

G. Rivaux · C. Rubod · B. Dedet · M. Brieu · B. Gabriel · L. De Landscheere · P. Devos · V. Delmas · M. Cosson

Reçu le 27 juillet 2010 ; accepté le 5 août 2010
© Springer-Verlag France 2010

Résumé *Introduction* : Touchant un tiers des femmes de tous âges, le prolapsus pelvi-génital constitue une préoccupation majeure des chirurgiens gynécologues. De nombreux éléments et facteurs de risque rendent la physiopathologie du prolapsus complexe. Les ligaments pelviens semblent jouer un rôle prépondérant dans les troubles de la statique pelvienne. L'objectif de notre étude est de définir les propriétés mécaniques des ligaments utérins afin de mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie et la chirurgie du prolapsus génital.

Matériels et méthodes : Les ligaments utérosacrés, ronds et larges ont été prélevés sur des bassins de cadavres féminins indemnes de prolapsus et de chirurgie pelvienne. Ces prélèvements ont été réalisés sur 13 cadavres. Des tests de traction uniaxiale, à vitesse de déformation constante, ont été réalisés

pour chaque ligament. Le grand nombre de résultats ont permis une étude statistique des propriétés mécaniques.

Résultats : Les tests mécaniques réalisés sur les ligaments utérins, prélevés sur 13 cadavres féminins, ont permis de mettre en évidence un comportement mécanique élastique non linéaire. Dans ce cas, le comportement mécanique des ligaments peut se caractériser par deux paramètres, C_0 et C_1 , relatifs à la rigidité à faible et forte déformation. La reproductibilité intra-individuelle est satisfaisante. Le ligament utérosacré apparaît comme le ligament le plus rigide des trois ligaments étudiés, que ce soit à faible ou forte déformation. Une dispersion interindividuelle a été constatée. Chacune des patientes étudiées présentait une latéralisation avec un côté (droite ou gauche) plus rigide que l'autre. Onze des 13 patientes ont eu un prélèvement de tissu vaginal associé, permettant ainsi de montrer que le tissu vaginal est moins rigide que le tissu ligamentaire.

Conclusion : Il a été mis en évidence, pour la première fois, le comportement mécanique hyperélastique des ligaments utérosacrés, ronds et larges. Cette approche montre que le ligament utérosacré est le plus rigide par rapport aux ligaments ronds, larges ou encore au tissu vaginal. Sa contribution en statique pelvienne apparaît donc comme majeure. Une étude mécanique complémentaire de ces ligaments en situation de prolapsus génital permettrait d'apporter des réponses supplémentaires quant aux étiologies des récurrences des cures chirurgicales de prolapsus. **Pour citer cette revue : Pelvi-Périnéologie 6 (2011).**

G. Rivaux (✉) · C. Rubod · B. Dedet · B. Gabriel ·
L. De Landscheere · M. Cosson
Département de gynécologie,
hôpital Jeanne-de-Flandre,
CHRU Lille, université Lille Nord de France,
avenue Eugène-Avinée, F-59037 Lille, France
e-mail : geraldine.rivaux@gmail.com

M. Brieu
Laboratoire de mécanique de Lille,
CNRS UMR 8107, École centrale de Lille,
université Lille Nord de France,
F-59000 Lille, France

P. Devos
Délégation à la recherche EA 2694,
Cerim faculté de médecine, CHRU Lille,
université Lille Nord de France

V. Delmas
Laboratoire d'anatomie Paris-V,
45, rue des Saints-Pères,
F-75007 Paris, France

Public/Intérêt : Chercheurs/Élevé. Cliniciens/Élevé.
Enseignants/Élevé. Étudiants/Élevé. Autres professions de santé/Faible. Cadres santé publique/Faible.

Mots clés Ligaments utérins · Statique pelvienne ·
Prolapsus · Gynécologie · Urologie

Abstract *Introduction*: Pelvic organ prolapse (POP) affects one-third of women of all ages, and is a major concern for gynaecologic surgeons. Many elements and risk factors make the physiopathology of prolapse complex. Pelvic ligaments seem to play a predominant role in pelvic floor dysfunction. The aim of our study is to define the mechanical properties of

uterine ligaments to gain a better understanding of their role in the physiopathology and surgery of POP.

Methods and materials: The uterosacral, round and broad ligaments were removed from female cadavers with no history of prolapse or pelvic surgery. A total of 13 cadavers were used. Each ligament was tested for uniaxial tensile strength at constant deformation rate. The large number of results obtained enabled a statistical study of mechanical properties.

Results: The mechanical tests performed on uterine ligaments taken from 13 female cadavers showed the existence of non-linear elastic behaviour. In this case, the mechanical behaviour of the ligaments could be expressed by two parameters C_0 and C_1 , relating to stiffness at low and high deformation rates. Intra-individual reproducibility was satisfactory. The uterosacral ligament was found to be the stiffest of the three ligaments studied, at both low and high deformation rates. Inter-individual dispersion was noted. Each subject studied displayed lateralisation, with one side (either right or left) stiffer than the other. A vaginal tissue sample was also taken from 11 of the 13 subjects, which made it possible to show that vaginal tissue is less stiff than ligament tissue.

Conclusion: The hyperelastic mechanical behaviour of the uterosacral, round and broad ligaments was shown for the first time. This approach showed that the uterosacral ligament is stiffer than the round and broad ligaments and vaginal tissue. Therefore, it appears that it plays a more important role in pelvic floor support. Further mechanical studies of these ligaments in POP would provide further answers to the aetiologies of the recurrence of prolapse after curative surgery. *To cite this journal: Pelvi-Périnéologie 6 (2011).*

Keywords Uterine ligaments · Pelvic floor · Prolapse · Gynaecology · Urology

Introduction

Le prolapsus pelvi-génital constitue un problème majeur pour les chirurgiens gynécologues. Ce trouble de la statique pelvienne touche une femme sur trois, tous âges confondus [1], et plus de 60 % des patientes de plus de 60 ans [2]. Devant le vieillissement de la population féminine, la demande de prise en charge chirurgicale est de plus en plus importante en vue d'une amélioration de la qualité de vie, pour atteindre un taux d'intervention de 11,8 % à l'âge de 80 ans [3]. De nombreux éléments peuvent être responsables du prolapsus : l'accouchement, l'âge, la parité, le poids, les modifications posturales et les anomalies du tissu conjonctif [4]. Son étiologie apparaît donc comme multifactorielle. La prise en charge du prolapsus génital, essentiellement chirurgicale, consiste en une chirurgie réparatrice, soit par l'utilisation de tissu autologue, ou par la mise en place de matériel prothétique. Les résultats anatomiques restent relativement

décevants à long terme avec un taux de récurrence entre 30 à 50 %, en cas de chirurgie conventionnelle, et de 7 %, en cas de pose de matériel prothétique. [5–7]. Les propriétés mécaniques des ligaments pelviens utérins sont mal connues et évaluées. Peu de références sont retrouvées dans la littérature [15,17,18,20–22]. Une caractérisation mécanique des ligaments utérins pourrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes responsables de la survenue et de la récurrence du prolapsus génital.

Le but de notre étude est de définir le comportement mécanique des ligaments pelviens utérins, moyen de suspension de l'utérus, afin de mieux comprendre leur contribution dans la statique pelvienne et donc leur implication dans la physiopathologie et dans la chirurgie du prolapsus génital.

Matériels et méthodes

Dans le but de caractériser les ligaments utérins (utérosacrés, ronds et larges), des prélèvements de ces différents types de ligaments ont été réalisés sur 13 bassins de cadavres féminins indemnes de prolapsus génital et de chirurgie pelvienne. Il s'agissait de bassins de cadavres frais congelés de patientes ayant fait don de leur corps à la science pour une utilisation médicale et/ou pédagogique selon la législation en vigueur.

Un examen sur table était réalisé avant chaque prélèvement à la recherche de prolapsus et de chirurgie pelvienne antérieure. Concernant ces patientes, aucune donnée clinique, hormis l'âge, n'était connue.

Les prélèvements ont tous été réalisés de manière identique selon le protocole suivant : réalisation d'une laparotomie transversale selon la technique de Mouchel, mise en traction de l'utérus pour individualiser les ligaments à prélever. Les moyens de suspension ligamentaire de l'utérus ont été prélevés de leur insertion utérine jusqu'à leurs extrémités pariétales. Les ligaments utérosacrés, ronds, larges, droits et gauches ont été prélevés sur chaque patiente lorsque la qualité tissulaire était satisfaisante. Soixante-six ligaments ont pu être obtenus. Tous les ligaments ont été orientés en vue de la réalisation des essais mécaniques. L'ensemble des essais mécaniques ont été réalisés selon le protocole de Rubod et al. [8–10]. Les tissus ont été préservés dans du sérum physiologique (NaCl 9 %) puis congelés à une température de -18°C .

En vue de la réalisation des essais mécaniques, les prélèvements ligamentaires ont été décongelés à température ambiante pendant neuf heures, le temps de décongélation-essai mécanique ne devait pas dépasser 24 heures. Les échantillons ont été conservés à température ambiante (20°C) dans du sérum physiologique afin de ne pas détériorer les tissus. Les ligaments prélevés étaient de taille différente. Afin d'obtenir une zone de contrainte homogène au centre

des échantillons lors de l'essai de traction, des éprouvettes normalisées ont été conçues après une étude de la répartition des contraintes. Après découpe à l'aide d'un emporte-pièce, l'épaisseur moyenne des éprouvettes normalisées [9–10] a été mesurée à l'aide d'un palmer électronique. La connaissance de la largeur et de l'épaisseur de l'éprouvette permet de connaître la section mise en jeu au cours de l'essai, S_0 . Afin que les tissus ne soient pas sollicités avant l'essai, un système constitué de mors spécifique a été utilisé.

Des essais de traction uniaxiale ont été réalisés jusqu'à rupture pour chaque échantillon prélevé sur une machine conventionnelle « Instron 5882 TM ». Les mesures des efforts, F , ont été effectuées à l'aide d'une cellule de charge de faible capacité (1kN) disposée sur la machine de traction. La mesure de la force permet alors de calculer la contrainte nominale, $\sigma = F/S_0$, au cours de l'essai. La vitesse de déformation était constante à $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les déformations, $\epsilon = 1 + \lambda$, ont été mesurées à l'aide d'un vidéoextensomètre sans contact. Les courbes contrainte-déformation, permettant de caractériser les matériaux, ont été obtenues et analysées. Afin de permettre une étude statistique comparative de l'ensemble des données expérimentales, il était nécessaire d'introduire un modèle de comportement permettant de rendre compte des phénomènes d'élasticité non linéaire en grande déformation. Le modèle retenu est un modèle de type Mooney–Rivlin [11–12]. Deux paramètres C_0 et C_1 correspondant respectivement à la rigidité des matériaux à faibles et forts niveaux de déformation ont été identifiés sur les courbes par une méthode des moindres carrés :

$$\sigma = 2(\lambda - 1/\lambda^2)[C_0 + C_1(\lambda^2 + 2/\lambda - 3)]$$

Les jeux de paramètres ainsi obtenus ont été analysés de manière statistique.

Analyses statistiques

Chaque ligament prélevé a permis de donner plusieurs échantillons. Chacun de ses échantillons a été testé. Ainsi, pour chaque échantillon ligamentaire, deux paramètres C_0 et C_1 correspondant à la rigidité à faible déformation et à forte déformation, respectivement, ont été obtenus. Ils constituent les propriétés mécaniques des tissus. Ces coefficients, ainsi que la limite à rupture qui est une donnée expérimentale brute, ont été comparés afin de permettre une étude comparative de la contribution des différents ligaments en statique pelvienne.

Les comparaisons de moyennes ont été réalisées à l'aide du modèle linéaire mixte, en étudiant l'influence de chaque facteur ainsi que leur interaction.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS 9.1. Les résultats sont représentés par leur moyenne et leur écart-type. Grâce à cette étude, la rigidité des différents ligaments pelviens utérins a pu être comparée.

Résultats

Notre étude sur les ligaments utérins impliqués en statique pelvienne a été réalisée sur 13 bassins de cadavres féminins, frais, congelés, indemnes de prolapsus ou de chirurgie pelvienne. L'âge moyen de ces patientes était de $83,45 \pm 12,3$ ans (61–100). Trois paires de ligaments ont été étudiées : les ligaments utérosacrés, ronds, et larges. Seuls les ligaments clairement identifiés et qualitativement satisfaisants ont été étudiés. Soixante-six ligaments ont été prélevés et étudiés, repartis de la façon suivante : 22 ligaments utérosacrés, 23 ligaments ronds et 21 ligaments larges droits et gauches.

Des tests de traction uniaxiale jusqu'à rupture ont été réalisés pour chacun des échantillons prélevés, selon le protocole validé de Rubod et al. [8–10]. Une réponse contrainte-déformation non linéaire a pu être constatée pour chaque paire de ligaments étudiés, associée à une grande déformation avant rupture de celui-ci. Les trois ligaments présentaient un comportement mécanique similaire se rapportant à un comportement non linéaire élastique dit hyperélastique (Fig. 1). Ce comportement mécanique a été identifié à l'aide d'une loi de type Mooney–Rivlin [11–12] introduisant deux paramètres C_0 et C_1 . Ceux-ci sont relatifs à la rigidité à faible et forte déformation. Ils ont pu être définis pour chaque ligament testé, permettant ainsi une étude de comparaison statistique. Les résultats sont retranscrits dans le Tableau 1.

Selon la taille du prélèvement pour chaque ligament, plusieurs essais (de 1 à 3) ont pu être entrepris. L'ensemble de ces courbes était superposable. Il n'existait pas de différence en termes de rigidité du ligament, quelque soit le lieu de prélèvement, de l'insertion utérine à l'insertion pariétale. Les essais étaient reproductibles pour un ligament en intra-individuel (Fig. 1). Par contre, nous avons pu constater une différence de rigidité très importante d'une patiente à l'autre pour l'étude d'un même ligament, traduisant une variabilité interindividuelle (Fig. 1).

Grâce aux deux paramètres C_0 et C_1 obtenus pour chaque échantillon, une étude statistique a été réalisée, permettant une comparaison des différentes paires de ligaments entre elles et la comparaison du côté droit au côté gauche. Nous avons montré que le ligament utérosacré est le ligament le plus rigide des trois ligaments en faible ($p = 0,0451$) et forte déformation ($p = 0,0278$) de manière significative par rapport au ligament rond et large (Tableaux 1 et 2). De la même manière, nous constatons que le ligament rond est plus rigide que le ligament large. Pour seulement six patientes (patientes n°1, 3, 5, 6, 7, 8), les ligaments utérosacrés, ronds et larges ont pu être prélevés des côtés droit et gauche simultanément. Nous avons pu constater qu'il existait un côté prédominant par rapport à l'autre chez chacune

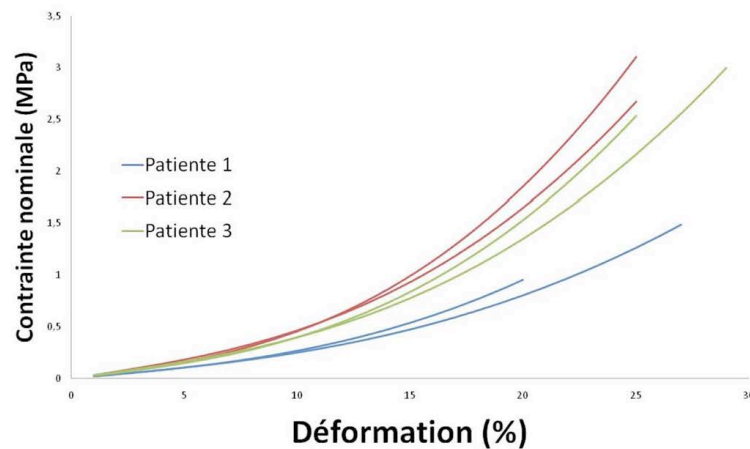


Fig. 1 Courbe contrainte-déformation montrant la reproductibilité intrapatient et la variabilité interpatient pour le ligament utérosacré

Tableau 1 Moyennes des différents tissus ligamentaires

Tissu ($n = 66$)	C_0 moyen (DS)	C_1 moyen (DS)
Ligament large droit ($n = 11$)	0,631 (0,467)	2,689 (3,495)
Ligament large gauche ($n = 11$)	0,557 (0,391)	2,628 (3,406)
Ligament rond droit ($n = 12$)	1,032 (0,901)	8,843 (13,015)
Ligament rond gauche ($n = 11$)	0,623 (0,455)	4,53 (3,443)
Ligament utérosacré droit ($n = 11$)	1,390 (1,399)	12,17 (13,573)
Ligament utérosacré gauche ($n = 10$)	1,732 (2,119)	8,605 (8,083)

Tableau 2 Analyse statistique de variance

Analyse statistique	C_0 moyen	C_1 moyen
Type de tissu	$p = 0,0451$	$p = 0,0278$
Latéralisation droite/gauche	$p = 0,7965$	$p = 0,2639$
Interaction tissu/latéralisation	$p = 0,4845$	$p = 0,7072$

de ces patientes. Ce côté variait d'une patiente à l'autre. Pour quatre d'entre elles, le côté gauche apparaissait comme étant le plus rigide. Par contre, si l'on reprend le groupe de 13 patientes et que l'on compare la rigidité du côté droit à celle du côté gauche en faible ($p = 0,7965$) et forte ($p = 0,2639$) déformation, on ne retrouve pas de prédominance de côté.

Parmi ces 13 patientes, Gabriel et al. [13] ont mené un travail sur le tissu vaginal de 11 des 13 bassins de cadavres féminins indemnes de prolapsus et de chirurgie pelvienne. L'âge moyen de ces patientes était de $78,5 \pm 10,26$ ans (61–87). Ce travail, réalisé selon le protocole de

Rubod et al. [10] a permis de calculer les moyennes C_0 et C_1 du tissu vaginal (Tableau 3). Une comparaison des moyennes de C_0 et C_1 du tissu vaginal et des trois ligaments utérins étudiés a été réalisée (Fig. 2). Le tissu vaginal apparaît comme étant moins rigide que les tissus ligamentaires étudiés en faible et forte déformation.

Discussion

Les organes pelviens subissent d'importantes et permanentes contraintes de pression qui relèvent essentiellement du poids des viscères et de la pression intra-abdominale. Ces viscères pelviens, situés au-dessus des orifices herniaires, sont solidement soutenus et suspendus par des systèmes d'ancrage. Ces systèmes, encore appelés ligaments pelviens et utérins, sont considérés comme étant les points de suspension les plus solides. L'approche biomécanique des ligaments ronds, utérosacrés et larges, réalisée après dissection de 13 bassins de cadavres féminins, indemnes de prolapsus et

Tableau 3 Tableau des moyennes des côtés droits et gauches en C ₀ et C ₁ pour les trois ligaments confondus				
Patiente	C ₀ -droit moyen (DS)	C ₀ -gauche moyen (DS)	C ₁ -droit moyen (DS)	C ₁ -gauche moyen (DS)
1	2,154 (1,154)	0,304 (0,084)	35,295 (21,751)	1,380 (1,229)
3	0,896 (0,801)	0,880 (0,637)	2,946 (2,291)	4,322 (3,641)
5	0,609 (0,127)	1,285 (1,176)	5,667 (3,023)	11,435 (8,112)
6	0,279 (0,144)	0,408 (0,207)	2,669 (3,056)	3,645 (4,365)
7	0,562 (0,669)	0,438 (0,213)	2,189 (2,444)	2,331 (2,693)
8	1,657 (1,266)	1,316 (1,390)	10,063 (8,425)	11,109 (11,938)

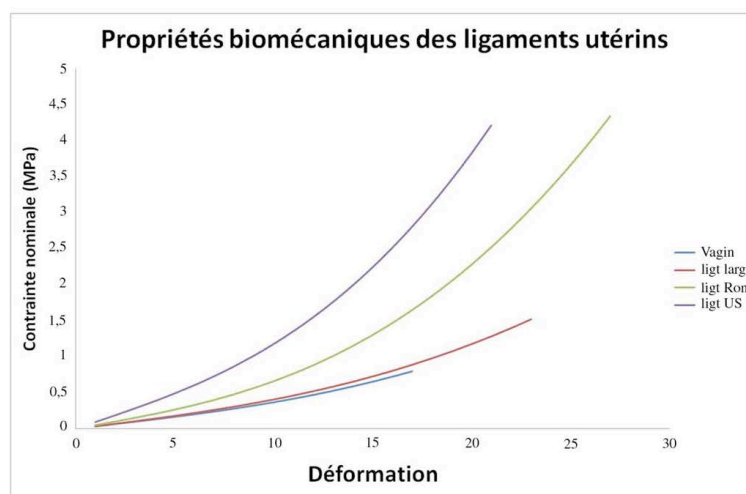


Fig. 2 Courbe contrainte déformation de comparaison des ligaments utérosacrés, ronds et larges étudiés au tissu vaginal sain

de chirurgie pelvienne, nous a permis d'observer un comportement mécanique s'apparentant à un comportement élastique non linéaire, dit classiquement hyperélastique. Il existe une grande disparité des contraintes maximales à rupture d'un ligament à l'autre, d'un côté à l'autre et même d'une patiente à l'autre. La reproductibilité de nos essais pour une même patiente était satisfaisante. Le ligament utérosacré apparaît comme le ligament le plus rigide des trois ligaments étudiés en petite et grande déformation. Pour chacune des patientes, on constate une latéralisation des rigidités avec la prévalence d'un des côtés. Enfin, nous avons pu constater que le tissu vaginal est moins rigide que les ligaments utérins.

De nombreuses contraintes matérielles et anatomiques ont limité notre étude. Les ligaments que nous avons étudiés ne peuvent pas être étirés in vivo jusqu'à rupture pour en étudier leur résistance. Pour cela, nous avons utilisé des bassins de cadavres de femmes frais congelés permettant une dissection plus aisée, moins risquée et non hémorragique, autorisant

des prélèvements et la réalisation des mesures dans des conditions optimales. Il a été difficile de prélever les trois types de ligaments ainsi que le côté droit et gauche pour chaque patiente en raison d'une altération qualitative ou quantitative des tissus. Le nombre de ces corps était limité, d'une part par la législation, et d'autre part, par la nécessité d'utilisation pédagogique. L'inclusion d'un plus grand nombre de patientes permettrait une comparaison de sous-groupe de la population en fonction de l'âge, du statut hormonal, de la parité et du mode d'accouchement. Le manque d'information clinique, hormis l'âge des patientes, a rendu la comparaison difficile avec les différentes études de la littérature.

Certains ligaments comme le ligament vésico-utérin, le ligament latéral, n'ont pu être étudiés lors de ce travail. Considérés comme des nappes tissulaires intégrées dans l'environnement avec des frontières imprécises [14], il a été difficile de les isoler de manière correcte pour en obtenir des échantillons exploitables afin de réaliser des essais

mécaniques dans des conditions optimales. Par ailleurs, également, nous n'avons pas étudié les ligaments sacroépineux, sacrotubéreux et ilio lombaires, dont l'absence d'implication en dynamique pelvienne a été démontrée par Conza et al. [15]. Pour caractériser le comportement des ligaments pelviens utérins impliqués en statique pelvienne, le choix d'un protocole est indispensable afin de garantir la qualité et une bonne reproductibilité des mesures mécaniques.

Nous avons donc décidé de choisir le protocole de Rubod et al. [10]. Ce protocole a été validé à chaque étape par des essais exhaustifs sur du tissu vaginal de brebis. Il a été utilisé dans plusieurs études portant sur le tissu vaginal sain et pathologique [10–16], la peau et l'aponévrose [13]. Il a fait ses preuves en termes de reproductibilité des mesures. Une étude préliminaire de faisabilité sur la biomécanique des ligaments utérins avait été réalisée sur cinq bassins de cadavres féminins ayant permis de valider l'approche mécanique et le matériel de mesure. (laboratoire de Genève Dr Rubod et du Pr Fasel [Br J Surg 2009]) Ce travail a donc permis de valider notre protocole de mesure de résistances sur les ligaments.

Il a été défini pour la première fois le comportement mécanique hyperélastique des ligaments utérosacrés, ronds et larges. Puisqu'il est considéré dans la littérature que le ligament utérosacré est le ligament le plus solide des ligaments pelviens, certains l'utilisent pour y suspendre le dôme vaginal alors que d'autres font des plasties, Shirodkar et Campbell, afin de les remettre en tension en les croisant pour redonner à l'utérus son antéversion par traction de l'isthme utérin en chirurgie conventionnelle. Notre travail tend à montrer que les ligaments utérosacrés sont les ligaments les moins déformables, et les plus rigides des trois ligaments pelviens étudiés. Sa contribution apparaît donc comme majeure en statique pelvienne. Ainsi, nous pouvons supposer que plus un ligament est rigide plus il est sollicité par son environnement afin de maintenir en position physiologique les diverses structures anatomiques qui lui sont attenantes. Il semblerait donc recevable de continuer à l'utiliser comme élément d'amarrage solide dans les cures de prolapsus génitaux, si l'on rattache rigidité à résistance ligamentaire.

Une différence interpatientes des résistances maximales à rupture a été également mise en évidence, d'une patiente à l'autre, comme dans l'étude de Cosson et al. [17]. Ces résultats semblent en adéquation avec la littérature puisque chaque patiente ne présente pas la même histoire clinique et environnementale. La qualité ligamentaire d'une patiente devra donc être prise en compte comme un des facteurs de risque de prolapsus et d'échec de cure de prolapsus pour les chirurgies utilisant les ligaments comme système d'amarrage.

Comme Reay Jones et al. [18] mais à la différence de Cosson et al. [17], nous ne retrouvons pas de différence significative entre la rigidité du côté droit et gauche pour une paire de ligaments, en prenant le groupe de patientes dans son ensemble. Mais si l'on étudie les patientes indivi-

duellement, on peut constater que chacune d'entre elles présente bien un côté plus rigide que l'autre. Umek et al. [19] ont constaté que, dans 50 % des cas, le ligament utérosacré gauche était plus petit en taille que le droit, probablement attribué au développement du côlon sigmoïde dans cette région. Ce résultat établi, mais d'un point de vue géométrique alors que nous l'établissons d'un point de vue mécanique, une latéralisation sans prévalence de côtés. Ces constatations doivent nous faire questionner sur la prise en charge chirurgicale avec fixation unilatérale comme dans les interventions de Richter. Par ailleurs, la qualité et la rigidité des ligaments utilisés en situation pathologique de prolapsus doivent être également prises en compte.

Peu d'études ont été retrouvées dans la littérature concernant la biomécanique des ligaments pelviens [15,18,20–22]. Cosson et al. [17] et Boukerrou et al. [20] ont montré qu'il existait une grande variabilité des mesures de résistance maximale à rupture en travaillant sur les ligaments pectinés, sacroépineux, arcs tendineux des fascias pelviens et le ligament prévertébral. La résistance à rupture de ces ligaments a été étudiée par traction dans l'axe vaginal par le biais d'un dynamomètre. Il a été démontré que les ligaments prévertébraux et pectinés sont plus résistants que les ligaments sacroépineux et les arcs tendineux des fascias pelviens. Mais une grande diversité des résultats a été retrouvée d'une patiente à l'autre, d'un côté à l'autre pour les ligaments pairs et d'un ligament à l'autre. Ils en concluent que cela pourrait être une cause de certains échecs chirurgicaux des cures de prolapsus. Toutefois, cette étude ne porte que sur le comportement à rupture. Le comportement élastique non linéaire n'a pas été étudié. Aucune conclusion sur la contribution des ligaments à la statique pelvienne ne peut donc, contrairement aux travaux de notre étude, être établie à partir du travail de Cosson et al. L'élasticité de 45 ligaments utérosacrés, après réalisation d'une hystérectomie chez des femmes ménopausées, a été étudiée par Reay Jones et al. [18]. Ils ont démontré que l'élasticité du ligament utérosacré diminuait significativement chez les patientes présentant un prolapsus, chez les femmes ménopausées et en fonction de la parité et de l'âge de la patiente. Il n'existait pas de différence significative entre les primipares et les multipares. Vardy et al. [21] ont également étudié les résistances à rupture des ligaments utérosacrés et ronds soumis à un traitement hormonal substitutif chez les singes femelles ovariectomisées. Ils ont constaté que le traitement hormonal avait une influence sur les propriétés mécaniques de ces deux ligaments. Ils concluent que, sous l'influence des hormones féminines substitutives, le ligament utérosacré devient plus rigide que le ligament rond. Chen et al. [22], à partir d'un modèle 2D du vagin antérieur, ont démontré que l'importance d'une cystocèle était exponentiellement proportionnelle à l'endommagement des ligaments utérosacrés et cardinaux. Ce travail bibliographique permet de constater

que tous les ligaments utérins semblent jouer un rôle important dans la statique pelvienne, mais compte tenu des différentes méthodes de mesures de résistances, il est difficile de les comparer entre elles et de définir un comportement mécanique précis pour chacun de ces ligaments impliqués en statique pelvienne. Les travaux sont difficilement exploitables en termes de biomécanique, compte tenu des différentes méthodes de mesures des résistances. Un protocole de mesure et de conservation des tissus uniques a permis de comparer, dans le cadre de ce travail, les différents ligaments et tissus entre eux [13,16], ce qui va permettre d'obtenir une cartographie mécanique du pelvis féminin pour mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie du prolapsus.

Sur le plan histologique, Blaisdell [23], lors des premières études sur le ligament utérosacré, concluait que celui-ci n'était constitué que de tissu conjonctif. Mais ce concept a largement évolué au cours de ces dernières décennies. Notamment, l'étude récemment menée par Ramanah et al. [24], sur dissection de bassin de cadavre féminins, concluait que le ligament utérosacré est « un complexe ligamentaire » constitué du plexus hypogastrique inférieur et du nerf hypogastrique ainsi que d'éléments vasculaires entourés d'une enveloppe conjonctive fine. De manière complémentaire, notre étude des propriétés mécaniques des ligaments utérins met en évidence la plus forte rigidité du ligament utérosacré qui peut, compte tenu des études citées, s'expliquer par ses différences histologiques.

Toutefois, ces ligaments, au même titre que l'ensemble des tissus, voient l'ensemble de leurs propriétés se modifier avec la pathologie, notamment dans les troubles de la statique pelvienne. [14]. Lors d'une étude menée par Jean-Charles et al. [16] et Rubod et al. [10], il a été montré que le tissu vaginal prolapsé était plus rigide que le tissu vaginal sain. Ainsi, la réalisation d'une étude mécanique comparant les ligaments utérins non prolapsés à ceux prolapsés permettrait d'apporter des éléments de réponse aux échecs de la chirurgie du prolapsus.

Conclusion

Grâce à la réalisation d'essais mécaniques jusqu'à rupture, notre travail a permis de montrer que les trois ligaments pelviens, utérosacrés, ronds et larges, présentaient un comportement hyperélastique. Il a été démontré que le ligament utérosacré était plus rigide que les ligaments ronds, larges et le tissu vaginal avec une latéralisation droite ou gauche variant pour chaque patiente. La caractérisation mécanique des tissus ligamentaires permet une meilleure compréhension de la physiologie du prolapsus. La contribution du ligament utérosacré en statique pelvienne apparaît donc comme majeure et indispensable au maintien de l'utérus dans sa position physiologique. Il convient de continuer

d'utiliser le ligament utérosacré comme système d'amarrage des montages chirurgicaux (Shirodkar, Campbell). Une recherche similaire sur des tissus ligamentaires pelviens prolapsés permettrait d'approfondir nos connaissances sur les étiologies des récides en cas de chirurgie du prolapsus.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

- Samuelsson EC, Victor FT, Tibblin G, Svärdsudd KF (1999) Signs of genital prolapse in a Swedish population of women 20 to 59 years of age and possible related factors. *Am J Obstet Gynecol* 180:299-305
- Swift SE (2000) The distribution of pelvic organ support in a population of female subjects seen for routine gynecologic health care. *Am J Obstet Gynecol* 183:277-85
- Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, et al (1997) Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 89:501-6
- Blanc B, Deval B (2005) Prolapsus génital : contexte nosologique et pathogénie connue. In: *Pelvi-périnéologie*. Blanc B, Siproudhis L. Springer, Paris, 619 pages. pp. 175-85
- Shull BL, Benn SJ, Kuehl TJ (1994) Surgical management of prolapse of the anterior vaginal segment: an analysis of support defects, operative morbidity, and anatomic outcome. *Am J Obstet Gynecol* 171(6):1429-36
- Fatton B, Amblard J, Debodinance P, et al (2007) Transvaginal repair of genital prolapse: preliminary results of a new tension-free vaginal mesh (Prolift technique)- a case series multicentric study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18(7):743-52
- De Tayrac R, Devoldere G, Renaudie J, et al (2007) Prolapse repair by vaginal route using a new protected low-weight polypropylene mesh: 1-year functional and anatomical outcome in a prospective multicentre study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18(3):251-6
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, et al (2005) Biomechanical properties and experimental protocol for prolapsed vaginal tissue. First international conference on mechanics of biomaterials & tissues, Hawaii
- Brown RP (1996) Physical testing of rubber. 3rd edition. Chapman & Hall
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, et al (2007) Biomechanical properties of vaginal tissue - Part 1 : new experimental protocol. *J Urol* 178:320-5
- Mooney M (1940) A theory of large elastic deformation. *J Appl Phys* 11:582-92
- Rivlin RS (1948) Large elastic deformations of isotropic materials. I. Fundamental concepts, II. Some uniqueness theorems for pure homogenous deformations. *Philos Trans R Soc Lond Ser A: Math Phys Sci* A240:459-90
- Gabriel B, Rubod C, Brieu M, et al (2010) Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties? *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* [Epub ahead of print]
- Querleu D (1995) techniques chirurgicales en gynécologie. Masson 1ère édition
- Conza NE, Rixen DJ, Plomp S (2007) Vibration testing of a fresh-frozen human pelvis: the role of pelvic ligaments. *J Biomech* 40:1599-605
- Jean-Charles C, Rubod C, Boukerrou M, et al (2010) Biomechanical properties of prolapsed or non-prolapsed vaginal tissue:

- impact on genital prolapsed surgery. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* [Epub ahead of print]
17. Cosson M, Boukerrou M, Lacaze S, et al (2003) A study of pelvic ligament strength. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 109:80–7
18. Reay Jones NH, Healy JC, King LJ, et al (2003) Pelvic connective tissue resilience decreases with vaginal delivery, menopause and uterine prolapse. *Br J Surg* 90:466–72
19. Umek WH, Morgan DM, Ashton-Miller JA, DeLancey JO (2004) Quantitative analysis of uterosacral ligament origin and insertion points by magnetic resonance imaging. *Obstet Gynecol* 103(3): 447–51
20. Boukerrou M, Lambaudie E, Collinet P, et al (2004) Mechanical resistance of pelvic ligaments used for incontinence or prolapse surgery. *Gynecol Obstet Fertil* 32:601–6
21. Vardy MD, Gardner TR, Cosman F, et al (2005) The effects of hormone replacement on the biomechanical properties of the uterosacral and round ligaments in the monkey model. *Am J Obstet Gynecol* 192(5):1741–51
22. Chen L, Ashton-Miller JA, Hsu Y, DeLancey JO (2006) Interaction among apical support, levator ani impairment, and anterior vaginal wall prolapse. *Obstet Gynecol* 108:324–32
23. Blaisdell FE (1917) The anatomy of sacro-uterine ligaments. *Anat Record* 12:1–42
24. Ramanah R, Parratte B, Hubert N, et al (2009) Anatomical and histological study of the uterosacral ligament: practical surgical consequences. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 38(4):304–11

Publication n°5

Basic and Translational Science

Biomechanical Properties of Human Pelvic Organs

**Chrystèle Rubod, Mathias Brieu, Michel Cosson, Géraldine Rivaux, Jean-Charles Clay,
Laurent de Landsheere, and Boris Gabriel**

Introduction :

A l'heure actuelle, les cures de prolapsus par voie vaginale par utilisation de tissu autologue sont encore largement répandues. Afin d'améliorer le résultat anatomique et de diminuer les taux élevés de récurrences de ces chirurgies traditionnelles qui sont de l'ordre de 30%, l'apparition de matériel prothétique a modifié les pratiques chirurgicales et ce en dépit d'un minimum d'études fondamentales. Ces prothèses sont placées dans l'espace vésico-vaginal et recto-vaginal pour renforcer les tissus natifs abimés. Toutefois, les caractéristiques mécaniques de ces prothèses n'ont pas été comparées à celles du vagin et des organes pelviens adjacents (vessie et rectum).

L

'amélioration des connaissances des comportements biomécaniques des organes pelviens pourrait aboutir à la conception de prothèses plus « fonctionnelles » répondant mieux aux caractéristiques mécaniques de ces tissus.

Cette étude a donc pour objectif de caractériser les propriétés biomécaniques des organes pelviens, la vessie, le vagin et le rectum, qui sont impliqués dans le maintien de la statique pelvienne.

Résumé des résultats :

Les prélèvements de vagin, de vessie et du rectum ont été prélevés post-mortem sur des bassins de 5 sujets féminins. Des tests de traction uniaxiale ont été réalisés pour chaque organe. Nous avons constaté que les propriétés biomécaniques du vagin, de la vessie et du rectum sont significativement différentes. Nous avons montré une relation non-linéaire entre contrainte et déformation, qualifiée de visco-hyperélastique. Les rigidités étaient comparables à faible déformation mais des différences plus marquées ont été constatées à forte déformation. Le vagin apparaît comme le plus rigide et le moins extensible que le rectum, qui est à son tour plus rigide que la vessie.

Discussion :

Cette étude montre que le vagin, la vessie et le rectum ont des propriétés biomécaniques différentes à forte déformation avec un comportement visco-hyperélastique. De plus, nous avons constaté que la vessie présente un comportement biomécanique anisotropique à forte déformation, c'est à dire que ce comportement peut varier en fonction de l'orientation du tissu. Nous avons aussi observé des rigidités différentes du vagin antérieur par rapport au vagin postérieur. Ces différences de rigidité peuvent s'expliquer partiellement par les différences de fonction des organes avoisinants et les caractéristiques histomorphométriques propres à chacun d'eux. La vessie et le rectum ont des rigidités faibles, leurs permettant une grande déformabilité avant rupture, en accord avec leurs rôles capacitifs et leurs mobilités.

En conclusion, ces constatations soulignent une nouvelle fois que la connaissance des comportements biomécaniques des tissus et organes pelviens peut permettre d'améliorer la conception de prothèses. L'utilisation du même matériel prothétique ou la même technique chirurgicale pour corriger les prolapsus antérieurs, moyens ou postérieurs peut ne pas être appropriée au regard de ces différences de rigidité.

Basic and Translational Science

Biomechanical Properties of Human Pelvic Organs

Chrystèle Rubod, Mathias Brieu, Michel Cosson, G  r  ldine Rivaux, Jean-Charles Clay, Laurent de Landsheere, and Boris Gabriel

OBJECTIVE	To comparatively define the biomechanical characteristics of the pelvic organs (the vagina, bladder, and rectum), which are crucial for the maintenance of pelvic support. Despite minimal fundamental studies, meshes are increasingly implanted into the vesicovaginal and rectovaginal spaces to replace disrupted native tissues and to treat pelvic organ prolapse. However, the mechanical characteristics of these materials have not yet been compared with those of the "functional unit," the vagina, bladder, and rectum.
METHODS	Samples from 5 fresh female cadavers without prolapse were collected. Uniaxial tension tests under monotonic and cyclic loading were performed and the stress-strain curves obtained.
RESULTS	The biomechanical properties of the vaginal, bladder, and rectal tissues differed significantly. We were able to demonstrate a nonlinear relationship between the stress and strain and a visco-hyperelastic behavior with a Mullins effect of damage of the tissues examined. Comparable rigidity was found between the investigated tissues at low strains; however, at large strain levels, marked differences could be observed. The vagina was much more rigid and less extendible than the rectal tissue, which, in turn, was more rigid than the bladder tissue. The anterior and posterior vagina revealed a different stiffness, and the bladder tissue was anisotropic at large strain levels.
CONCLUSION	Our results underline the pivotal role of the vaginal tissue for the maintenance of pelvic support. The observed differences with respect to tissue rigidity should have pronounced effects on the physiologic organ function, pointing to the necessity of a differentiated view on using the same prosthetic material for different anatomic locations. UROLOGY 79: 968.e17–968.e22, 2012. �� 2012 Elsevier Inc.

Pelvic organ prolapse (POP) is a prevalent disorder, and 1 of the most common indications for surgical treatment in women.^{1–4} It has been estimated that 50% of parous women have at least some degree of POP. A woman's lifetime risk of undergoing pelvic reconstructive surgery is estimated to be about 11% at the age of 80 years, and one third of the affected women require >1 surgical intervention.⁴

In POP surgery, the native tissue is widely used as a corrective support, and its biomechanical properties are unknown. In an attempt to improve the outcomes and durability of surgery, and despite minimal fundamental studies, prosthetic materials are being increasingly used in the management of POP. The prosthetic material is introduced into the vesicovaginal and rectovaginal spaces

to reinforce the weakened or disrupted native tissue. However, the mechanical characteristics of these materials have not yet been compared with those of the adjacent pelvic organs (ie, the vagina, bladder, and rectum).

Data on the biomechanical properties of the pelvic tissues are scarce, and the available results are from studies of vaginal tissue biomechanics.^{5–10} To date, a precise definition of the mechanical behavior of the neighboring organs, such as the rectum, bladder, uterus, pelvic muscles, and ligaments, is lacking.

A better understanding of pelvic organ tissue biomechanics could enhance the development of "more functional" prostheses designed for use in vaginal prolapse surgery in the future. Moreover, the investigation of the vaginal, bladder, and rectal tissue biomechanics could provide new insights into the pathophysiology of POP and improve the care of the affected patients. Finally, accurate knowledge of tissue biomechanics is essential for developing realistic computer-based surgical simulators and robots allowing haptic feedback.

The aim of our study was to characterize the biomechanical properties of the 3 adjacent human pelvic organs, the vagina, bladder, and rectum, which are critically involved in the maintenance of pelvic statics.

Financial Support: Unconditional financial support for basic research from Ethicon Women's Health and Urology.

From the Department of Gynaecology, Jeanne de Flandre Hospital-CHRU de Lille, University Nord de France, Lille, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U703, University Nord de France, Lille, France; LML, CNRS UMR 8107,   cole Centrale de Lille, University Nord de France, Lille, France; and Universitäts-Frauenklinik Freiburg, Freiburg, Germany

Reprint requests: Chrystèle Rubod, M.D., Clinique de Chirurgie Gyn  cologique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, France. E-mail: chrystele.rubod@chru-lille.fr
Submitted: July 20, 2011; received (with revisions): November 10, 2011

   2012 Elsevier Inc.
All Rights Reserved

0090-4295/12/\$36.00 968.e17
doi:10.1016/j.j.urology.2011.11.010

MATERIAL AND METHODS

Recently, we were able to establish and validate a new experimental protocol for the biomechanical characterization of vaginal tissue.⁹ Tissue samples were obtained from 5 fresh female cadavers (mean age 75 years) without a history of pelvic reconstructive surgery and without clinically relevant POP, which was excluded by gynecologic examination and use of a Pozzi clamp to pull on the cervix. The cadavers had not been prepared with formaldehyde but were frozen for conservation and unfrozen just before the dissection. The cadavers were dissected and studied at the Anatomical Institute of the Faculty of Medicine of the CHRU Lille, France. Each patient had agreed before death to have their cadaver used for medical purposes according to the legislation in force. The institutional review board approved the experimental protocol. The biopsies were performed according to the following protocol using the same method for all 5 cadavers. First, hysterectomy was performed by the abdominal route (transverse abdominal incision). The rectum was dissected and freed from the mesothelium and subsequently removed from its proximal and distal parts. The resected specimen was then oriented, and full-thickness biopsy from the anterior and posterior rectal walls at the level of the rectovaginal septum was performed. Subsequently, the vesicovaginal and Retzius spaces were dissected, and the bladder was freed from the paravesical tissue. After total cystectomy, full-thickness biopsy specimens were taken in longitudinal and circumferential directions and also from the anterior and posterior bladder walls, respectively. The vaginal specimens were collected from the anterior and posterior vaginal walls by the vaginal route. A midline incision was performed along the longitudinal axis of the vagina, and full-thickness vaginal tissue was excised. Each specimen measured $\geq 3 \times 1$ cm. The size of the removed specimens was, in general, large enough to generate several samples for each localization (anterior [$n = 2$] and posterior [$n = 2$] organ walls) and orientation (longitudinal [$n = 2$] and transverse [$n = 2$] axis of the tissues) per tissue and cadaver, respectively, for a total number of a maximum 8 individual samples per cadaver for the bladder, vagina, and rectum, respectively.

All samples were oriented and marked before being frozen in a 0.9% salt solution at -18°C . The excised tissues were used to perform uniaxial tension tests to the point of rupture, as previously described in the protocol by Rubod et al.⁹ In the present study, we were able to prove that freezing had no effect on the mechanical properties of the tissues (ie, no difference was found between the mechanical response of the fresh and frozen tissue).⁹ Importantly, all parameters that could alter tissue behavior during the test (eg, conditioning of the tissue before testing and the conditions of the tension test, such as temperature, rate of deformation, hydrometry) have been exhaustively studied previously.⁹ In brief, the tissue samples were unfrozen 9 hours before the tests and were kept in 0.9% salt solution at ambient temperature (20°C) to not deteriorate the tissues. To obtain an area of uniform stress in the center of the test samples during the tension test, standardized 25×4 -mm test samples were excised from the tissues using a punch. The thickness of each sample was measured with a caliper rule to further determine the nominal stress (F/S_0 , where F is the load and S_0 is the size of the initial cross-section). The thickness varied from 1 to 2 mm, depending on the tissue, and the controlled width was equal to 4 mm, as determined by the punch. Each sample was clamped in a tightening grip and underwent strain at a constant strain rate ($2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) at ambient temperature (20°C) within 24 hours after unfreezing. The distance between the

grips, once tightened, was 15 mm, with 5 mm clamped on each end. The grip fixture was designed to prevent tissue slippage during the test.⁹ The samples were directly loaded without a preloading phase. The present results included the complete response from 0 force to rupture. The rupture tests were performed using a conventional tension machine (Instron 5882). Each test was repeated for each tissue on different samples from the same cadaver at least twice (range 2-5). A low capacity load cell (1 kN) was used to measure the nominal stress (force per unit of surface) during the test, knowing the forces and the initial cross-section of the samples. The load cell sensitivity was 0.01 N (0.001 class) and agreed with the quantity measured. Strain ($(l - l_0)/l_0$, where l is the length and l_0 the initial length) was measured with a contactless video extensometer. Subsequently, the stress-strain curves were obtained and analyzed to characterize the biomechanical behavior of the considered tissues. The mechanical response of the specimens before rupture was then studied. Studying the nonlinear elasticity requires at least the application of 2 parameters: C0 and C1. The stress-strain curves allowed the calculation of these values, which are identified in the complete mechanical response using the least squared roots method (Mooney-Rivlin model).¹¹⁻¹³ C0 characterizes the stress-strain curve at the beginning phase (ie, low strain, $<5\%$), and C1 characterizes the form of the asymptote toward the end of the stress-strain curve (ie, large strain).

For statistical analysis, the SPSS, version 19.0 (SPSS, Chicago, IL), was used. An unpaired t test and nonparametric Mann-Whitney U test were performed to reveal the potential differences in the biomechanical properties among the different tissues investigated (ie, vagina, bladder, and rectum). $P < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Tissue samples from the vagina, urinary bladder, and rectum were collected in a standardized manner from 5 fresh female cadavers without clinically relevant POP.

The size of the removed specimens allowed us to perform several rupture tests for each of the tissues examined per cadaver. The respective curves obtained from the same cadaver were superimposed and revealed good intra-individual reproducibility of the experiments performed according to our protocol (Fig. 1).

The rupture and cyclic loading tests revealed the nonlinear relationship between the stress and strain and a large deformation of the tissues before rupture (Figs. 1 and 2). This nonlinear relationship with large deformation is also known as hyperelastic behavior. The cyclic loading tests (Fig. 2) revealed very strong hysteresis between the load and unload phases, proving a viscous component of the mechanical response. This mechanical behavior is therefore visco-hyperelastic. In addition, Figure 2 shows that the stress at a prescribed strain, which is reached during the second load, is always smaller than that during the first load. This phenomenon is also referred to as Mullins type damage or Mullins effect and is well known for hyperelastic material.¹⁴

Using the parameters C0 and C1, we were able to perform a descriptive analysis regarding the rigidity of the 3 investigated pelvic tissues. We observed that at low strain (C0, $<5\%$), the 3 studied tissues presented virtu-

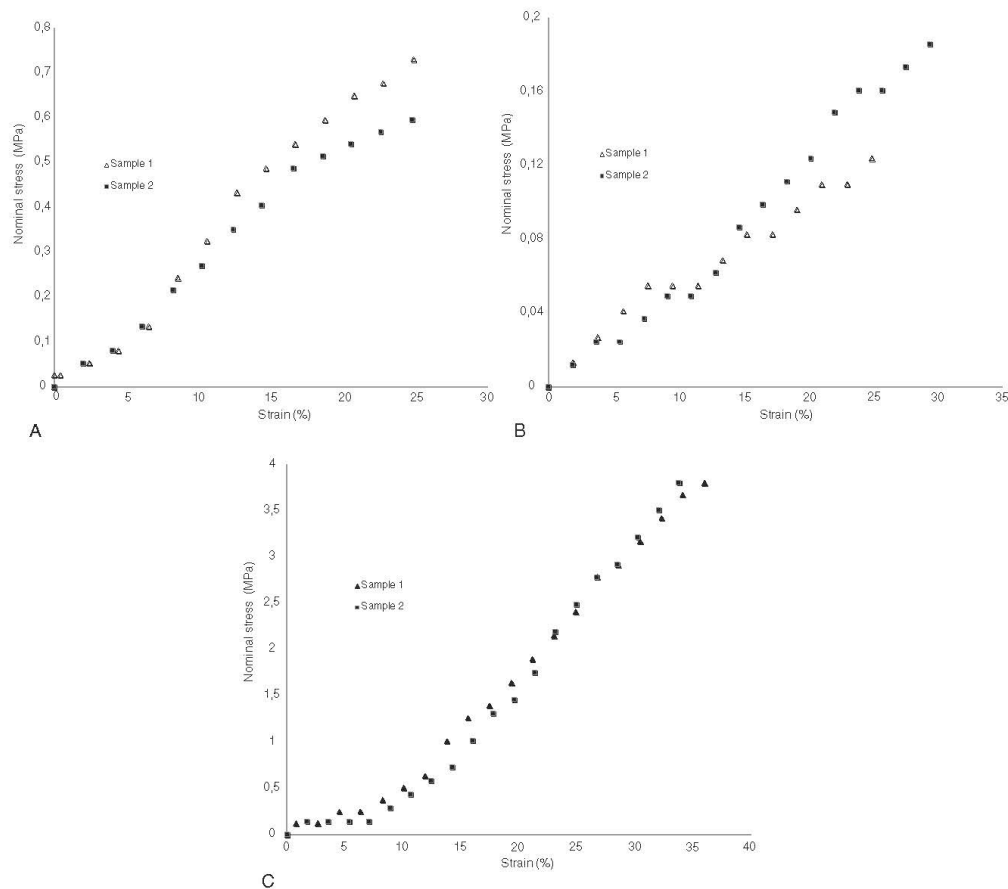


Figure 1. Reproducibility of rupture tests on (A) rectal, (B) bladder, and (C) vaginal tissue showing nominal stress induced in tissues for prescribed strain during uniaxial tension tests. Two respective curves plotted for each of examined tissues represent different samples from same specimen and cadaver. Dots on each curve depict individual experimental measurements.

ally the same rigidity (Fig. 3). However, at large strain levels (C1), the vaginal tissue (anterior and posterior vagina) was much more rigid (and less extendible) than was the rectal tissue, which, in turn, was more rigid (and less extendible) than was the bladder (Fig. 3). At large strain levels, the tissues derived from the anterior and posterior vaginal wall revealed a significantly different biomechanical behavior with respect to tissue rigidity ($P = .035$), which was not the case at low strain levels ($P = .381$; Fig. 4). The same was true for the bladder tissues in the longitudinal and circumferential directions and from the anterior or posterior bladder walls. No differences in biomechanical behavior were found at low strain levels ($P = .950$ and $P = .531$, respectively). However, at large strain levels, a clear trend toward anisotropic mechanical behavior of the bladder tissue was observed ($P = .06$ for comparison of the longitudinal and circumferential direction; $P = .043$ for comparison of the anterior and

posterior bladder walls; Fig. 4). We were unable to detect such anisotropic mechanical behavior when the anterior and posterior rectal tissues were compared with each other—either at low or large strain levels ($P = .951$ and $P = .123$, respectively). Thus, when comparing the biomechanical properties of the different pelvic tissues from the same patient (Fig. 3), we were able to report hyperelastic behavior for each of them and marked differences in rigidity considering large strain levels. The ultimate strain level before tissue rupture for the vagina, rectum, and the bladder was 20%, 30%, and 80%, respectively.

COMMENT

In the present study, we were able to demonstrate that the biomechanical properties of the vaginal, bladder, and rectal tissue differed significantly at large strain levels. We found a visco-hyperelastic behavior with a Mullins

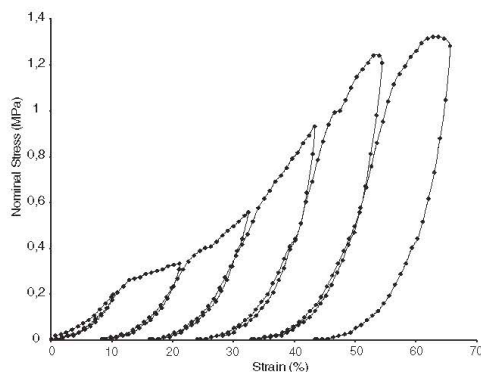


Figure 2. Cyclic loading test on bladder tissue showing stress at prescribed strain reached during second load is always smaller than during first load. This phenomenon is also known as Mullins type tissue damage. Dots on each curve represent individual experimental measurements.

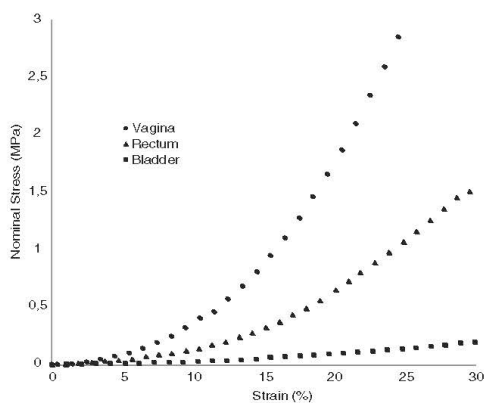


Figure 3. Biomechanical behavior of vaginal, rectal, and bladder tissue showing nominal stress induced in tissues for prescribed strain during uniaxial tension tests. Vaginal tissue is more rigid than rectal tissue, which, in turn, is more rigid than bladder tissue.

damage effect in the tissues examined. Although at first, these results might not be surprising, our primary rationale for investigating these adjacent tissues from a biomechanical perspective was the increasing use of prosthetic material in the interface between these organs to prevent POP recurrence. To our knowledge, this is the first study to investigate the vagina, bladder, and rectum as a functional unit from a biomechanical viewpoint, and we were able to obtain good reproducibility for our results.

Our results emphasize the "remnant" deformation of the examined pelvic tissues and how stress softening and residual strain changes with the magnitude of the applied load, commonly described as the Mullins effect or Mullins type damage, which is well known for elastomers and

other soft tissues.¹⁵ It is characterized by a stress-softening phenomenon at the end of the first load to a given strain. Regarding the vaginal tissue, this was previously observed by Clay et al.¹⁶

Although our sample size was quite small, we detected an anisotropic mechanical behavior of the bladder tissue at large strain levels, as well as differences in tissue rigidity between the anterior and posterior vaginal wall tissues, as suggested recently by Clay et al,¹⁶ who investigated prolapsed and nonprolapsed vaginal tissues. These results might have profound implications in our understanding of the pelvic floor and, consequently, on the use of prosthetic material to reinforce damaged or weakened native tissues, such as the pubocervical fascia and the rectovaginal septum. Clinically, the low recurrence rate in the posterior compartment and the current lack of convincing data for the superiority of meshes in this compartment might reflect and underline our findings. It becomes evident that the use of the same prosthetic material or even the same surgical approach for different anatomic locations might not be appropriate, considering the observed differences in rigidity and anisotropy at large deformations. Perhaps different surgical concepts or strategies should be considered in the future when treating anterior and posterior compartment prolapse.

In this paradigm, the knowledge of the biomechanical properties of normal vaginal tissue and the adjacent pelvic organs might enhance the development of more suitable and "functional" synthetic prostheses designed for use in vaginal reconstructive surgery. Increasing evidence suggests that the concept of the stress transmission at the tissue-implant interface is of outstanding importance.¹⁷ It is characterized by the biomechanical properties of the implant and native surrounding tissue. A mismatch between both could lead to a disturbed transmission of the loads at this interface and thus influence the likelihood of complications, such as erosion or poor clinical results.

Although one might be tempted to assume that the vaginal tissue is of paramount importance and a "key structure" with regard to pelvic support, from our data on tissue rigidity, we must consider critically that we did not investigate the contribution of the pelvic ligaments, which play a pivotal role in this interdependent system.

It is not new that human bladder tissue shows a mechanical anisotropism owing to the orientation preference in tissue fiber alignment. However, we detected such differences between the longitudinal and circumferential directions and between the anterior and posterior bladder walls only at large strains levels. At low levels, we did not observe any differences. The same was true for the anterior and posterior vagina. Therefore, when searching for the "ideal mesh," we should account for such large deformations occurring during POP and, consequently, the different biomechanical behavior of the tissues. To date, no valid estimations of the strain levels occurring during POP are available. Parente et al¹⁸ investigated the effects that the passage of a fetal head can

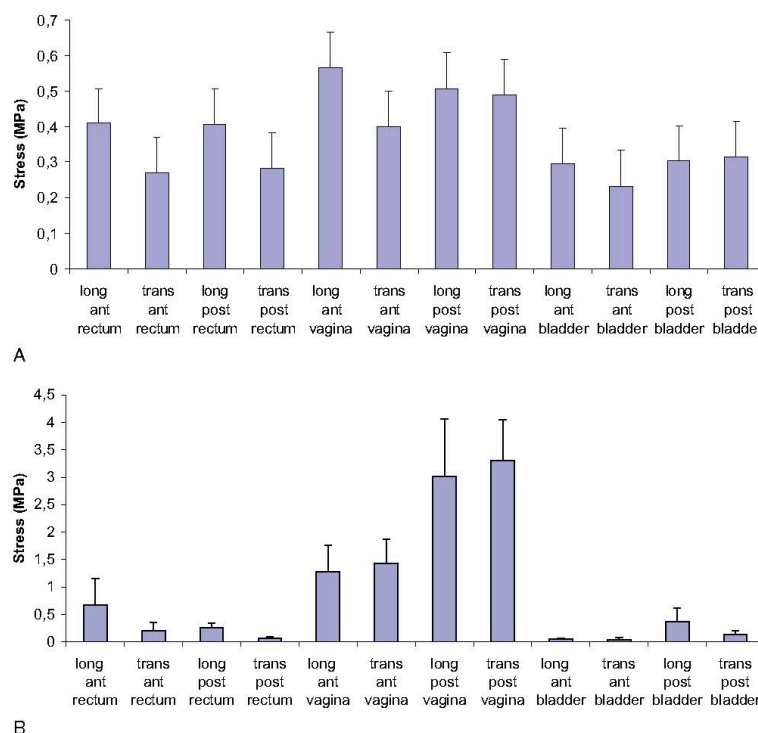


Figure 4. (A) Rigidity of studied tissues at low strain levels (C0). (B) Rigidity of studied tissues at large strain levels (C1). Mean \pm SD provided. Long, longitudinal axis of tissue; trans, transversal axis of tissue; ant, anterior; post, posterior.

induce on the muscles of the pelvic floor from a mechanical viewpoint.¹⁸ They were able to show that the maximal deformation obtained was 0.66 for vertical displacement of a fetal head of approximately 60 mm. However, the biomechanical characteristics in physiologic conditions, such as intercourse or delivery, might be quite different from those in pathologic situations such as POP.

In contrast to the vaginal and bladder tissue, the rectal tissue did not reveal any significant differences with regard to the anterior and posterior wall biomechanical properties. This might be because of the shape and physiologic function of the organ.¹⁹ In contrast to the bladder, which can be described and modeled as a sphere, the rectum can be viewed as a tube. In the bladder smooth muscle cells, the response to transient stretch occurs not only through the signaling pathways but rather through release of increased tensile forces that drive extremely rapid disassembly of actin.²⁰ Data on anisotropic behavior of the human bladder have been contradictory. Wang et al²¹ found greater compliance of the bladder wall in the circumferential than in the longitudinal direction. In contrast, others have found the opposite.^{22,23} Marino et al²⁴ showed that the trigone is the area with the greatest stiffness compared with other locations and results from structural differences. The bladder wall is composed of

smooth muscle, collagen, and elastin and undergoes profound remodeling in response to mechanical stress resulting from various pathologic features. The bladder responds to prolonged periods of high strain by increasing its compliance through de-novo synthesized elastin fibers.²⁵ Thus, in the same bladder, different mechanical behavior can be observed, depending on the different layers of the extracellular matrix examined.²³

The obtained results from the vaginal, bladder, and rectal tissue in our study are of qualitative value owing to our small sample size. A comparison between these organs is yet promising. We found a large difference in rigidity among the studied pelvic organs at large strain levels. These differences in rigidity before tissue rupture could at least partially be explained by differences in the physiologic function and histomorphology of the organ. The rectum and bladder possess weak rigidity, allowing to these organs to fulfill important deformation without rupture, in accordance with their filling function and organ mobility. Thus, the rectum and bladder are able to ensure their storage function for urine and stool.

In addition to a relatively small study group, the other potential limitations of the present study include that the mechanical properties of the investigated specimen might not be representative of those in the entire struc-

ture. Furthermore, we could not exclude some variability owing to minimal variations at the biopsy site. We did not study the certainly much more complex and dynamic interactions in the vaginal, bladder, and rectal tissue in vivo. We investigated cadaveric tissue of a population well advanced in years, and the postmortem changes must be considered. Therefore, we could not extrapolate our results to those in vivo. The size of the error introduced by these limitations is unknown. However, these first pilot results are promising, and the described limitations emphasize the need for in vivo measurement systems using nondestructive tests.

CONCLUSIONS

The biomechanical properties of the vaginal, bladder, and rectal tissues differed significantly. We were able to demonstrate a nonlinear relationship between the stress and strain levels and a visco-hyperelastic behavior with Mullins effect damage of the tissues examined. We suggest that the use of the same prosthetic material or surgical approach for different anatomic localizations might not be appropriate, considering the observed differences in rigidity and anisotropy at large deformations.

Acknowledgment. To Laboratory of Anatomy of the CHRU Lille, with thanks, for support with cadaver dissection.

References

- Samuelsson EC, Arne Victor FT, Tibblin G, et al. Signs of genital prolapse in a Swedish population of women 20 to 59 years of age and possible related factors. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;89:501-506.
- Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, et al. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol.* 1997;89:501-506.
- Bump RC, Norton PA. Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1998;25:723-746.
- Luber KM, Boero S, Choe JY. The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:1496-1503.
- Rao GV, Rubod C, Brieu M, et al. Experiments and finite element modeling for the study of prolapse in the pelvic floor system. *Comput Methods Biomech Biomed Eng.* 2010;22:1.
- Otto L, Slayden O, Clark A, et al. The rhesus macaque as an animal model for pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:416-421.
- Tillier Y, Paccini A, Durand-Reville M, et al. Finite element modelling for tissue surgery based on linear and nonlinear elasticity behavior. *Comput Aid Surg.* 2006;11:63-68.
- Gao C, Gregersen H. Biomechanical and morphological properties in rat large intestine. *J Biomech.* 2000;33:1089-1097.
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, et al. Biomechanical properties of vaginal tissue. Part 1: new experimental protocol. *J Urol.* 2007;178:320-325.
- Gabriel B, Rubod C, Brieu M, et al. Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: Do they have similar biomechanical properties? *Int Urogynecol J.* 2011;22:23-27.
- Mooney M. A theory of large elastic deformation. *J Appl Physiol.* 1940;11:582-592.
- Rivlin RS. Large elastic deformations of isotropic materials. I. Fundamental concepts, II. Some uniqueness theorems for pure homogenous deformations. *Philos Trans R Soc Lond A Math Phys Sci.* 1948;A240:459-490.
- Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, et al. Biomechanical properties of vaginal tissue: preliminary results. *Int Urogynecol J.* 2008;19:811-816.
- Mullins L. Effect of stretching on the properties of rubber. *J Rubber Res.* 1947;19:275-289.
- Diani J, Brieu M, Gilomini P, et al. Observation and modelling of the anisotropic visco-hyperelastic behaviour of a rubber-like material. *Int J Solids Struct.* 2006;43:3044-3056.
- Clay JC, Rubod C, Brieu M, Boukerrou, et al. Biomechanical properties of prolapsed or non-prolapsed vaginal tissue: impact on prolapse surgery. *Int Urogynecol J.* 2010;21:1535-1538.
- Dietz HP, Vancaillie P, Svehla M, et al. Mechanical properties of urogynecologic implant materials. *Int Urogynecol J.* 2003;14:239-243.
- Parente MP, Jorge RM, Mascarenhas T, et al. Deformation of the pelvic floor muscles during a vaginal delivery. *Int Urogynecol J.* 2008;19:65-71.
- Petersen P, Gao C, Rössel P, et al. Sensory and biomechanical responses to distension of the normal human rectum and sigmoid colon. *Digestion.* 2001;64:191-199.
- Chen C, Krishnan R, Zhou E, et al. Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch. *PLoS ONE.* 2010;5:e12035.
- Wang CC, Nagatomi J, Toosi KK, et al. Diabetes-induced alterations in biomechanical properties of urinary bladder wall in rats. *Urology.* 2009;73:911-915.
- Parekh A, Cigan AD, Wognum S, et al. Ex vivo deformations of the urinary bladder wall during whole bladder filling: contributions of extracellular matrix and smooth muscle. *J Biomech.* 2010;43:1708-1716.
- Gilbert TW, Wognum S, Joyce EM, et al. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix. *Biomaterials.* 2008;29:4775-4782.
- Marino G, Bignardi C, Pacca M, et al. Mechanical characteristics of the human bladder wall and application of the results in a finite elements model to study the pelvic floor. *Minerva Urol Nefrol.* 2006;58:213-219.
- Wognum S, Schmidt DE, Sacks MS. On the mechanical role of de novo synthesized elastin in the urinary bladder wall. *J Biomech Eng.* 2009;131:101018.

Publication n°6

<p><u>Publication n°6</u></p>

<p>« <i>Elastin density: the link between biochemical and biomechanical properties of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse?</i> »</p>

<p>de Landsheere L, Brieu M., Blacher S, Munaut C, Nusgens B, Lecomte-Grosbras P, Rubod C, Noel A, Foidart JM, Nisolle M, Cosson M.</p>

<p>Article soumis pour publication</p>
--

Introduction :

L'histologie à elle seule ne peut expliquer la physiopathologie du prolapsus génital. Des études biomécaniques peuvent aider à mieux comprendre les changements observés par les analyses immuno-histochimiques. L'analyse simultanée des caractéristiques histomorphométriques et du comportement biomécanique du même tissu vaginal provenant d'une même patiente est un axe de recherche original que nous avons cherché à développer.

Le but de cette étude est de comparer les propriétés biomécaniques et biochimiques du tissu vaginal de patientes présentant un prolapsus génital.

Résumé des résultats :

Pour réaliser cette comparaison, nous avons décomposé le comportement biomécanique du tissu vaginal en 2 phases, une première phase correspondant aux faibles déformations et une seconde phase correspondant à une forte déformation. Dans la première phase, la traction exercée sur le tissu vaginal entraîne un alignement des fibres de ce tissu fibro-élastique suivi d'une seconde phase d'élongation une fois que les fibres sont alignées ce qui augmente la rigidité jusqu'au seuil de rupture. Dans l'ensemble des essais, lors de la première phase d'étirement, une faible rigidité se traduit dans la majorité des cas par une densité élevée d'élastine, surtout dans la lamina propria, et une forte rigidité se traduit toujours par une densité faible en élastine.

Ces résultats confirment l'hypothèse que le tissu vaginal est peu rigide dans la première phase d'étirement lorsque la quantité d'élastine est élevée ce qui correspond à la phase d'alignement des fibres élastiques du tissu. En cas de rigidité élevée dès le début de l'essai, le tissu vaginal est alors moins dense en élastine et l'alignement des fibres est donc plus court. En cas de large déformation, la relation entre densité d'élastine et rigidité est moins évidente et la dispersion est plus importante dans la seconde phase de l'essai.

Discussion :

L'originalité de ce travail est de mettre en relation les données biomécaniques et biochimiques dans la même région chez une même patiente. Peu d'études à ce jour ont associé une analyse des propriétés biomécaniques et de la composition de ce même tissu chez des patientes présentant ou non un prolapsus génital. Selon Zhou et al, le tissu vaginal apparaît plus rigide chez les patientes présentant un prolapsus génital par rapport à un groupe contrôle et s'associe à une diminution de la quantité de collagène III du même tissu [97]. Cependant, il faut noter que les mesures de rigidité dans cette étude sont réalisées par microscopie à balayage et qu'il ne s'agit pas de tests de traction uniaxiale. Cette technique possède l'avantage de pouvoir être réalisée sur des tissus de plus petite taille mais sa validité n'a pas été confirmée par une étude comparative avec des tests biomécaniques traditionnels par traction uniaxiale. De plus, les quantifications ont été réalisées par Western blot et centrées sur les collagènes I et III en postulant que c'est le collagène III qui confère l'élasticité au tissu mais il n'a pas été tenu compte du rôle potentiel de l'élastine.

Une étude récente, réalisée cette fois sur des brebis, a comparé les propriétés biochimiques et biomécaniques du vagin à différents stades de reproduction (vierge, enceinte et multipare) [98]. Cette étude montre que les brebis multipares présentent une diminution du contenu en élastine et une augmentation du contenu total en collagène. Par ailleurs, les brebis enceintes présentent le contenu en élastine le plus élevé et une diminution du contenu total en collagène. D'un point de vue biomécanique, le tissu vaginal des brebis enceintes apparaît comme le plus extensible mais aussi le moins résistant, alors que les tissus de brebis vierges ou multipares étaient plus résistants et élastiques [98]. Ces résultats vont dans le même sens que nos observations et apportent des éléments complémentaires sur le rôle du collagène dans les propriétés biomécaniques du vagin. Dans cette étude, le dosage du collagène et de ces sous-types I et III a été réalisé par mesure de l'hydroxyproline et électrophorèse. Les résultats de ces analyses ne montrent pas de différences significatives entre les taux de collagènes I et III dans les différents groupes de brebis.

Enfin, une autre étude menée par Ennen et al, portant sur l'analyse du tissu vaginal de brebis présentant un prolapsus en antepartum, montrait une diminution de l'expression en ARNm du collagène I (par rapport à des brebis contrôles enceintes) ce qui suggère à nouveau que des altérations du métabolisme du collagène peuvent être impliqués dans la pathogenèse du

prolapsus génital [99]. Notre étude montre que les propriétés biomécaniques du tissu vaginal varient d'une patiente à l'autre et suggère que le facteur prédictif principal de la rigidité du vagin est la densité d'élastine. Ce résultat est à confirmer par des études plus larges et par une amélioration de l'évaluation qualitative et quantitative du collagène

.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

Elastin density: the link between biochemical and biomechanical properties of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse?

Laurent DE LANDSHEERE, MD ^(1,2), Mathias BRIEU, PhD ⁽³⁾, Silvia BLACHER, PhD ⁽²⁾, Carine MUNAUT, PhD ⁽²⁾, Betty NUSGENS, PhD ⁽⁴⁾, Pauline LECOMTE-GROSBRAS, PhD ⁽³⁾, Chrystèle RUBOD, MD, PhD ⁽⁵⁾, Agnès NOEL, PhD ⁽²⁾, Jean-Michel FOIDART, MD, PhD ^(1,2), Michelle NISOLLE, MD, PhD ^(1,2), Michel COSSON, MD, PhD ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, University of Liège, CHR La Citadelle, Boulevard du 12^e de ligne, n°1, 4000 Liège, Belgium

⁽²⁾ Laboratory of Tumor and Development Biology, CHU, GIGA-Cancer, University of Liège, Sart-Tilman, Belgium.

⁽³⁾ LML, CNRS UMR 8107, Ecole centrale de Lille, University Nord de France, Lille, France.

⁽⁴⁾ Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-Cancer, University of Liège, Sart-Tilman, Belgium.

⁽⁵⁾ Department of Gynecologic Surgery, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Avenue Oscar Lambret, n°2, 59037 Lille Cedex, France

All authors have fulfilled all conditions required for authorship and agree with its submission to American Journal of Obstetrics and Gynecology.

The authors have no conflicts of interests except Michel Cosson, who is consultant for Ethicon, AMS, Boston, Allergan, and Olympus. He is owner of patents in the field of urogynecology in development, and has one Research project funded by Ethicon.

Corresponding author

Laurent DE LANDSHEERE, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Liège,

CHR La Citadelle, Boulevard du 12^e de ligne, n°1, 4000 Liège, Belgium

Phone: +3242257166, Fax: +3242257575, E-mail: ldelandsheere@chu.ulg.ac.be

Word count : Abstract : 211 Main Text : 2781

Abstract

OBJECTIVE: To correlate the biochemical and biomechanical characteristics of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse (POP).

STUDY DESIGN: Tissue samples were collected from the most distal portion of the anterior (POP-Q Ba) and/or posterior (POP-Q Bp) vaginal wall of women who underwent vaginal surgery for POP. Biochemical and biomechanical assessments were performed from the same tissue samples. For biochemistry, the density of collagen and elastic fibers was determined by combining high-resolution virtual imaging and computer-assisted digital image analysis. For biomechanical testing, uniaxial tension tests were performed to evaluate the stiffness of the vaginal tissue at low (C_0) and high (C_1) deformation rates.

RESULTS: The biomechanical testing highlights the hyperelastic behavior of the vaginal wall. At low strains (C_0), the vaginal tissue was stiffer when the elastin density was low. We found a statistically significant inverse relationship between C_0 and the elastin/collagen ratio ($p=0.048$). However, at large strain levels (C_1), no clear relationship was observed between elastin density and stiffness, likely reflecting the large dispersion of the mechanical behavior of the tissue samples.

CONCLUSION: The biomechanical properties of the vaginal wall are varying from patient to patient. This study suggests that elastin density deserves consideration as a relevant predictive factor of stiffness in the vagina of women with POP.

Keywords: Vagina - Pelvic Organ Prolapse – Collagen – Elastin - Connective tissue

Abbreviations: POP = Pelvic Organ Prolapse, ECM = Extracellular Matrix, α SMA = Alpha Smooth Actin, RGB = Red Green Blue, SHM = Scanning Haptic Microscope

Introduction

Structural components forming the vaginal wall and its supporting connective tissue condition its biomechanical properties. Their alterations are most probably involved in the physiopathology of pelvic organ prolapse (POP). POP is a global health problem that can seriously impact on quality of life in women. It is one of the most common indications for gynecological surgery in post-menopausal women. The lifetime risk to undergo surgery for prolapse or incontinence is 11%¹. Vaginal childbirth, obesity, and advancing age are important risk factors for developing POP^{2,3}. The high recurrence rate of POP (almost 30%) after surgical repair using weak native tissue¹ suggests that a genetic predisposition can also play a role in POP development⁴.

The investigations on vaginal tissue composition in women with pelvic organ prolapse are currently still limited and led to controversial results⁵. To date, the contribution of specific connective tissue components to the support of pelvic organs and to the mechanical properties of the vaginal wall is still difficult to determine.

Histologically, the vaginal wall is composed of four layers. The epithelial layer is a superficial non-keratinized squamous epithelium. The subepithelial layer or lamina propria is a dense connective tissue layer mainly composed of fibrillar collagens and elastin populated by fibroblasts. The muscularis is mainly composed of smooth muscle cells embedded in connective tissue. The adventitia is a loose connective tissue layer that separates the muscularis of the vagina and the paravaginal tissue.

Collagens and elastin are fundamental fibrillar components that control the biomechanical properties of the vaginal tissue. Collagen fibers are very rigid and do not easily distort while elastic fibers provide elasticity and recoil to the tissue. Elastic fibers are important for the maintenance of vaginal structural integrity against mechanical strain.

Histology alone does not allow to explain changes in connective tissues and to understand their involvement in the pathogenesis of POP. The links between the biochemical and mechanical properties of the vaginal tissue may be established by correlating immunohistochemical or biochemical features. The major limitation to perform biochemical and biomechanical testing in patients with POP and in healthy women is the collection of tissues. Sample size is particularly limited in the control group of patients undergoing hysterectomy.

We previously described the histological changes observed between two different locations of the vaginal wall in women with POP by immunohistochemistry combined with computer assisted digital image analysis ⁶. A significant decrease in elastin density was observed in the most distal portion of the vaginal wall compared to that of the precervical area of the same women. This study highlighted the involvement of elastin in the pathophysiology of POP but the mechanism underlying this disorder is still unclear.

To better evaluate the impact of histomorphometric changes on the mechanical properties of vaginal tissue in women with POP, we simultaneously tested, in this study, the biomechanical behaviour of the vaginal tissue and correlated it with the composition of the connective tissue constituents in the same sample evaluated by semi-quantitative immunohistochemistry.

Materials and Methods

Patients

Tissue samples were obtained from 15 women who underwent vaginal surgical procedures for pelvic organ prolapse at the Department of Gynecological Surgery of the University Hospital Jeanne de Flandre, Lille, France. Institutional Review Board approval was obtained prior to the start of the study (CPP 09/62), which was conducted between February and May 2012.

All patients underwent an assessment of their POP stage according to the International Pelvic Organ Prolapse Quantification system ⁷. Demographic characteristics (age, parity, BMI, menopausal status, POP-Q stage and type of surgery) were collected prospectively and stored in a dedicated database.

Full-thickness vaginal tissue samples were taken from each woman in the longitudinal axis of the middle third anterior and/or posterior vaginal wall. Biopsies were collected only in the compartment involved during the POP repair. Samples were obtained with Metzenbaum scissors during POP repair, after making a sagittal midline incision, on either side of the tissue at the Ba and/or Bp POP-Q points. The left side was collected for biomechanical testing and the right side for biochemical analysis.

Histological Material

Human biopsy specimens were fixed in buffered 4% formalin, embedded in paraffin, and serially sectioned at a thickness of 5 µm. Tissue sections were stained with routine dyes (hematoxylin-eosin) for conventional histopathological evaluation or with specific stains,

such as Masson's trichrome or orcein, to evaluate collagen and elastic fibers respectively ⁸.

Smooth muscle cells in the muscularis layer were identified by immunohistochemical staining with α SMA antibodies.

Image Analysis

Virtual images were acquired with the fully automated digital microscopy system dotSlide (Olympus, BX51TF, Aartselaar, Belgium) coupled with a Peltier-cooled high-resolution digital color camera (1376x1032 pixels; XC10, Olympus). Digital images of the whole tissue sections were digitized at high magnification (100x), producing virtual images in which the pixel size was 0.65 μ m.

The image analysis was performed as previously described ⁶. This methodology combines high-resolution virtual imaging of full thickness biopsies and computer-assisted image analysis ^{9, 10}.

On the processed images, the following parameters were measured (6): (a) the muscle density in the muscularis: area occupied by smooth muscle cells per unit surface of the muscularis layer, (b) the elastin density in the muscularis and (c) in the lamina propria: area occupied by elastic fibers per unit surface of respectively, muscularis and lamina propria, (e) the total collagen density in the muscularis and (f) in the lamina propria: area occupied by the collagen fibers per unit surface of, respectively, the muscularis, and the lamina propria, (g) the ratio elastin/collagen in the muscularis and in the lamina propria.

Biomechanical tests condition

The experimental method for biomechanical characterization of vaginal tissue employed in this study was conducted following the protocol of Rubod et al. ^{11, 12}, that allows performing the biomechanical testing in controlled and reproducible conditions (temperature, hygrometry, rate of deformation).

The tissue samples were unfrozen 9 hours before the tests and were kept in 0.9% salt solution at ambient temperature (20°C) to avoid tissue deterioration. To obtain an area of uniform stress and strain during the tension test, standardized test samples of 25 x 4 mm were excised from the tissue using a punch. Due to the sample geometry, only uniaxial tension test can be performed. The thickness of each sample was measured with a caliper rule to further determine the nominal stress (F/S_0 , where F is the load and S_0 is the size of the initial cross

section). Each sample was clamped in a tightening grip designed to prevent tissue slippage during the test¹¹. The samples were directly loaded without a preloading phase. The herein results included the complete response from zero force to rupture. The rupture tests were performed using a conventional tension machine (Instron 5882). A low capacity load cell (1 kN) was used to measure the nominal stress (force per unit of surface) during the test, knowing the force and the initial cross-section of the samples. The load cell sensitivity was 0.01 N (0.001 class), which is in agreement with the quantity measured. Strain $(l-l_0/l_0)$ where l is the length and l_0 the initial length) was measured with a contactless video extensometer. Subsequently, the stress-strain curves were obtained and analyzed to characterize the biomechanical behavior of the considered tissues. The mechanical response before rupture of the specimens was then studied. For a comparative statistical analysis of all the experimental data, a behavior model had to be incorporated, taking into account nonlinear elasticity phenomena during major deformation (Mooney-Rivlin model)^{13,14}. This model requires at least the application of two parameters, C_0 and C_1 , characterizing the biomechanical behavior under low and large deformation respectively using the least squared roots method: $\sigma = 2 (\lambda - 1 / \lambda^2) [C_0 + C_1 (\lambda^2 + 2 / \lambda - 3)]$ where σ is the nominal stress and λ is the stretch. Each sample was then tested and thus, two parameters per sample, C_0 and C_1 were obtained.

Statistic analysis

Statistical analysis was performed with the statistic toolbox of the Matlab (9.2) software (Mathworks, Inc.). The coefficient of multiple correlation (R^2) was calculated in order to determine the goodness of a linear fit between biomechanical and density parameters. The significance of the linear fit, i.e., if the slope differs from zero (no correlation) was assessed with a Fisher's F-test (considered significant at $p < 0.05$).

Results

The demographic characteristics of the women included in the study are presented in Table 1. Most patients were postmenopausal (86.7%) and none had received hormonal treatment in the 3 months prior to surgery. Among the 15 patients, 6 (40%) underwent isolated anterior repair, 5 (33.3%) underwent isolated posterior repair, and 4 (26.7%) underwent combined anterior and posterior repair.

Tissue samples were only taken from the compartment involved in the POP repair. Among the 15 procedures, the vaginal tissues from 14 patients were analyzed for both biochemical

and biomechanical assessments, with 9 samples from the anterior vaginal wall and 7 samples from the posterior vaginal wall (Table 2).

For biomechanical analysis, uniaxial tension tests were performed. We observed a nonlinear relationship between stress and strain (Figure 1). These results confirm the hyperelastic behavior of the vaginal tissue in large deformation [8]. C_0 and C_1 parameters, characterizing the mechanical behavior of the vaginal tissue at low and high strains, were calculated and are given in table 2. We also observed a great variability of response, especially in case of large deformation, (C_1) that can be explained by the interindividual differences already observed in a previous work ¹⁵.

In parallel, we also measured the density of collagen, elastin and the ratio elastin/collagen in the lamina propria, and in the muscularis. In a majority of cases, we observed that a low C_0 was correlated with a high elastin density in the lamina propria and a high C_0 was always correlated with a low elastin density. Using linear regression, we attempted to determine a link between biochemical and biomechanical properties of vaginal tissue in the genital prolapse (Figure 2). We found an inverse relationship between the density of elastin in the lamina propria and the stiffness of vaginal tissue at low deformation (C_0). We also observed a statistically significant inverse relationship between C_0 and the elastin/collagen ratio ($p=0.048$) (Figure 2).

Nevertheless, we did not observe any relationship between collagen density and the C_0 nor C_1 values. The C_1 parameter is more difficult to correlate with the histomorphometric parameters of the different layers and does not allow identifying a connective tissue fibrillar component that could be responsible for the observed biomechanical properties at high strains. In addition, the larger dispersion of results at large strains precludes the demonstration of a correlation between the tissue composition and its mechanical features under large strains.

Comment

In the present study, we simultaneously analyzed the fibrillar tissue composition and the biomechanical properties of the vaginal wall in women with POP, with the aim to assess if there was a correlation between these properties. First, we confirmed the non-linear relationship between stress and strain and the hyperelastic behavior, with great inter-individual variability, of the vaginal tissue under large deformation (C_1). Using linear regression, we found an inverse relationship between the density of elastin in the lamina

propria and the rigidity of vaginal tissue at low deformation (C_0). We also observed a statistically significant inverse relationship between C_0 and the elastin/collagen ratio in the lamina propria. Our results suggest that the vaginal tissue is probably less rigid during the first part of the mechanical test, when the amount of elastin is high, corresponding to a preliminary alignment phase of the elastic fibers. In case of high rigidity during the first part of the tests, the elastin density of the vaginal tissue is decreased and the alignment phase of elastin fibers is shorter. Under large strains, the relationship between rigidity and tissue composition is less obvious, probably due to a high variability of mechanical behavior in the second part of the mechanical tests.

The relationship between elastin density and rigidity was the most evident in the lamina propria of the vaginal tissue compared to the muscularis. In a previous report, we also found that the differences in elastin density were more pronounced in this layer⁶. Histologically, the lamina propria is a dense connective tissue predominantly composed of collagen and elastin. This fibro-elastic layer may thus play an important role in the mechanical behavior of the vaginal tissue.

To date, few studies have investigated the relationship between the biochemical changes in vaginal tissue composition and the potential impact of these alterations on the biomechanical properties in women with POP. Previously, Zhou et al. found that the vaginal tissue of women with POP was significantly stiffer than those of controls and was associated with lower content in collagen III¹⁶. However, it is important to notice that the biomechanical assessment was performed using scanning haptic microscope instead of uniaxial tension tests. This technique relies on the detection of resonance shifts through physical contact with tissue to determine local tissue stiffness. The advantage of this method is that it can be performed on small tissue samples but the reliability of these results has not been demonstrated by a comparative study of these two techniques. For biochemical assessment, collagen content was assessed by Western blot. They found that collagen III expression was significantly decreased in menopausal women with POP and that collagen I expression was not significantly different between controls and cases¹⁶. It is well documented that type I collagen endows the tissue with strength, while type III contributes to its elasticity¹⁷. Published data on collagen composition of the vaginal tissue and POP are inconclusive; some authors reported a reduction of type III collagen in the vaginal wall of patients with POP¹⁸⁻²⁰, while others observed that type III collagen is the major fibrillar collagen of the vagina in patients with POP²¹. These conflicting results are mainly due to the heterogeneity of these studies in terms

of patients, histological definition of the tissues, location of tissue sampling and methods of quantification ⁵.

Moreover, the potential role of elastin in tissue stiffness was not evaluated in their study.

Elastic fibers are key architectural elements of connective tissues that are subject to mechanical strain. We suggest that the main predictive factor of vaginal tissue stiffness is the decreased elastin density. A recent study, conducted on animal model, analyzed the influence of reproductive status on biochemical tissue composition and biomechanical properties of ovine vagina ²². This method allows to obtain larger biopsies than in human. Samples were collected from virgin, parous and parous pregnant sheep. They showed that parous sheep had the lowest elastic tissue associated proteins (ETAP) content and highest collagen content, and that pregnant sheep had the highest ETAP content. Biomechanically, pregnant ovine vagina was the most extensible but the weakest tissue, whereas parous and virgin tissues were strong and elastic ²². These observations are consistent with our findings, showing the possible relationship between changes in collagen and elastin contents and POP. In their study, total collagen content was measured by hydroxyproline assay and the ratio type III collagen to type I collagen was determined by SDS-PAGE electrophoresis. There was no significant difference in type III collagen relative levels between pregnant, virgin and parous sheep.

One limitation of our study is that we used histological staining to evaluate the collagen content, and we did not use specific biochemical assessment of collagen subtypes. Therefore, we cannot determine the potential role of variable density of the different collagen subtypes in the biomechanical properties of the vaginal tissue. We also cannot provide any information on the histo-architecture of the vagina, like orientation of collagen or elastic fibers, diameter of fibers and tissue quality.

Another potential limitation is the relatively small number of patients, which does not allow us to draw definite conclusions on the correlation between rigidity and elastin density. This underlines the difficulty, mainly for ethical reasons, of obtaining good-quality samples for both biochemical and biomechanical assessment on the same patient. For the same reasons, it is also impossible to obtain such biopsies on control patients, undergoing surgery for other indication than POP.

In conclusion, despite the high inter-individual variability of biomechanical behavior of the vaginal tissue, our study reveals a functional link between elastin density and vaginal wall stiffness. It underlines the interest of considering elastin density as a key determinant factor of

tissue stiffness. Therefore, this work provides new insights into the relationship between biochemical and biomechanical properties of the vaginal wall in women with POP. We suggest propose that future research protocols designed for better understandings of the biomechanical behavior of vaginal tissue should include quantification of collagen and elastic fibers. These novel observations are also worth considering in the development of prostheses used for POP surgery.

References

1. OLSEN AL, SMITH VJ, BERGSTROM JO, COLLING JC, CLARK AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstetrics and gynecology* 1997;89:501-6.
2. BUCHSBAUM GM, DUECY EE, KERR LA, HUANG LS, PEREVICH M, GUZICK DS. Pelvic organ prolapse in nulliparous women and their parous sisters. *Obstetrics and gynecology* 2006;108:1388-93.
3. JELOVSEK JE, MAHER C, BARBER MD. Pelvic organ prolapse. *Lancet* 2007;369:1027-38.
4. CARLEY ME, SCHAFER J. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers Danlos syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1021-3.
5. DE LANDSHEERE L, MUNAUT C, NUSGENS B, et al. Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review. *International urogynecology journal* 2013.
6. DE LANDSHEERE L, BLACHER S, MUNAUT C, et al. Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *International urogynecology journal* 2014.
7. BUMP RC, MATTIASSEN A, BO K, et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:10-7.
8. BANCROFT JD, STEVENS A. *Theory and practice of histological techniques*. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone; Number of pages.
9. BALSAT C, BLACHER S, SIGNOLLE N, et al. Whole slide quantification of stromal lymphatic vessel distribution and peritumoral lymphatic vessel density in early invasive cervical cancer: a method description. *ISRN obstetrics and gynecology* 2011;2011:354861.
10. CHANTRAINE F, BLACHER S, BERNDT S, et al. Abnormal vascular architecture at the placental-maternal interface in placenta increta. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:188 e1-9.
11. RUBOD C, BOUKERROU M, BRIEU M, DUBOIS P, COSSON M. Biomechanical properties of vaginal tissue. Part 1: new experimental protocol. *J Urol* 2007;178:320-5; discussion 25.
12. JEAN-CHARLES C, RUBOD C, BRIEU M, BOUKERROU M, FASEL J, COSSON M. Biomechanical properties of prolapsed or non-prolapsed vaginal tissue: impact on genital prolapse surgery. *International urogynecology journal* 2010;21:1535-8.
13. MOONEY M. A theory of large elastic deformation. *J Appl Physiol* 1940:582-92.
14. RIVLIN R. Large elastic deformations of isotropic materials. I. Fundamental concepts, II. Some uniqueness theorems for pure homogenous deformations. *Philos Trans R Soc Lon A Math Phys Sci* 1948:275-89.
15. RUBOD C, BOUKERROU M, BRIEU M, JEAN-CHARLES C, DUBOIS P, COSSON M. Biomechanical properties of vaginal tissue: preliminary results. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2008;19:811-6.
16. ZHOU L, LEE JH, WEN Y, et al. Biomechanical properties and associated collagen composition in vaginal tissue of women with pelvic organ prolapse. *J Urol* 2012;188:875-80.
17. KERKHOF MH, HENDRIKS L, BROLMANN HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse--a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009;20:461-74.

18. LIAPIS A, BAKAS P, PAFITI A, FRANGOS-PLEMENOS M, ARNOYANNAKI N, CREATSAS G. Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:76-9.
19. GOEPEL C, HEFLER L, METHFESSEL HD, KOELBL H. Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:659-64.
20. LIN SY, TEE YT, NG SC, CHANG H, LIN P, CHEN GD. Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007;18:43-8.
21. MOALLI PA, SHAND SH, ZYCZYNSKI HM, GORDY SC, MEYN LA. Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Obstetrics and gynecology* 2005;106:953-63.
22. ULRICH D, EDWARDS SL, SU K, et al. Influence of reproductive status on tissue composition and biomechanical properties of ovine vagina. *PloS one* 2014;9:e93172.

Table 1 Demographic characteristic

Characteristic	n=15
Age [year (mean \pm SD)]	62.2 \pm 10.8
BMI [kg/m ² (mean \pm SD)]	29.3 \pm 2.5
Vaginal parity [median (range)]	3 (1-8)
Menopause [n, (%)]	13 (86.7)
POP stage [median (range)]	3 (2-3)

SD = Standard Deviation, BMI = Body Mass Index, POP = Pelvic Organ Prolapse

Table 2 Biomechanical and biochemical measurements of the vaginal tissue derived from 14 patients undergoing POP repair. C_0 (rigidity under low deformation) and C_1 (rigidity under large deformation) values are expressed in megapascal (Mpa). Collagen and elastin density values are presented in percent.

	Vaginal rigidity		Lamina propria layer			Muscularis layer		
	C_0 (Mpa)	C_1 (Mpa)	Collagen (%)	Elastin (%)	Elast / Coll ($\times 10^{-2}$)	Collagen (%)	Elastin (%)	Elast / Coll ($\times 10^{-2}$)
Patient 1 Ant	0,00	0,15	72,89	5,9	8,1	56,44	4,1	7,3
Patient 2 Ant	0,07	0,12	84,12	9	10,7	45,83	5,3	11,6
Patient 3 Ant	0,14	0,26	85,24	3,6	4,2	59,32	7,5	12,6
Patient 4 Ant	0,07	0,09	87,7	11	12,5	62,54	4,9	7,8
Patient 5 Post	0,03	0,07	70,71	7,7	10,9	44,83	7,3	16,4
Patient 6 Post	0,02	0,39	85,44	6,6	7,7	66,64	12,6	18,9
Patient 7 Ant	0,01	0,42	87,29	3,7	4,2	64,57	17,7	27,4
Patient 7 Post	0,01	0,09	86,19	8,3	9,6	40,75	10	24,5
Patient 8 Post	0,04	0,25	77,96	10,5	13,5	42,53	8,9	20,9
Patient 9 Ant	0,10	0,46	74,83	7,1	9,5	52,7	10,6	20,1
Patient 10 Post	0,25	0,33	87,58	6,2	7,1	63,19	4,9	7,7
Patient 11 Ant	0,10	0,41	85,41	10,5	12,3	47,22	5,9	12,5
Patient 12 Post	0,02	0,22	89,21	15,3	17,1	67,05	6,7	10
Patient 13 Ant	0,00	0,37	88,37	14,5	16,4	67,44	9,1	13,5
Patient 13 Post	0,00	0,22	73,58	14,2	19,3	58,49	15,5	26,5
Patient 14 Ant	0,00	0,20	92,02	14,2	15,4	68,97	4,1	5,9

Figure 1

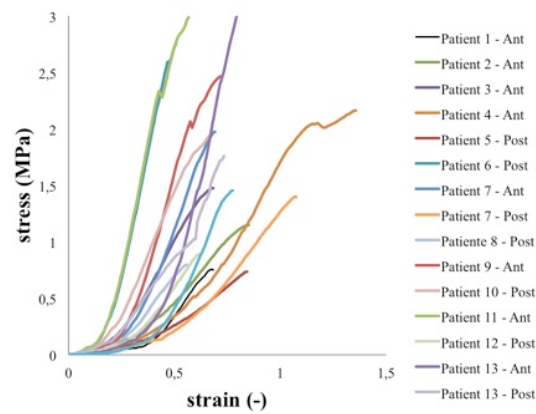


Figure 1. Mechanical response of the vaginal wall to tension loading. Stress-strain curves showing the hyperelastic behaviour of the tissue, and the great inter-individual variability of the mechanical response, especially in large deformation.

Figure 2

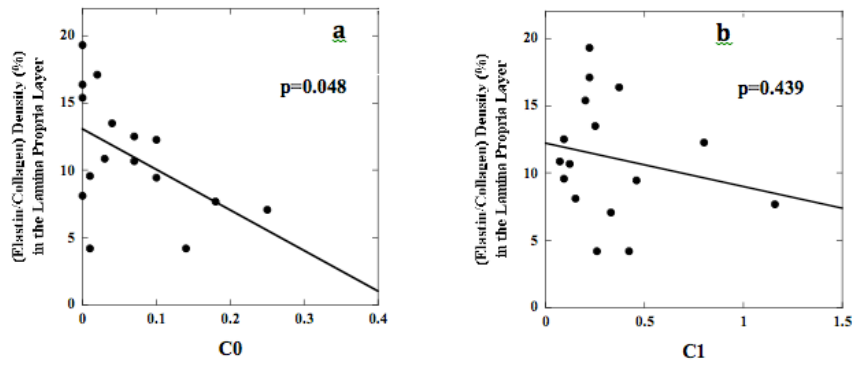


Figure 2. Correlation between the ratio elastin/collagen density in the lamina propria and the vaginal rigidity under (a) low deformation (C_0) and (b) high deformation (C_1). In the first case, the slope is significantly non-zero ($p=0.048$) with a goodness of a linear fit of $R^2=0.25$ whereas in the second case the slope is not significantly non-zero ($p=0.439$, $R^2=0.04$)

4. Discussion

Le prolapsus génital touche près de la moitié des femmes multipares et sa prévalence ne cesse d'augmenter avec le vieillissement de la population, devenant ainsi un enjeu majeur en terme de santé publique [13,16,15]. Le nombre de consultations pour correction d'un prolapsus est en nette augmentation en gynécologie et en urologie [100]. Selon une étude sur la démographie des troubles de la statique pelvienne, la demande de soins pour cette indication risque de doubler au cours des 30 prochaines années [101]. Il est donc important de mieux comprendre cette pathologie pour en améliorer la prévention et la prise en charge.

Nous savons que le prolapsus génital résulte d'une combinaison de facteurs de risques génétiques et environnementaux mais les mécanismes biochimiques et biomécaniques qui aboutissent à cette pathologie restent mal définis. De nombreuses études se sont intéressées à déterminer les changements de composition des tissus pelviens en cas de prolapsus génital. Notre revue de littérature a montré que les données disponibles dans la littérature sont souvent discordantes et non conclusive [24] (**publication 1**). Les principales raisons de ces résultats contradictoires sont souvent d'ordre méthodologique et éthique :

- Hétérogénéité des groupes de patientes étudiées
- Différences de localisation et de standardisation des prélèvements
- Limitation de la taille des prélèvements, du nombre de patientes
- Variabilité des protocoles de quantification et des paramètres étudiés

Après avoir étudié en profondeur les caractéristiques méthodologiques des principaux travaux sur le sujet, nous avons développé notre propre protocole de recherche intégrant une approche plus globale du prolapsus génital.

Ce travail nous a permis de mieux caractériser les propriétés du tissu vaginal tant sur le plan biochimique que biomécanique. Nous avons ensuite cherché à mettre en relation nos résultats en analysant simultanément ces propriétés chez une même patiente présentant un prolapsus génital.

4.1 Analyse histomorphométrique du tissu vaginal

Notre étude histomorphométrique montre que l'élastine est un élément déterminant de l'intégrité du tissu vaginal. La densité d'élastine diminue significativement dans la région la plus prolabée de la paroi vaginale par rapport à la région péricervicale, où les contraintes mécaniques sont moindres [102] (**publication 2**). La diminution de la proportion en élastine du tissu vaginal le rendrait plus rigide et moins résistant aux forces mécaniques.

Dans ce travail, nous avons analysé les variations de composition du tissu chez une même patiente, permettant ainsi d'éviter d'être confronté à une variabilité interindividuelle. Toutefois, l'absence de groupe contrôle constitue aussi la principale limite de ce travail. Il est de ce fait impossible de déterminer si ces changements sont physiologiques ou pathologiques et si cette diminution d'élasticité du tissu est une cause ou une conséquence du prolapsus. Dans un premier temps, nous avons cherché à constituer un groupe contrôle pour comparer les variations de composition du tissu en situation pathologique ou non. Cependant, nous avons rapidement été confronté à des difficultés méthodologiques majeures, dont la principale est de recruter des patientes dites « contrôles », opérées pour d'autres raisons qu'un prolapsus et qui présentent les mêmes caractéristiques d'âge, de parité, de statut ménopausique et de facteurs de risques. D'autre part, il est plus difficile d'obtenir des prélèvements de qualité similaire entre ces deux groupes, les biopsies réalisées chez les patientes du groupe contrôle étant nécessairement de plus petite taille que les biopsies réalisées à partir de l'excédent de tissu des patientes opérées pour prolapsus. Dans notre groupe contrôle, les prélèvements étaient réalisés sur la tranche vaginale (correspondant à la région péricervicale) en cas d'hystérectomie, par voie vaginale ou coelioscopique, et leur qualité était globalement nettement moins satisfaisante. Dans ce même groupe, il était également impossible, pour des raisons techniques et éthiques, d'obtenir des biopsies au niveau du tiers moyen du vagin (correspondant aux points POP-Q Ba et Bp) d'une taille suffisamment importante pour être analysable. Pour ces raisons, nous avons pris le parti d'analyser les variations intra-individuelles plutôt que inter-individuelles car il nous paraît impossible de comparer des groupes similaires. Ces contraintes méthodologiques illustrent la difficulté de conduire des études de bonne qualité et de grande échelle dans ce domaine.

Une autre limite de cette analyse histologique réside dans la difficulté de quantifier la quantité totale de collagène et de déterminer précisément les proportions des principaux sous-types de collagènes présents dans le vagin (collagènes I, III, V). En immuno-histologie, le marquage du collagène et des sous-types I et III apparaît peu discriminant le rendant ainsi difficilement quantifiable (figure 20).

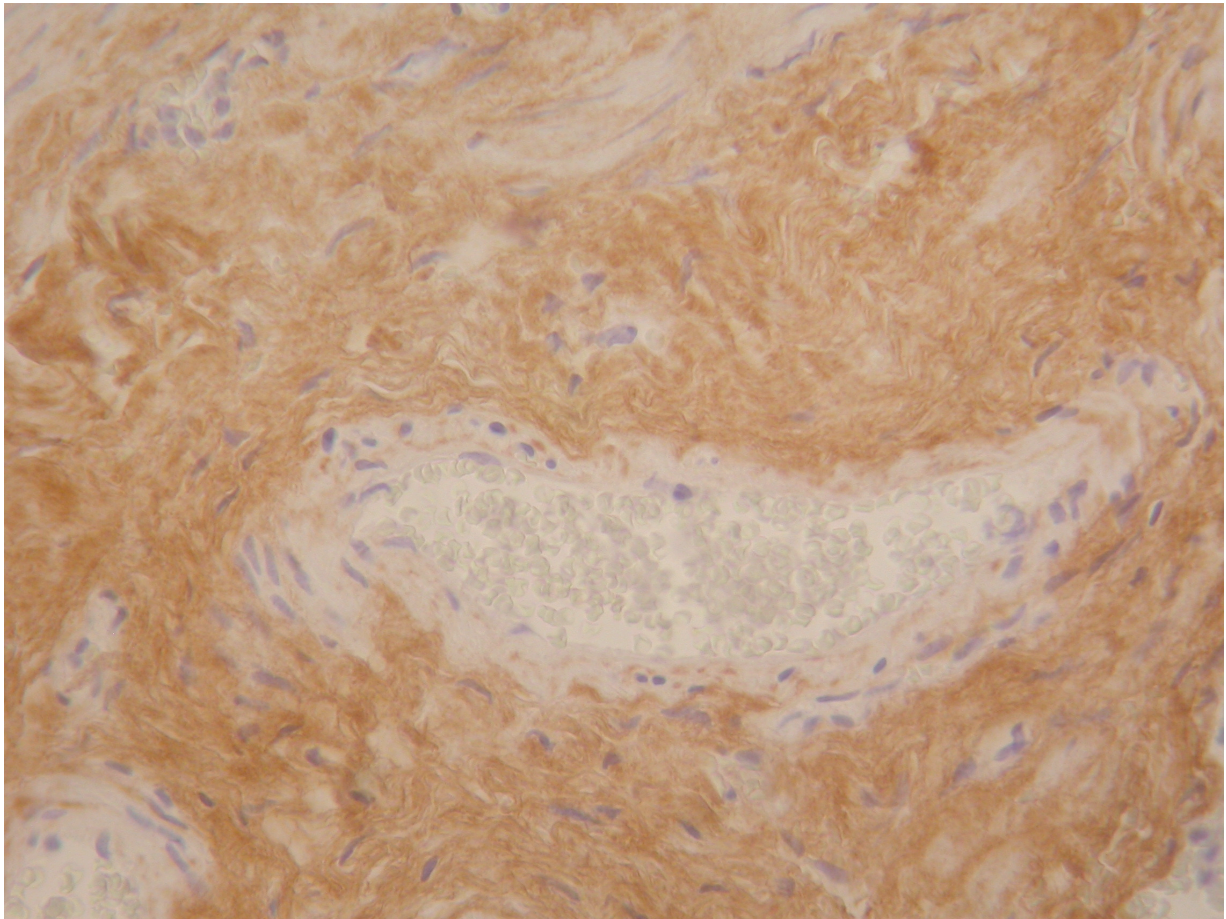


Figure 20 : Immuno-marquage du collagène III (grossissement 40x). (LBDT, données personnelles).

Or, le collagène est un composant susceptible d'influencer également fortement les propriétés du tissu vaginal. Une meilleure quantification du collagène permettrait probablement d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues par l'élastine sur les propriétés biochimiques du tissu vaginal. D'autres techniques permettent de quantifier le collagène comme le dosage de l'hydroxyproline, acide aminé dérivé de la proline représentant 13% de sa composition, par technique biochimique. Ce dosage reflète la quantité totale de collagène sans distinction des sous-types.

Toutefois, cette analyse nécessite également des conditions de prélèvement très strictes, le tissu doit être plongé immédiatement dans une solution de Tampon de lyse, transporté dans de l'azote liquide puis être stocké à -80°C. De plus, les dosages d'ARN messager par biologie moléculaire permettent d'évaluer l'expression des gènes et reflètent l'activité métabolique des cellules du tissu à un instant donné. Dans le cas du tissu vaginal, nous avons évalué cette activité par marquage immuno-histochimique du TGF- β et avons constaté que celle-ci est très faible, le processus aboutissant au prolapsus étant probablement très lent. Nous avons donc centré notre protocole de recherche sur l'étude immuno-histologique des tissus pour ces raisons et afin d'homogénéiser les résultats et leur interprétation.

Nous avons également observé des variations significatives de la quantité d'élastine à différentes régions d'un même tissu vaginal chez une même patiente. Ce résultat peut expliquer en partie les résultats discordants de certaines études dans lesquelles la localisation des biopsies peut varier. Cette constatation souligne à nouveau l'importance de standardiser la méthodologie des études sur ce sujet en terme de localisation des prélèvements, de conditionnements et de techniques d'analyses.

4.2 Analyse des propriétés biomécaniques du tissu vaginal

Des essais de traction uniaxiale jusqu'à rupture permettent de caractériser le comportement mécanique du tissu vaginal. Cette approche permet d'aborder différemment la physiopathologie du prolapsus et vient compléter les informations apportées par les analyses biochimiques.

4.2.1 Travaux antérieurs

Plusieurs études biomécaniques successives ont été menées au CHRU de Lille dans le but de définir les bases de la connaissance des caractéristiques principales du tissu vaginal [86,87]. Ces études ont permis de montrer que le tissu vaginal présente un comportement élastique non linéaire et visqueux, qualifié de visco-hyperélastique [87]. Les tests de traction uniaxiale

ont également montré qu'en cas de prolapsus génital, les tissus vaginaux sont significativement plus rigides que les tissus non-prolabés [93].

Notons que comme pour les analyses histologiques, il est une nouvelle fois plus difficile d'obtenir des prélèvements de taille suffisante chez des patientes ne présentant pas de prolapsus pour réaliser ces tests biomécaniques. Dans ce cas, nous avons la possibilité de recourir à des prélèvements de tissus non prolapsés sur des bassins féminins étudiés *post-mortem* pour constituer un groupe contrôle, mais une analyse histologique est par contre irréalisable.

Ces travaux ont servi de référence pour mieux définir et comprendre le comportement d'autres tissus de la paroi abdominale et du pelvis (**publications 3,4 et 5**).

4.2.2 Contribution originale

Dans la **publication 3**, nous avons étudié les propriétés biomécaniques de la peau et de l'aponévrose des muscles grands droits de l'abdomen [103] ; nous avons obtenu les principaux résultats suivants:

- L'aponévrose apparaît plus rigide et moins extensible que la peau et le vagin.
- Le vagin est quant à lui moins rigide et plus extensible que la peau.

Ainsi, nous montrons que la peau ne peut pas être utilisée pour prédire les propriétés biomécaniques du tissu vaginal.

Dans la **publication 4**, qui s'intéressait particulièrement aux ligaments utéro-sacrés, ronds et larges, nous avons pu montrer que ces tissus ont également un comportement mécanique hyperélastique et que le ligament utéro-sacré est plus rigide que les autres ligaments pelviens et le vagin [104]. Sa contribution en statique pelvienne apparaît comme importante et son utilisation dans certaines techniques de chirurgie traditionnelle peut être encouragée.

Dans la **publication 5**, nous avons montré que la vessie et le rectum sont des tissus hyperélastiques qui ont des propriétés biomécaniques différentes de celles du vagin [89]. Le vagin apparaît comme plus rigide et moins extensible que le rectum, qui est lui même plus rigide que la vessie. Ces différences de rigidité s'expliquent probablement par des

différences de fonction. Le rôle du vagin apparaît comme central dans le maintien de la statique des organes pelviens.

Ces études permettent de caractériser le comportement biomécanique des principales structures de soutènement et de suspension des organes pelviens et de mieux comprendre quels sont les acteurs principaux de la statique pelvienne. Cependant, ces tests nécessitent de larges prélèvements et utilisent des méthodes destructives ce qui nécessite l'utilisation de tissus prélevés *post-mortem*.

4.2.3 Corrélation entre les propriétés biochimiques et biomécaniques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital

Nous avons analysé les propriétés biochimiques du tissu vaginal en cas de prolapsus génital et montré de manière originale que la densité d'élastine diminue significativement dans la région la plus prolabée de la paroi vaginale [102].

En analysant les propriétés biomécaniques du tissu vaginal de patientes présentant un prolapsus, nous observons que celui-ci est plus rigide que le tissu sain [93].

Nous pouvons constater que par deux approches différentes nous arrivons à la conclusion que le tissu vaginal est plus rigide en cas de prolapsus génital et que la diminution de la densité d'élastine est probablement un facteur important expliquant cette rigidité.

Nous avons alors cherché à établir une corrélation entre la densité d'élastine et la rigidité du tissu vaginal en analysant simultanément les propriétés biochimiques et biomécaniques de ce tissu chez une même patiente présentant un prolapsus génital (**Publication 6**).

Dans cette étude, les tests biomécaniques ont confirmé que le tissu vaginal présente un comportement hyperélastique. En cas de faible contrainte, le vagin apparaît plus extensible quand le taux d'élastine est élevé, particulièrement dans la lamina propria et toujours plus rigide quand la densité d'élastine est faible. Par contre, en cas de forte contrainte, nous n'avons pas pu établir de corrélation entre densité d'élastine et rigidité. Ceci s'explique probablement par une plus grande dispersion du comportement biomécanique lors de sollicitations importantes.

En résumé, ce travail a permis une caractérisation plus précise du tissu vaginal et des structures impliquées dans la statique pelvienne, tant sur le plan biochimique que biomécanique. Nous avons montré que les propriétés biomécaniques du vagin sont très variables d'une patiente à l'autre et la que densité d'élastine du vagin semble être un facteur prédictif important de la rigidité de ce tissu.

Le vagin joue un rôle important dans le maintien des organes pelviens. Des modifications de sa structure biochimique liées à des contraintes répétées influencent ses propriétés biomécaniques et peuvent entraîner la survenue d'un prolapsus génital. Cependant, à l'heure actuelle, il est encore impossible de déterminer si ces modifications de structure sont la cause ou la conséquence du prolapsus génital. Probablement que la clé de la compréhension des propriétés biomécaniques du tissu vaginal passe par une meilleure quantification du collagène et de l'élastine et par l'amélioration de la compréhension des mécanismes biochimiques qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire du tissu vaginal et aux dérèglements qui aboutissent au prolapsus génital.

A ce stade, il est important de souligner que le vagin occupe une place prépondérante mais pas exclusive dans la statique pelvi-périnéale. Le prolapsus génital peut résulter d'atteintes des différents systèmes de soutènement et de suspension et donc de mécanismes physiopathologiques différents. Il ne faut donc pas négliger l'importance des structures ligamentaires et musculaires qui contribuent également à l'équilibre de la statique pelvienne.

4.3 Applications en chirurgie du prolapsus génital

La statique pelvienne est le résultat d'un équilibre complexe des différentes structures qui composent le plancher pelvien. La chirurgie du prolapsus a pour but de restituer une anatomie normale de la manière la moins morbide possible tout en étant la plus efficace à long terme. De nombreuses techniques ont été mises au point pour corriger ces troubles de la statique pelvienne, depuis les techniques traditionnelles utilisant les tissus autologues jusqu'à l'utilisation de prothèses par voie vaginale ou abdominale. Même si les connaissances de l'anatomie pelvienne et les techniques de chirurgie ont beaucoup évolué, le taux de succès des chirurgies traditionnelles utilisant du tissu autologue reste invariablement stable, avec un risque de récurrence de l'ordre de 30% [16]. Le choix d'une technique par rapport à une autre est influencé par plusieurs paramètres dont l'âge, les antécédents médico-chirurgicaux et l'examen clinique évaluant le type de prolapsus et son stade. Un paramètre supplémentaire à prendre en compte est la qualité des tissus conjonctifs pelviens car il apparaît de plus en plus comme un facteur prédictif important d'une récurrence.

Les résultats de notre travail ont démontré que les propriétés biochimiques du tissu vaginal sont variables d'une région à l'autre et que la région la plus prolapsée représente la localisation où le tissu est le plus altéré. Ce déficit se traduit cliniquement par un défaut médian. L'amélioration des connaissances de ces déficits, médians et/ou latéraux, pourrait permettre d'identifier les régions les plus atteintes et de proposer des réparations plus ciblées (notion de « site specific repair ») ou au contraire de favoriser une chirurgie de renforcement prothétique en première intention.

Il est également important de tenir compte de ces éléments dans la conception de prothèses répondant à un comportement plus physiologique que les prothèses actuelles. En effet, l'utilisation de matériel prothétique permet d'obtenir un meilleur résultat anatomique mais au prix d'une morbidité plus importante. Les complications spécifiques de l'utilisation de prothèse sont la dyspareunie, la douleur, l'infection, les érosions ou les rétractions [105]. La prothèse idéale doit être suffisamment souple pour permettre aux organes pelviens de conserver une certaine mobilité physiologique et suffisamment rigide pour résister aux contraintes et de prévenir une récurrence. Elle doit être légère et macroporeuse pour s'intégrer

au tissu de manière optimale. Ce processus d'intégration passe par une réponse inflammatoire aiguë, une néo-vascularisation et une colonisation par les fibroblastes qui vont synthétiser les constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire et permettre la fibrose entre les mailles du treillis. Des études sur modèle animal utilisant l'IRM ont montré que les prothèses se rétractent très rapidement après leur implantation, avant même que le processus de croissance tissulaire ne soit optimal [106]. Le polypropylène monofilament macroporeux est actuellement le matériel prothétique de référence dans la chirurgie du prolapsus mais des prothèses composites associant des matériaux résorbables et non résorbables sont en cours d'évaluation [107].

4.4 Principaux axes de recherche - Perspectives

La physiopathologie du prolapsus est encore imparfaitement comprise. Ce travail ouvre de nombreux axes de recherche dans ce domaine qui méritent d'être investigués :

- Intérêt de développer des méthodes d'analyse permettant de diminuer la taille nécessaire des prélèvements. En effet, une des principales limites de ce travail est l'absence de groupe contrôle. La principale difficulté est de réaliser des prélèvements de taille de qualité similaires dans le groupe contrôle et le groupe prolapsus. La possibilité d'analyser dans les mêmes conditions des prélèvements de plus petite taille permettrait de constituer un groupe contrôle et d'améliorer la comparaison entre les patientes saines et présentant un prolapsus génital.

- Intérêt de comparer nos résultats à des groupes différents en terme d'âge et de statut ménopausique pour mieux évaluer les changements de composition du tissu vaginal à différentes périodes de la vie. Nos travaux sont actuellement principalement ciblés sur des patientes en post-ménopause présentant un prolapsus génital et il est impossible de définir si les modifications observées sont liées au prolapsus génital ou au vieillissement du tissu. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact des stéroïdes sexuels sur la composition du tissu vaginal et ses propriétés biomécaniques.

- Intérêt d'une meilleure évaluation quantitative et qualitative du collagène et de ses sous-types. En effet, les fibres de collagène confèrent au tissu vaginal une résistance mécanique élevée à l'étirement et jouent un rôle important dans l'intégrité de ce tissu. Actuellement, l'impact des modifications de composition en collagène du tissu vaginal sur la survenue prolapsus génital est encore imprécis et mérite d'être approfondi.

- Intérêt d'étudier les propriétés histomorphométriques des ligaments pelviens comme l'utéro-sacré selon notre méthodologie. Cette étude permettrait de mieux comprendre les variations de composition de ces tissus en cas de prolapsus génital et de les mettre en relation avec leurs propriétés biomécaniques.

- Intérêt du modèle animal pour compléter nos recherches et tester de nouveaux matériaux prothétiques. La structure et la composition des tissus pelviens de brebis sont relativement proches de celle des Humains. Ce modèle animal a déjà été utilisé précédemment dans l'évaluation préclinique des propriétés biomécaniques du tissu vaginal [86]. Il est considéré comme un modèle adéquat pour l'étude du prolapsus génital [108,109]. L'utilisation du tissu vaginal de brebis permet la réalisation de larges prélèvements et ainsi de tester simultanément les propriétés biomécaniques, histologiques et biochimiques.

- Intérêt d'utiliser des méthodes non destructives, par modélisation numérique des tissus pelviens évalués lors d'IRM dynamiques, qui peuvent aider à mieux comprendre la physiopathologie du prolapsus génital et à évaluer l'efficacité des techniques de correction chirurgicale [110].

4. Conclusion

Dans cette thèse de Doctorat, trois aspects principaux ont été abordés :

- Une revue de la littérature qui a permis de décrire les connaissances actuelles de l'histologie de la paroi vaginale en cas de prolapsus génital et de développer notre propre protocole de recherche.
- Des études expérimentales histomorphométriques sur des sujets opérés de prolapsus génital ;
- Des études expérimentales biomécaniques sur des biopsies prélevées post-mortem.

Notre contribution originale consiste notamment à avoir démontré toute l'importance de l'élastine dans le maintien de l'intégrité du vagin et son rôle central dans la statique pelvienne. Une perte d'élasticité du tissu vaginal est un facteur important qui contribue à favoriser la survenue d'un prolapsus génital. Cette perte d'élasticité du vagin se traduit, en biomécanique, par une plus grande rigidité tissulaire et nous avons pu démontrer cette corrélation.

Ce travail contribue à améliorer la compréhension du prolapsus génital, tant sur le plan biochimique que biomécanique, et peut servir de référence pour développer d'autres perspectives de recherche que nous avons développé dans la discussion.

L'amélioration des connaissances de la physiopathologie du prolapsus devrait permettre de mieux définir des stratégies de prévention de la survenue de cette pathologie complexe qui deviendra un enjeu majeur en terme de Santé Publique dans les années à venir.

5. Annexes

Annexe n°1

RESEARCH

www.AJOG.org

UROGYNECOLOGY

**Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh
repair: retrospective single-center study including
524 patients with 3 years' median follow-up**

Laurent de Landsheere, MD; Sharif Ismail, MD; Jean-Philippe Lucot, MD; Valérie Deken, ScD;
Jean-Michel Foidart, MD, PhD; Michel Cosson, MD, PhD

RESEARCH

www.AJOG.org

UROGYNECOLOGY

Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair: retrospective single-center study including 524 patients with 3 years' median follow-up

Laurent de Landsheere, MD; Sharif Ismail, MD; Jean-Philippe Lucot, MD; Valérie Deken, ScD; Jean-Michel Foidart, MD, PhD; Michel Cosson, MD, PhD

OBJECTIVE: The aim of this study was to explore the nature and rate of surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair for pelvic organ prolapse.

STUDY DESIGN: This was a retrospective study of all patients who underwent Prolift mesh repair between January 2005 and January 2009. Patient data were obtained from medical records, and patients were telephoned to check if they had surgery in other hospitals.

RESULTS: A total of 600 consecutive patients were identified. Of these, 524 patients (87.3%) were included in the study, with a median follow-up duration of 38 months (range, 15–63). Global reoperation rate

was 11.6%. Indications of intervention were surgery for urinary incontinence (6.9%), mesh-related complications (3.6%), or prolapse recurrence (3%).

CONCLUSION: The global reoperation rate after transvaginal Prolift mesh repair was 11.6%, with urinary incontinence surgery being the most common indication. Rates of mesh complications and prolapse recurrence are relatively low in an experienced team.

Key words: complications, pelvic organ prolapse, polypropylene mesh, reoperation, transvaginal mesh, vaginal surgery

Cite this article as: de Landsheere L, Ismail S, Lucot J-P, et al. Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair: retrospective single-center study including 524 patients with 3 years' median follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:83.e1-7.

Mesh kits are increasingly being used in surgery for pelvic organ prolapse (POP) because traditional procedures using weak native tissue have important rates of failure, with reoperation in almost 30% of patients.¹ Vaginal approach, using mesh reinforcement to improve anatomical results, is an attractive option for management of

POP,² as a minimally invasive form of surgery.

The French Transvaginal Mesh (TVM) group has developed a standardized procedure using the transobturator and the transgluteal route through sacrospinous ligament route for anterior, middle, and posterior compartment prolapse.^{3,4} As a new procedure, data about safety and ef-

fectiveness are important to judge its value. Many studies reported low operative morbidity for this technique but their follow-up duration was rather short⁴⁻⁸ and with only 1 prospective study reporting rather encouraging medium-term results.⁹ Several randomized controlled trials have compared traditional repairs with the use of vaginal mesh kits.¹⁰⁻¹⁴ These studies suggest better anatomic success rates, particularly in anterior vaginal wall repairs, but with a higher rate of mesh-related complications, requiring management such as mesh erosion.^{15,16} Little work has been carried out on surgical intervention after transvaginal mesh repair.^{16,17} The aim of this study was to analyze the nature and rate of reoperation after Prolift mesh repair for POP in a large cohort of patients.

MATERIALS AND METHODS

This was a retrospective cohort study of all patients who underwent transvaginal Prolift mesh repair for POP between January 2005 and January 2009. Indications for surgery were symptomatic and significant prolapse, POP-Q stage II or more. All patients were managed at the

From the Department of Gynecologic Surgery (Drs de Landsheere, Ismail, Lucot, and Cosson), Hôpital Jeanne de Flandre, and the Department of Biostatistics (Dr Deken), Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille Cedex, France; the Department of Obstetrics and Gynecology (Drs de Landsheere and Foidart), CHR La Citadelle, Liège, Belgium; and the Department of Obstetrics and Gynecology (Dr Ismail), Royal Sussex County Hospital, Brighton, East Sussex, England, UK.

Received Mar. 10, 2011; revised June 7, 2011; accepted July 25, 2011.

When research for this study was being done in 2010, S.J. was visiting Hôpital Jeanne de Flandre through an Observership funded by the International Urogynecological Association.

M.C. is on the speaker's bureau, receives research support and is a paid consultant for Ethicon Women's Health and Urology. He is consultant for AMS and performs sponsored educational activities for Ethicon Women's Health and Urology, Olympus, and Ipsen. J-P.L. performs sponsored educational activities for Ethicon Women's Health and Urology, Olympus, Ipsen, and Ibi. Two authors (J.P.L. and M.C.) have declared conflicting interests with the manufacturer and this may represent another potential bias. This study was entirely performed independently of manufacturer, and data collection was carried out by 2 other authors. All authors take responsibility for integrity of the study design, data collection, and analysis.

Reprints not available from the authors.

0002-9378/\$36.00 • © 2012 Mosby, Inc. All rights reserved. • doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.040

Department of Gynecological Surgery, Hôpital Jeanne de Flandre (Lille University Hospital), which is a major tertiary unit in northwestern France.

Preoperative consultation included history and physical examination, including cough stress test to detect stress urinary incontinence (SUI) or occult urinary incontinence if the urine leakage was only revealed after prolapse reduction. All patients underwent staging of POP according to a simplified version of the International Continence Society (ICS) POP-Q staging system, as described by Swift et al.¹⁸ Urodynamic evaluation was performed only when symptoms suggested concomitant SUI.

The surgical technique was the standardized transvaginal mesh procedure, previously described by the TVM group.³ The anterior mesh is inserted between the bladder and the vagina and secured bilaterally by 2 arms passing through the obturator foramen, at the level of the arcus tendineus fasciae pelvis. The posterior mesh is inserted between the rectum and vagina and is secured bilaterally by 1 arm passing through the ischiorectal fossa and sacrospinous ligament. The synthetic prosthesis is a precut nonabsorbable monofilament polypropylene mesh (Prolift Pelvic Floor Repair System; Ethicon Women's Health and Urology, Somerville, NJ). The type of Prolift procedure (isolated anterior, posterior, or total Prolift) was based on the type and stage of prolapse (POP-Q stage II or more), taking note of the patient's complaint(s). Pre- or postoperative local estrogens were not routinely prescribed. A concomitant procedure was performed if necessary, including vaginal hysterectomy or traditional repairs such as sacrospinous fixation or colporrhaphy. Cystoscopy was not routinely used intraoperatively. In all patients with preexisting or occult SUI, concomitant tension-free vaginal tape-obturator (TVT-O) sling insertion was carried out alongside Prolift mesh repair, according to the technique described by de Leval.¹⁹

The study protocol was approved by the institutional review board of the French College of Obstetricians and Gynecologists (#CEROG-2011-GYN-02-01). In this single center retrospective cohort study, patient data were obtained

from electronic hospital medical records. Data collection was made by 1 author (S.I.) and checked for accuracy by the first author (L.dL.). All patients were available for a follow-up gynecologic examination at 2 months after surgery and they were telephoned by a single physician (L.dL.) to check if they had surgery in other hospitals to avoid underestimation of reoperation rates. The following information was collected: age, medical, surgical, gynecologic and obstetric history, stage of POP and compartment involved, type of Prolift, concomitant surgery, intraoperative complications, and indication as well as nature of reoperation. Complications requiring surgical intervention were graded according to Dindo classification. This surgical-complication grading system is based on the invasiveness of a procedure, which represents an objective outcome for the evaluation of this study. Severe adverse events, Dindo grade III are reported for this study.²⁰

Statistical analysis was performed in collaboration with the Biostatistic department (CHRU, Lille, France). Data were analysed using SAS software (SAS Institute, Cary, NC). Results were expressed as means, standard deviations for continuous variables, fitting normal distribution, resorting to the median, and range for continuous data that did not fit a normal distribution and as frequencies and percentages for categorical variables. Comparative analyses were obtained using the χ^2 test for categorical data resorting to Fisher exact test when expected frequencies dictated. For numerical variables, we used the unpaired Student *t* test when the size of the groups was greater than 30, resorting to the Mann-Whitney test for smaller groups. A *P* value < .05 was considered statistically significant. Kaplan-Meier analysis curves were used to illustrate the rate of reoperation after transvaginal Prolift mesh repair over time.

RESULTS

Six hundred consecutive patients were eligible for this study and all electronic medical records were available. Attempts were made to contact all the patients by

phone; 524 patients (87.3%) were available for phone interview and agreed to be included in the study. The 76 patients (12.7%) excluded from the study included 68 patients who were lost to follow-up (11.33%) and 8 patients who died (1.33%) during the follow-up period.

A total of 524 patients have been included in the study and the global rate of reoperation was 11.6% (*n* = 61). The median follow-up of this retrospective study was 38 months (range, 15–63 months). Of the 61 patients requiring surgical intervention, 58 patients (95.1%) were managed in our institution and 3 patients (4.9%) had surgery in other hospitals. In the group of patients not included, 7 of 76 patients (9.2%) had intervention in our institution. All medical records were available for these patients. There was no significant difference in subsequent intervention rate in our hospital between the 2 groups (*P* = .5322).

Patient characteristics are summarized in Table 1. Among the 524 patients included in the study, 111 patients (21.2%) had a history of hysterectomy, 98 patients (18.7%) underwent prior prolapse repair, and 69 patients (13.2%) had a previous surgery for SUI. Most of the mesh repairs (78.6%) were performed by senior surgeons (J-P.L., M.C.) with extensive experience in pelvic reconstructive surgery. Residents performed the rest of the procedures, under supervision (21.4%). Concomitant hysterectomy was performed for 44 patients (8.4%). Surgery for SUI, in the form of transobturator tape (TVT-O) sling insertion, was carried out in 178 patients (34%). Preoperative stages of prolapse are reported in Table 1. An isolated anterior Prolift mesh was inserted in 48 patients (9.15%), an isolated posterior Prolift mesh in 103 patients (19.65%) and an anterior and posterior Prolift in 373 patients (71.2%).

Intraoperative complications included 3 bladder perforations (0.7%), which occurred during the dissection of the paravesical fossa. All were confirmed by methylene blue test and directly repaired with vicryl suture, followed by mesh insertion. One rectal injury (0.2%) occurred in a primary insertion during the initial dissection of the rectum from the posterior vaginal wall. This injury occurred during an iso-

lated posterior mesh repair, was directly repaired and the surgeon decided to abandon the procedure.

Postoperative reoperation indications and rates are reported in Table 2. In this retrospective study, the global rate of surgical intervention after Prolift mesh repair was 11.6% (n = 61). The most frequent indication was related to urinary incontinence (6.9%). Nineteen patients (3.6%) presented with mesh-related complications, with a global rate of reoperation for Prolift mesh exposure of 2.5%. Sixteen patients (3%) underwent repeat surgery for prolapse recurrence.

Three patients (0.6%) had postoperative severe blood loss, over 400 mL, which required laparotomy in 2 cases for uterine bleeding or paravesical hematoma and laparoscopy for paravesical hematoma in the third. All 3 required admission to the intensive care unit for observation afterward (Table 2).

A total of 19 patients (3.6%) required surgical intervention for mesh-related complication (Table 2) and the most frequent complication was mesh exposure, which happened in 14 cases (2.7%). Thirteen patients (2.5%) required partial mesh excision from the anterior vaginal wall in 5 cases (1.2%) and the posterior vaginal wall in 8 cases (1.7%). The median time to intervention for mesh exposition was 13 months (Figure). One patient (0.2%) presented with mesh infection after a total Prolift mesh repair with concomitant hysterectomy. This infection occurred in the early postoperative period and needed wide surgical excision of the mesh 14 days after insertion. This patient required laparoscopic sacrocolpopexy for vaginal vault prolapse 19 months later. Two patients (0.4%) presented with severe symptomatic mesh retraction, combined with exposure in 1 case. Both were treated by a wide mesh excision. Two patients (0.4%) required wide mesh excision for rectal compression causing significant constipation and dyschesia. Finally, 2 patients (0.4%) needed surgery for symptomatic vaginal synchia.

Among the 524 patients who underwent a Prolift mesh repair, 16 patients (3%) underwent repeat surgery for prolapse recurrence, with a median duration

TABLE 1
Patient and surgical characteristics

Characteristic	n = 524
Age, y (mean \pm SD)	64 (10.1)
Parity, n (mean \pm SD)	3 (1.5)
Previous surgeries, ^a n (%)	
Previous hysterectomy	111 (21.2)
Previous prolapse surgery	98 (18.7)
Previous continence surgery	69 (13.2)
Surgeon	
Senior	412 (78.6)
Resident	112 (21.4)
Concomitant surgery, ^a n (%)	
Traditional prolapse repair (sacrospinous fixation, anterior colporrhaphy)	3 (0.6)
Hysterectomy	44 (8.4)
Surgery for SUI	178 (34)
POP-Q stage n (%)	
Cystocele	
Stage 0-I	92 (17.55)
Stage II	70 (13.35)
Stage III-IV	362 (69.1)
Uterine/vaginal vault prolapse	
Stage 0-I	119 (22.7)
Stage II	166 (31.7)
Stage III-IV	239 (45.6)
Rectocele	
Stage 0-I	147 (28.05)
Stage II	206 (39.3)
Stage III-IV	171 (32.65)
Type of Prolift	
Anterior only	48 (9.15)
Posterior only	103 (19.65)
Anterior and posterior	373 (71.2)
Anterior and posterior with uterine preservation	286 (54.6)
Anterior and posterior with concomitant hysterectomy	22 (4.2)
Total (previous hysterectomy)	65 (12.4)

POP-Q, pelvic organ prolapse questionnaire; SD, standard deviation; SUI, stress urinary incontinence.

^a Multiple answers possible.

de Landheere. Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

since Prolift mesh insertion of 23 months (Table 2 and Figure). After an isolated anterior Prolift repair, 4 of 48 patients (8.3%) had indirect recurrence in the form of posterior vaginal wall prolapse in 3 cases and uterine prolapse in 1

case. All were treated by a posterior Prolift mesh repair. Among the 103 patients who had isolated posterior Prolift repair, 4 patients (3.9%) needed further surgery. Two patients underwent vaginal hysterectomy for uterine prolapse and 2 pa-

TABLE 2
Postoperative reoperation indications, rates, presentation time and management^a

Complication	n (%)	Presentation time, mo, median (range)	Management
Surgery for hemorrhage	3 (0.6)	0	
Paravesical hematoma	2/421 (0.5)	0	Hemostasis by laparotomy (1/2) or laparoscopy (1/2)
Uterine artery bleeding	1/44 (2.3)	0	Laparotomy for hemostasis
Mesh-related complication	19 (3.6)	15 (0.5–49)	
Mesh exposure	13/524 (2.5)	13 (1–49)	Partial mesh excision
Anterior	5/421 (1.2)	17 (1–49)	Partial mesh excision
Posterior	8/476 (1.7)	8 (4–23)	Partial mesh excision
Mesh infection	1/524 (0.2)	0.5	Total mesh excision
Severe symptomatic mesh retraction	2/524 (0.4)	14 (11–16)	Large mesh excision
Rectal compression	2/476 (0.4)	18 (12–24)	Large mesh excision
Symptomatic synechia	2/524 (0.4)	25 (11–38)	Division of vaginal adhesions
Prolapse recurrence	16 (3)	23 (3.2–61)	
After anterior Prolift	4/48 (8.3)	21 (12–43)	
Rectocele	3/48 (6.2)	23 (12–43)	Posterior Prolift
Uterine prolapse	1/48 (2.1)	14	Posterior Prolift
After posterior Prolift	4/103 (3.9)	23 (3–41)	
Cystocele	2/103 (1.95)	31 (21–41)	Anterior Prolift
Uterine prolapse	2/103 (1.95)	15 (3–26)	VH
After anterior and posterior Prolift	8/373 (2.1)	25 (5–61)	
Uterine prolapse	7/373 (1.9)	28 (5–61)	Laparoscopic sacrocolpopexy (3/7); VH and sacrospinous fixation (3/7); VH (1/7)
Enterocoele ^b	1/373 (0.2)	7	Laparoscopic sacrocolpopexy
Urinary continence	36 (6.9)	13 (0.25–60)	
TVT-O mesh exposure	3/178 (1.7)	8 (3–14)	Partial TVT-O mesh excision
Occult SUI	23/277 (8.3)	16 (1–60)	Suburethral tape
Persistent SUI	7/178 (3.9)	5 (2–9)	Second TVT-O (2/7); TVT-O tightening (3/7); TVT (1/7); artificial urinary sphincter (1/7)
Recurrent SUI	2/69 (2.9)	23 (3–43)	Suburethral tape
Voiding dysfunction	1/178 (0.6)	0.25	TVT-O readjustment
Other	2 (0.4)	27 (16–38)	
Postmenopausal bleeding	2/369 (0.5)	27 (16–38)	
Total	61/524 (11.6)		

Persistent SUI: failure after concomitant TVT-O for SUI during the Prolift mesh repair. Recurrent SUI: recurrence of SUI after the Prolift mesh repair in patients with prior incontinence surgery. SUI, stress urinary incontinence; TVT, tension-free vaginal tape; TVT-O, tension-free vaginal tape-obturator; VH, vaginal hysterectomy.

^a Multiple answers possible; ^b Recurrence after the removal of a Total Prolift mesh infection.

de Landsheere. Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

tients had anterior Prolift mesh repair for anterior vaginal wall prolapse. After combined anterior and posterior prolapse mesh repair, 7 of 373 patients (1.9%) had uterine prolapse develop (3 had laparoscopic sacrocolpopexy, 3 had vaginal hysterectomy and sacrospinous fixation, and 1 had vaginal hysterectomy). Another patient, already mentioned in the mesh-related complication paragraph, presented with apical prolapse after the removal of a

total Prolift mesh for infection. This patient was managed with laparoscopic sacrocolpopexy. For all patients, follow-up examination revealed excellent anatomic results.

The most frequent indication for surgical intervention after Prolift mesh repair was related to urinary incontinence (Table 2). Thirty-six patients (6.9%) complained of urinary problems, with a median presentation time of 13 months

after Prolift mesh repair (Figure). SUI was the most frequent urinary symptom. Of the 277 patients who did not have urinary incontinence before Prolift mesh repair, 23 patients (8.3%) underwent a suburethral sling insertion. Two of the 69 patients (2.9%) who had incontinence surgery before Prolift mesh repair required a secondary retropubic or TVT-O sling insertion for recurrent SUI. Among the 178 patients who underwent

concomitant surgery for incontinence by TVT-O sling insertion, 7 patients (3.9%) experienced persistent SUI. These failures were managed by tightening the preimplanted tape sling in 3 cases,²¹ secondary TVT-O sling insertion in 2 cases, tension-free vaginal tape (TVT) sling insertion in 1 case, and an artificial urinary sphincter in 1 case. One patient (0.6%) presented with early postoperative voiding dysfunction after TVT-O sling insertion requiring a readjustment of the sling at day 5. Finally, 3 patients (1.7%) presented with suburethral mesh exposure managed by partial excision of the tape. One of these 3 patients required new suburethral sling insertion surgery for recurrence of SUI.

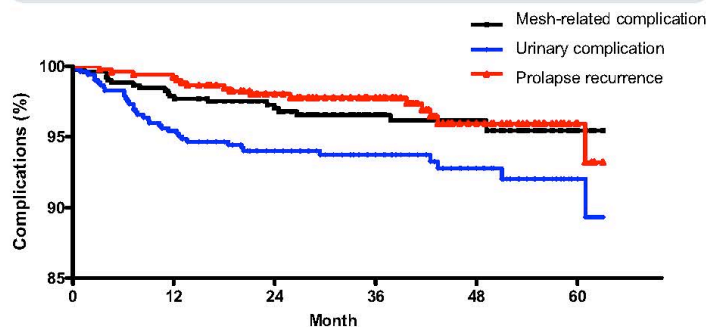
Among the 369 patients with uterine conservation during the procedure, 2 patients (0.5%) presented with postmenopausal bleeding, which was managed by laparoscopic total hysterectomy. Histologic analysis revealed benign lesions in both cases.

In the population of patients deceased during the follow-up, 7 died because of unrelated causes and 1 patient died of an endometrial cancer 3 years after the prolapse surgery. Preoperatively, this patient had a negative Papanicolaou test-smear and no endometrial thickening was noted on pelvic ultrasound examination.

Statistically, there is no significant correlation between global reoperation rate and the following variables: age, parity, year of surgery, previous hysterectomy, previous continence and/or prolapse surgery, type of Prolift mesh repair, surgeon experience, concomitant hysterectomy, or stage of POP. Regarding the type of postoperative complications, an early cystocele stage (stage II) was found to be a significant predictor of mesh-related complications ($P = .037$). In addition, patients requiring surgical intervention for prolapse recurrence were significantly younger (mean age 53.5 years, SD = 9.63) as compared with patients who did not require additional surgery (mean age 64 years, SD = 10.07) ($P = .017$). These patients were also more likely to have severe uterine prolapse, 5.64% with stage III-IV prolapse, compared with 46.1% with stage III-IV among women who did not undergo

FIGURE

Time to reoperation after transvaginal Prolift mesh repair



de Landheere. Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

surgery for recurrence ($P = .017$). No factors were associated with urinary continence complications.

COMMENT

The introduction of transvaginal mesh repair expanded the surgical options available for surgical management of POP. This followed the success and wide use of minimally invasive tapes for SUI surgery. Nonetheless, when compared with more established procedures such as sacrocolpopexy, there is a need for evidence on safety and long-term efficacy of the transvaginal mesh procedure.^{22,23}

In the current study, the global surgical intervention rate after transvaginal Prolift mesh repair was 11.6%, with a median follow-up of 38 months (range, 15–63). The incidence of perioperative complications was 1.4%, including 0.8% of visceral injury and 0.6% of vascular injury. These results are consistent with most published reports on Prolift mesh repair in which the rates of visceral or vascular injuries are ranged from 0 to 6.6%.^{4,6–9,24–30}

The mesh exposure rate was 2.7% and 13 of 14 patients (2.5%) required reoperation. Most of these exposures presented within the first year after surgery (Table 2). This percentage is low when compared with other large cohort studies in which the rate varied from 3.2% to 17%.^{2,4,7–10,24,28} Nonetheless, it is comparable to the 3.4% reported rate after sacrocolpopexy in the review of

Nygaard et al.²³ There was no significant correlation between mesh-related complication and concomitant hysterectomy ($P = .667$). This might reflect the lower rate of concomitant hysterectomy (8.4% compared with 59.2%) and avoidance of inverted T incisions, previously identified as significant risk factors of mesh exposure.²⁴ In addition, mesh placement underneath the full thickness of the vaginal wall may have reduced the damage to tissue vascularization. Both of these potential factors await further evaluation. Mesh retractions were classified according to the most severe presenting symptom. It can be a cause of pelvic pain or functional digestive disorder, but the treatment is wide mesh excision, as for mesh exposure. These mesh-related complications are serious and need to be identified and treated adequately in referral centers by experienced surgeons.

The rate of surgical intervention for prolapse recurrence is 3%, which matches the 2.3% to 4% reported in studies that provided a minimum 1-year follow-up (Table 2).^{8,9,27,28,30} However, in a systematic review of apical vaginal prolapse repair, Diwadkar et al.¹⁶ reported a rate of reoperation for prolapse recurrence of 1.3% (range, 0–16). This is lower than the 3% reported in this study but the follow-up duration was shorter (mean 17 ± 13.8 months). In our study, the median time of surgical intervention for prolapse recurrence was 23 months, which may suggest that the rate of recurrence increases

with longer follow-up (Figure). Eight patients developed indirect recurrence, more often after isolated anterior (4/48, 8.3%) than isolated posterior Prolift mesh repair (4/103, 3.9%) ($P = .055$). These results are consistent with the study of Withagen et al³⁰ and the theory of DeLancey^{31,32} and Lowder et al³³ who demonstrated that anterior repair restores level II support, whereas posterior repair provides level I support, which is associated with lower risks of subsequent recurrence of POP. However, in a recent study comparing posterior mesh repair vs sacrospinous ligament fixation, Lopes et al³⁴ observed the same anatomic results in both groups. Actually, there is still limited evidence to recommend posterior transvaginal mesh repair for the treatment of posterior or apical prolapse.^{2,16,34} After combined anterior and posterior prolapse mesh repair, 8 of 373 patients (2.1%) had recurrence develop requiring reoperation; 7 for uterine prolapse and 1 for enterocele. These patients were significantly younger ($P = .017$) compared with patients who did not require additional surgery. The quality of the pelvic floor connective tissues may play a role in the development of prolapse recurrence in this group of patients.^{35,36} These patients were also more likely to have worse degrees of uterine prolapse ($P = .017$), which again reflects poor tissue strength. Recurrence in the apical compartment was more frequent in patients with uterine prolapse than vaginal vault prolapse. This necessitates looking at the value of securing the mesh into the uterus with a nonabsorbable suture, when performing Prolift mesh repair without concomitant hysterectomy in patients who did not have prior hysterectomy.

Urinary problems were the most frequent indications for surgical intervention after Prolift mesh repair (Table 2). Even with a notable number of patients having previous continence surgery, 23 of the 277 patients (8.3%) who were continent before Prolift mesh repair subsequently underwent a suburethral sling insertion for SUI. These findings show that occult SUI can be a major indication for reoperation. The rate encountered in this series is higher than in previous re-

ports, where it ranged from 2% to 4.5%.^{4,7,8,29} Nonetheless, the follow-up in these studies was much shorter, with the median not exceeding 1 year. It is possible that longer follow-up in these reports may reveal higher rates, matching those encountered in this series. The median duration to suburethral tape insertion in this series was 16 months, which suggests that occult SUI can manifest after 1 year.

The introduction of a new technique brings about new complications that need to be highlighted and recognized for best management. The purpose of this study was to evaluate reoperation rates as well as severe complications of this type of surgery, Dindo grade III.²⁰ This represents an objective outcome, which can be easily assessed in a retrospective study.

The findings of this study should be considered within its limitations and strengths. Although this study was not a randomized controlled trial and was limited to a single center, it reports a large cohort of patients with the longest median follow-up duration. Reoperation rates only represent complications treated surgically and do not reflect the overall morbidity of the technique. The retrospective nature of the study precluded comparison of subjective aspects like symptoms and degree of bother, quality of life, and sexual function. The large number of patients (12.7%) lost to follow-up may represent another bias in this study. However, there were no significant differences between the patients included and the patients excluded from the study, with only 3 patients who chose to be operated in another hospital during the follow-up period.

Moreover, complications can be underestimated because some patients can present with an adverse event and choose not to undergo a surgery. This must be kept in mind when interpreting results. A further potential bias of this report is that most of the procedures are conducted by surgeons with considerable experience in pelvic reconstructive surgery using mesh kits. This element may explain the lower rates of complications when compared with other studies with smaller numbers. Nonetheless, possess-

ing such experience is essential before embarking on such techniques, and the findings of this study should underline this important message.

In conclusion, the global surgical intervention rate after transvaginal Prolift mesh repair in our study was 11.6%. The most frequent indication was related to urinary incontinence. Rates of complications because of the use of mesh kits or prolapse recurrence were low, bearing in mind the experience of the team in pelvic floor reconstruction and mesh surgery. The 3 years median follow-up results show that this procedure is safe and effective in the medium term. Further follow-up will provide long-term outcome and randomized controlled trials are needed to evaluate the place of this technique in pelvic reconstructive surgery. ■

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the International Urogynecological Association for funding Dr Sharif Ismail's observership, which was the inspiration for this work. We also thank Catherine Maillard for her help with the figure in this article.

REFERENCES

1. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 1997;89:501-6.
2. Feiner B, Jelovsek JE, Maher C. Efficacy and safety of transvaginal mesh kits in the treatment of prolapse of the vaginal apex: a systematic review. *BJOG* 2009;116:15-24.
3. Debodinance P, Berrocal J, Clave H, et al. [Changing attitudes on the surgical treatment of urogenital prolapse: birth of the tension-free vaginal mesh]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004;33:577-88.
4. Fatton B, Amblard J, Debodinance P, Cosson M, Jacquetin B. Transvaginal repair of genital prolapse: preliminary results of a new tension-free vaginal mesh (Prolift technique)—a case series multicentric study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007;18:743-52.
5. Caquant F, Collinet P, Debodinance P, et al. Safety of trans vaginal mesh procedure: retrospective study of 684 patients. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34:449-56.
6. Milani AL, Hinoul P, Gauld JM, Sikirica V, Van Drie D, Cosson M. Trocar-guided mesh repair of vaginal prolapse using partially absorbable mesh: 1 year outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:74.e1-8.
7. Abdel-Fattah M, Ramsay I. Retrospective multicentre study of the new minimally invasive mesh repair devices for pelvic organ prolapse. *BJOG* 2008;115:22-30.

8. Takahashi S, Obinata D, Sakuma T, et al. Tension-free vaginal mesh procedure for pelvic organ prolapse: a single-center experience of 310 cases with 1-year follow-up. *Int J Urol* 2010;17:353-8.
9. Jacquelin B, Faton B, Rosenthal C, et al. Total transvaginal mesh (TVM) technique for treatment of pelvic organ prolapse: a 3-year prospective follow-up study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21:1455-62.
10. Hiltunen R, Nieminen K, Takala T, et al. Low-weight polypropylene mesh for anterior vaginal wall prolapse: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2007;110:455-62.
11. Nguyen JN, Burchette RJ. Outcome after anterior vaginal prolapse repair: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2008;111:891-8.
12. Carey M, Higgs P, Goh J, et al. Vaginal repair with mesh versus colporrhaphy for prolapse: a randomised controlled trial. *BJOG* 2009;116:1380-6.
13. Iglesia CB, Sokol AJ, Sokol ER, et al. Vaginal mesh for prolapse: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2010;116:293-303.
14. Nieminen K, Hiltunen R, Takala T, et al. Outcomes after anterior vaginal wall repair with mesh: a randomized, controlled trial with a 3 year follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:235.e1-8.
15. Maher C, Feiner B, Baessler K, Adams EJ, Hagen S, Glazener CM. Surgical management of pelvic organ prolapse in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD004014.
16. Diwadkar GB, Barber MD, Feiner B, Maher C, Jelovsek JE. Complication and reoperation rates after apical vaginal prolapse surgical repair: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2009;113:367-73.
17. Denman MA, Gregory WT, Boyles SH, Smith V, Edwards SR, Clark AL. Reoperation 10 years after surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:555.e1-5.
18. Swift S, Morris S, McKinnie V, et al. Validation of a simplified technique for using the POPQ pelvic organ prolapse classification system. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2006;17:615-20.
19. De Leval J. Novel surgical technique for the treatment of female stress urinary incontinence: transobturator vaginal tape inside-out. *Eur Urol* 2003;44:724-30.
20. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240:205-13.
21. De Landsheere L, Lucot JP, Foldart JM, Cosson M. Management of recurrent or persistent stress urinary incontinence after TVT-O by mesh readjustment. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21:1347-51.
22. Gadonneix P, Eroli A, Scambia G, Villet R. The use of laparoscopic sacrocolpopexy in the management of pelvic organ prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:376-80.
23. Nygaard IE, McCreery R, Brubaker L, et al. Abdominal sacrocolpopexy: a comprehensive review. *Obstet Gynecol* 2004;104:805-23.
24. Collinet P, Belot F, Debodinance P, Ha Duc E, Lucot JP, Cosson M. Transvaginal mesh technique for pelvic organ prolapse repair: mesh exposure management and risk factors. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2006;17:315-20.
25. Flann F. Sedation and local anaesthesia for vaginal pelvic floor repair of genital prolapse using mesh. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007;18:1471-5.
26. Altman D, Falconer C. Perioperative morbidity using transvaginal mesh in pelvic organ prolapse repair. *Obstet Gynecol* 2007;109:303-8.
27. Van Raalte HM, Lucette VR, Molden SM, Half R, Murphy M. One-year anatomic and quality-of-life outcomes after the Prolift procedure for treatment of posthysterectomy prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:694.e1-6.
28. Elmer C, Altman D, Engh ME, Avelsen S, Vayrynen T, Falconer C. Trocar-guided transvaginal mesh repair of pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 2009;113:117-26.
29. Aungst MJ, Friedman EB, Von Pechmann WS, Horbach NS, Welgoss JA. De novo stress incontinence and pelvic muscle symptoms after transvaginal mesh repair. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:73.e1-7.
30. Withagen MI, Verhout ME, Milani AL. Does trocar-guided tension-free vaginal mesh (Prolift) repair provoke prolapse of the unaffected compartments? *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21:271-8.
31. DeLancey JO. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1717-24; discussion 24-8.
32. Summers A, Winkel LA, Hussain HK, DeLancey JO. The relationship between anterior and apical compartment support. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1438-43.
33. Lowder JL, Park AJ, Ellison R, et al. The role of apical vaginal support in the appearance of anterior and posterior vaginal prolapse. *Obstet Gynecol* 2008;111:152-7.
34. Lopes ED, Lemos NL, Carrameo Sda S, et al. Transvaginal polypropylene mesh versus sacrospinous ligament fixation for the treatment of uterine prolapse: 1-year follow-up of a randomized controlled trial. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21:389-94.
35. Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet* 1996;347:1658-61.
36. Kerkhof MH, Hendriks L, Broilman HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse—a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009;20:461-74.

6. Bibliographie

1. Baden WF, Walker TA (1972) Genesis of the vaginal profile: a correlated classification of vaginal relaxation. *Clinical obstetrics and gynecology* 15 (4):1048-1054
2. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, Shull BL, Smith AR (1996) The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 175 (1):10-17
3. Swift S, Morris S, McKinnie V, Freeman R, Petri E, Scotti RJ, Dwyer P (2006) Validation of a simplified technique for using the POPQ pelvic organ prolapse classification system. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 17 (6):615-620. doi:10.1007/s00192-006-0076-z
4. Fatton B (2005) Anatomie dynamique du périnée. *Pelvi-périnéologie* 2005:21-30
5. DeLancey JO (1992) Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 166 (6 Pt 1):1717-1724; discussion 1724-1718
6. DeLancey JO (1993) Anatomy and biomechanics of genital prolapse. *Clinical obstetrics and gynecology* 36 (4):897-909
7. DeLancey JO (1994) The anatomy of the pelvic floor. *Curr Opin Obstet Gynecol* 6 (4):313-316
8. Lowder JL, Frankman EA, Ghetti C, Burrows LJ, Krohn MA, Moalli P, Zyczynski H (2010) Lower urinary tract symptoms in women with pelvic organ prolapse. *International urogynecology journal* 21 (6):665-672. doi:10.1007/s00192-009-1088-2
9. Ellerkmann RM, Cundiff GW, Melick CF, Nihira MA, Leffler K, Bent AE (2001) Correlation of symptoms with location and severity of pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 185 (6):1332-1337; discussion 1337-1338. doi:10.1067/mob.2001.119078
10. Lowder JL, Ghetti C, Moalli P, Zyczynski H, Cash TF (2010) Body image in women before and after reconstructive surgery for pelvic organ prolapse. *International urogynecology journal* 21 (8):919-925. doi:10.1007/s00192-010-1141-1
11. Jelovsek JE, Maher C, Barber MD (2007) Pelvic organ prolapse. *Lancet* 369 (9566):1027-1038. doi:10.1016/S0140-6736(07)60462-0
12. Swift SE, Tate SB, Nicholas J (2003) Correlation of symptoms with degree of pelvic organ support in a general population of women: what is pelvic organ prolapse? *Am J Obstet Gynecol* 189 (2):372-377; discussion 377-379
13. Samuelsson EC, Victor FT, Tibblin G, Svardsudd KF (1999) Signs of genital prolapse in a Swedish population of women 20 to 59 years of age and possible related factors. *Am J Obstet Gynecol* 180 (2 Pt 1):299-305
14. Hendrix SL, Clark A, Nygaard I, Aragaki A, Barnabei V, McTiernan A (2002) Pelvic organ prolapse in the Women's Health Initiative: gravity and gravidity. *Am J Obstet Gynecol* 186 (6):1160-1166

15. Bump RC, Norton PA (1998) Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 25 (4):723-746
16. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL (1997) Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstetrics and gynecology* 89 (4):501-506. doi:10.1016/S0029-7844(97)00058-6
17. Brown JS, Waetjen LE, Subak LL, Thom DH, Van den Eeden S, Vittinghoff E (2002) Pelvic organ prolapse surgery in the United States, 1997. *Am J Obstet Gynecol* 186 (4):712-716
18. Schaffer JJ, Wai CY, Boreham MK (2005) Etiology of pelvic organ prolapse. *Clinical obstetrics and gynecology* 48 (3):639-647
19. Tremollieres F (2010) [Connective tissue and prolapse genesis]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite* 38 (6):388-393. doi:10.1016/j.gyobfe.2010.04.005
20. Harris RL, Cundiff GW, Coates KW, Bump RC (1998) Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in nulliparous women. *Obstetrics and gynecology* 92 (6):951-954
21. Carley ME, Schaffer J (2000) Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers Danlos syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 182 (5):1021-1023
22. Kerkhof MH, Hendriks L, Brolmann HA (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse--a review of the current literature. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20 (4):461-474. doi:10.1007/s00192-008-0737-1
23. Bortolini MA, Drutz HP, Lovatsis D, Alarab M (2010) Vaginal delivery and pelvic floor dysfunction: current evidence and implications for future research. *International urogynecology journal* 21 (8):1025-1030. doi:10.1007/s00192-010-1146-9
24. De Landsheere L, Munaut C, Nusgens B, Maillard C, Rubod C, Nisolle M, Cosson M, Foidart JM (2013) Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review. *International urogynecology journal*. doi:10.1007/s00192-013-2111-1
25. Campeau L, Gorbachinsky I, Badlani GH, Andersson KE (2011) Pelvic floor disorders: linking genetic risk factors to biochemical changes. *BJU Int* 108 (8):1240-1247. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10385.x
26. Mant J, Painter R, Vessey M (1997) Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford Family Planning Association Study. *British journal of obstetrics and gynaecology* 104 (5):579-585
27. McLennan MT, Harris JK, Kariuki B, Meyer S (2008) Family history as a risk factor for pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19 (8):1063-1069. doi:10.1007/s00192-008-0591-1
28. Rortveit G, Daltveit AK, Hannestad YS, Hunskaar S, Norwegian ES (2003) Urinary incontinence after vaginal delivery or cesarean section. *The New England journal of medicine* 348 (10):900-907. doi:10.1056/NEJMoa021788

29. O'Boyle AL, Woodman PJ, O'Boyle JD, Davis GD, Swift SE (2002) Pelvic organ support in nulliparous pregnant and nonpregnant women: a case control study. *Am J Obstet Gynecol* 187 (1):99-102
30. Moalli PA, Jones Ivy S, Meyn LA, Zyczynski HM (2003) Risk factors associated with pelvic floor disorders in women undergoing surgical repair. *Obstetrics and gynecology* 101 (5 Pt 1):869-874
31. Tinelli A, Malvasi A, Rahimi S, Negro R, Vergara D, Martignago R, Pellegrino M, Cavallotti C (2010) Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women. *Menopause* 17 (1):204-212. doi:10.1097/gme.0b013e3181b0c2ae
32. Daucher JA, Ellison RE, Lowder JL (2010) Pelvic support and urinary function improve in women after surgically induced weight reduction. *Female pelvic medicine & reconstructive surgery* 16 (5):263-267. doi:10.1097/SPV.0b013e3181eedb30
33. Altman D, Forsman M, Falconer C, Lichtenstein P (2008) Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Eur Urol* 54 (4):918-922. doi:10.1016/j.eururo.2007.12.004
34. Nygaard I, Bradley C, Brandt D, Women's Health I (2004) Pelvic organ prolapse in older women: prevalence and risk factors. *Obstetrics and gynecology* 104 (3):489-497. doi:10.1097/01.AOG.0000136100.10818.d8
35. Rortveit G, Brown JS, Thom DH, Van Den Eeden SK, Creasman JM, Subak LL (2007) Symptomatic pelvic organ prolapse: prevalence and risk factors in a population-based, racially diverse cohort. *Obstetrics and gynecology* 109 (6):1396-1403. doi:10.1097/01.AOG.0000263469.68106.90
36. Chiaffarino F, Chatenoud L, Dindelli M, Meschia M, Buonaguidi A, Amicarelli F, Surace M, Bertola E, Di Cintio E, Parazzini F (1999) Reproductive factors, family history, occupation and risk of urogenital prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 82 (1):63-67
37. Dietz HP, Clarke B (2005) Prevalence of rectocele in young nulliparous women. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 45 (5):391-394. doi:10.1111/j.1479-828X.2005.00454.x
38. Arya LA, Novi JM, Shaunik A, Morgan MA, Bradley CS (2005) Pelvic organ prolapse, constipation, and dietary fiber intake in women: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 192 (5):1687-1691. doi:10.1016/j.ajog.2004.11.032
39. Slieker-ten Hove MC, Pool-Goudzwaard AL, Eijkemans MJ, Steegers-Theunissen RP, Burger CW, Vierhout ME (2009) Symptomatic pelvic organ prolapse and possible risk factors in a general population. *Am J Obstet Gynecol* 200 (2):184 e181-187. doi:10.1016/j.ajog.2008.08.070
40. Dallenbach P, Kaelin-Gambirasio I, Dubuisson JB, Boulvain M (2007) Risk factors for pelvic organ prolapse repair after hysterectomy. *Obstetrics and gynecology* 110 (3):625-632. doi:10.1097/01.AOG.0000278567.37925.4e

41. Hagen S, Stark D, Glazener C, Sinclair L, Ramsay I (2009) A randomized controlled trial of pelvic floor muscle training for stages I and II pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20 (1):45-51. doi:10.1007/s00192-008-0726-4
42. FDA Safety Communication: UPDATE on serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh for pelvic organ prolapse. <http://www.fda.gov/medicaldevices/safety/alertsandnotices/ucm262435.htm> (2011).
43. Haute Autorité de la Santé. Evaluation des implants de renfort pour le traitement de l'incontinence urinaire d'effort féminine et pour le traitement du prolapsus des organes pelviens de la femme. <http://www.has-sante.fr> (2007).
44. Maher C, Feiner B, Baessler K, Adams EJ, Hagen S, Glazener CM (2010) Surgical management of pelvic organ prolapse in women. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD004014. doi:10.1002/14651858.CD004014.pub4
45. Shull BL, Capen CV, Riggs MW, Kuehl TJ (1992) Preoperative and postoperative analysis of site-specific pelvic support defects in 81 women treated with sacrospinous ligament suspension and pelvic reconstruction. *Am J Obstet Gynecol* 166 (6 Pt 1):1764-1768; discussion 1768-1771
46. Debodinance P, Berrocal J, Clave H, Cosson M, Garbin O, Jacquetin B, Rosenthal C, Salet-Lizee D, Villet R (2004) [Changing attitudes on the surgical treatment of urogenital prolapse: birth of the tension-free vaginal mesh]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 33 (7):577-588
47. Jacquetin B, Hinoul P, Gauld J, Fatton B, Rosenthal C, Clave H, Garbin O, Berrocal J, Villet R, Salet-Lizee D, Debodinance P, Cosson M (2013) Total transvaginal mesh (TVM) technique for treatment of pelvic organ prolapse: a 5-year prospective follow-up study. *International urogynecology journal* 24 (10):1679-1686. doi:10.1007/s00192-013-2080-4
48. Withagen MI, Milani AL, den Boon J, Vervest HA, Vierhout ME (2011) Trocar-guided mesh compared with conventional vaginal repair in recurrent prolapse: a randomized controlled trial. *Obstetrics and gynecology* 117 (2 Pt 1):242-250. doi:10.1097/AOG.0b013e318203e6a5
49. Altman D, Vayrynen T, Engh ME, Axelsen S, Falconer C, Nordic Transvaginal Mesh G (2011) Anterior colporrhaphy versus transvaginal mesh for pelvic-organ prolapse. *The New England journal of medicine* 364 (19):1826-1836. doi:10.1056/NEJMoa1009521
50. Deffieux X, Sentilhes L, Savary D, Letouzey V, Marcelli M, Mares P, Cngof, Pierre F (2013) [Indications of mesh in surgical treatment of pelvic organ prolapse by vaginal route: Expert consensus from the French College of Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 42 (7):628-638. doi:10.1016/j.jgyn.2013.08.018
51. de Landsheere L, Ismail S, Lucot JP, Deken V, Foidart JM, Cosson M (2012) Surgical intervention after transvaginal Prolift mesh repair: retrospective single-center study including 524 patients with 3 years' median follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 206 (1):83 e81-87. doi:10.1016/j.ajog.2011.07.040

52. Raudrant D (2013) [Disappearance of vaginal meshes: are the FDA recommendations not valid in France?]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite* 41 (3):147-148. doi:10.1016/j.gyobfe.2013.01.002
53. Haylen BT, Freeman RM, Swift SE, Cosson M, Davila GW, Deprest J, Dwyer PL, Fatton B, Kocjancic E, Lee J, Maher C, Petri E, Rizk DE, Sand PK, Schaer GN, Webb RJ (2011) An International Urogynecological Association (IUGA) / International Continence Society (ICS) joint terminology and classification of the complications related directly to the insertion of prostheses (meshes, implants, tapes) & grafts in female pelvic floor surgery. *International urogynecology journal* 22 (1):3-15. doi:10.1007/s00192-010-1324-9
54. Maher C, Feiner B, Baessler K, Schmid C (2013) Surgical management of pelvic organ prolapse in women. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD004014. doi:10.1002/14651858.CD004014.pub5
55. Boulanger L, Lucot JP, Giraudet G, Bot Robin V, Rubod C, Collinet P, Cosson M (2013) [Genital prolapse surgery: state of the art of the vaginal approach]. *Le Journal medical libanais The Lebanese medical journal* 61 (1):48-54
56. Farrell SA, Dempsey T, Geldenhuys L (2001) Histologic examination of "fascia" used in colporrhaphy. *Obstetrics and gynecology* 98 (5 Pt 1):794-798
57. Weber AM, Walters MD (1997) Anterior vaginal prolapse: review of anatomy and techniques of surgical repair. *Obstetrics and gynecology* 89 (2):311-318. doi:10.1016/S0029-7844(96)00322-5
58. Alperin M, Moalli PA (2006) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18 (5):544-550. doi:10.1097/01.gco.0000242958.25244.ff
59. Elliott DH (1967) The biomechanical properties of tendon in relation to muscular strength. *Annals of physical medicine* 9 (1):1-7
60. Bailey AJ (2001) Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of ageing and development* 122 (7):735-755
61. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF (1990) Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *Journal of cell science* 95 (Pt 4):649-657
62. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE (2004) Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *The Journal of biological chemistry* 279 (51):53331-53337. doi:10.1074/jbc.M409622200
63. Makinen J, Soderstrom KO, Kiilholma P, Hirvonen T (1986) Histological changes in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Archives of gynecology* 239 (1):17-20

64. Kokcu A, Yanik F, Cetinkaya M, Alper T, Kandemir B, Malatyalioglu E (2002) Histopathological evaluation of the connective tissue of the vaginal fascia and the uterine ligaments in women with and without pelvic relaxation. *Archives of gynecology and obstetrics* 266 (2):75-78
65. Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Frangos-Plemenos M, Arnoyannaki N, Creatsas G (2001) Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97 (1):76-79
66. Takano CC, Girao MJ, Sartori MG, Castro RA, Arruda RM, Simoes MJ, Baracat EC, Rodrigues de Lima G (2002) Analysis of collagen in parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 13 (6):342-345; discussion 345. doi:10.1007/s001920200076
67. Lin SY, Tee YT, Ng SC, Chang H, Lin P, Chen GD (2007) Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18 (1):43-48. doi:10.1007/s00192-006-0090-1
68. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM, Gordy SC, Meyn LA (2005) Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Obstetrics and gynecology* 106 (5 Pt 1):953-963. doi:10.1097/01.AOG.0000182584.15087.dd
69. Gartner L.P HJL (2006) *Color Atlas of Histology*, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore,
70. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T (2004) Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nature genetics* 36 (2):178-182. doi:10.1038/ng1297
71. Budatha M, Roshanravan S, Zheng Q, Weislander C, Chapman SL, Davis EC, Starcher B, Word RA, Yanagisawa H (2011) Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 121 (5):2048-2059. doi:10.1172/JCI45636
72. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmern PE (2007) Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int* 100 (2):346-350. doi:BJU6998 [pii] 10.1111/j.1464-410X.2007.06998.x
73. Takacs P, Nassiri M, Viciano A, Candiotti K, Fornoni A, Medina CA (2009) Fibulin-5 expression is decreased in women with anterior vaginal wall prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20 (2):207-211. doi:10.1007/s00192-008-0757-x
74. Kannan K, McConnell A, McLeod M, Rane A (2011) Microscopic alterations of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 31 (3):250-253. doi:10.3109/01443615.2011.553690

75. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA (2002) Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187 (1):56-63. doi:S0002937802000820 [pii]
76. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA (2002) Morphometric properties of the posterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187 (6):1501-1508; discussion 1508-1509. doi:S000293780200460X [pii]
77. Badiou W, Granier G, Bousquet PJ, Monrozies X, Mares P, de Tayrac R (2008) Comparative histological analysis of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse or control subjects. A pilot study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19 (5):723-729. doi:10.1007/s00192-007-0516-4
78. Kaplan PB, Usta U, Inal HA, Tastekin T, Tokuc B (2011) Neuromuscular morphometry of the uterine ligaments and vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Neurourol Urodyn* 30 (1):126-132. doi:10.1002/nau.20972
79. Inal HA, Kaplan PB, Usta U, Tastekin E, Aybatli A, Tokuc B (2010) Neuromuscular morphometry of the vaginal wall in women with anterior vaginal wall prolapse. *Neurourol Urodyn* 29 (3):458-463. doi:10.1002/nau.20779
80. da Silva Lara LA, da Silva AR, Rosa ESJC, Chaud F, Silva-de-Sa MF, Meireles ESAR, de Sa Rosa ESAC (2009) Menopause leading to increased vaginal wall thickness in women with genital prolapse: impact on sexual response. *The journal of sexual medicine* 6 (11):3097-3110. doi:10.1111/j.1743-6109.2009.01407.x
81. Hollabaugh RS, Steiner MS, Dmochowski RR (2001) Neuroanatomy of the female continence complex: clinical implications. *Urology* 57 (2):382-388
82. Sultan AH, Kamm MA, Hudson CN (1994) Pudendal nerve damage during labour: prospective study before and after childbirth. *British journal of obstetrics and gynaecology* 101 (1):22-28
83. Tetzschner T, Sorensen M, Lose G, Christiansen J (1997) Pudendal nerve function during pregnancy and after delivery. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 8 (2):66-68
84. Zhu L, Lang J, Chen J, Chen J (2004) Study on nerve fiber density in anterior vaginal epithelium for stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 15 (4):272-275
85. Altman D, Zhang A, Falconer C (2006) Innervation of the rectovaginal wall in patients with rectocele compared to healthy controls. *Neurourol Urodyn* 25 (7):776-781. doi:10.1002/nau.20249
86. Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, Dubois P, Cosson M (2007) Biomechanical properties of vaginal tissue. Part 1: new experimental protocol. *J Urol* 178 (1):320-325; discussion 325. doi:10.1016/j.juro.2007.03.040

87. Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, Jean-Charles C, Dubois P, Cosson M (2008) Biomechanical properties of vaginal tissue: preliminary results. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19 (6):811-816. doi:10.1007/s00192-007-0533-3
88. Rivaux G, Rubod C, Dedet B, Brieu M, Gabriel B, Cosson M (2013) Comparative analysis of pelvic ligaments: a biomechanics study. *International urogynecology journal* 24 (1):135-139. doi:10.1007/s00192-012-1861-5
89. Rubod C, Brieu M, Cosson M, Rivaux G, Clay JC, de Landsheere L, Gabriel B (2012) Biomechanical properties of human pelvic organs. *Urology* 79 (4):968 e917-922. doi:10.1016/j.urology.2011.11.010
90. Diani J. BM, Gilormini P. (2006) Observation and modelling of the anisotropic visco-hyperelastic behaviour of a rubber-like material. *Int J Solids Structures* 43 (10):3044-3056
91. Mooney M (1940) A theory of large elastic deformation. *J Appl Physiol* (11):582-592
92. Rivlin R (1948) Large elastic deformations of isotropic materials. I. Fundamental concepts, II. Some uniqueness theorems for pure homogenous deformations. *Philos Trans R Soc Lon A Math Phys Sci* (19):275-289
93. Jean-Charles C, Rubod C, Brieu M, Boukerrou M, Fasel J, Cosson M (2010) Biomechanical properties of prolapsed or non-prolapsed vaginal tissue: impact on genital prolapse surgery. *International urogynecology journal* 21 (12):1535-1538. doi:10.1007/s00192-010-1208-z
94. Gabriel B, Denschlag D, Gobel H, Fittkow C, Werner M, Gitsch G, Watermann D (2005) Uterosacral ligament in postmenopausal women with or without pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 16 (6):475-479. doi:10.1007/s00192-005-1294-5
95. Gabriel B, Watermann D, Hancke K, Gitsch G, Werner M, Tempfer C, zur Hausen A (2006) Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 17 (5):478-482. doi:10.1007/s00192-005-0045-y
96. Dubernard G, Rouzier R, Haddad B, Dubois P, Paniel BJ (2003) Correction of uterine prolapse by the vaginal route using the uterosacral ligaments: Shirodkar procedure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 109 (2):214-218
97. Zhou L, Lee JH, Wen Y, Constantinou C, Yoshinobu M, Omata S, Chen B (2012) Biomechanical properties and associated collagen composition in vaginal tissue of women with pelvic organ prolapse. *J Urol* 188 (3):875-880. doi:10.1016/j.juro.2012.05.017
98. Ulrich D, Edwards SL, Su K, White JF, Ramshaw JA, Jenkin G, Deprest J, Rosamilia A, Werkmeister JA, Gargett CE (2014) Influence of reproductive status on tissue composition and biomechanical properties of ovine vagina. *PloS one* 9 (4):e93172. doi:10.1371/journal.pone.0093172

99. Ennen S, Kloss S, Scheiner-Bobis G, Failing K, Wehrend A (2011) Histological, hormonal and biomolecular analysis of the pathogenesis of ovine Prolapsus vaginae ante partum. *Theriogenology* 75 (2):212-219. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.08.007
100. Shah AD, Kohli N, Rajan SS, Hoyte L (2008) The age distribution, rates, and types of surgery for pelvic organ prolapse in the USA. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19 (3):421-428. doi:10.1007/s00192-007-0457-y
101. Luber KM, Boero S, Choe JY (2001) The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. *Am J Obstet Gynecol* 184 (7):1496-1501; discussion 1501-1493
102. de Landsheere L, Blacher S, Munaut C, Nusgens B, Rubod C, Noel A, Foidart JM, Cosson M, Nisolle M (2014) Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *International urogynecology journal*. doi:10.1007/s00192-014-2431-9
103. Gabriel B, Rubod C, Brieu M, Dedet B, de Landsheere L, Delmas V, Cosson M (2011) Vagina, abdominal skin, and aponeurosis: do they have similar biomechanical properties? *International urogynecology journal* 22 (1):23-27. doi:10.1007/s00192-010-1237-7
104. G. Rivaux CR, B. Dedet, M. Brieu, B. Gabriel, L. de Landsheere, P. Devos, V. Delmas, M. Cosson (2010) Biomechanical characterisation of uterine ligaments. Implications for the pelvic floor. *Pelvi-périnéologie* (6):67-74
105. Haylen BT, Freeman RM, Swift SE, Cosson M, Davila GW, Deprest J, Dwyer PL, Fatton B, Kocjancic E, Lee J, Maher C, Petri E, Rizk DE, Sand PK, Schaer GN, Webb R, International Urogynecological A, International Continence S, Joint IICSWGGoCT (2011) An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint terminology and classification of the complications related directly to the insertion of prostheses (meshes, implants, tapes) and grafts in female pelvic floor surgery. *Neurourol Urodyn* 30 (1):2-12. doi:10.1002/nau.21036
106. Endo M, Feola A, Sindhwani N, Manodoro S, Vlacil J, Engels AC, Claus F, Deprest JA (2014) Mesh contraction: in vivo documentation of changes in apparent surface area utilizing meshes visible on magnetic resonance imaging in the rabbit abdominal wall model. *International urogynecology journal*. doi:10.1007/s00192-013-2293-6
107. Quemener J, Joutel N, Lucot JP, Giraudet G, Collinet P, Rubod C, Cosson M (2014) Rate of re-interventions after transvaginal pelvic organ prolapse repair using partially absorbable mesh: 20 months median follow-up outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 175:194-198. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.12.031
108. Abramowitch SD, Feola A, Jallah Z, Moalli PA (2009) Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1:S146-158. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.02.022
109. Couri BM, Lenis AT, Borazjani A, Paraiso MF, Damaser MS (2012) Animal models of female pelvic organ prolapse: lessons learned. *Expert review of obstetrics & gynecology* 7 (3):249-260. doi:10.1586/eog.12.24

110. Rubod C, Lecomte-Grosbras P, Brieu M, Giraudet G, Betrouni N, Cosson M (2013) 3D simulation of pelvic system numerical simulation for a better understanding of the contribution of the uterine ligaments. *International urogynecology journal*. doi:10.1007/s00192-013-2135-6