



HAL
open science

La massification du lycée au Brésil et l'expérience lycéenne à Curitiba

Carolina Kotovicz Rolon

► **To cite this version:**

Carolina Kotovicz Rolon. La massification du lycée au Brésil et l'expérience lycéenne à Curitiba. Sociologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0868 . tel-01724189

HAL Id: tel-01724189

<https://theses.hal.science/tel-01724189>

Submitted on 6 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Audrey BISCAY-AUSSEL

**Validation pré-clinique d'un produit d'ingénierie vasculaire
à base d'hydrogel de chitosane**

Sous la direction du Professeur Laurence Bordenave

Soutenue le 5 Décembre 2017

Membres du jury :

M. BOLLA Marc PU-PH Nice	Président
M. BLANCHEMAIN Nicolas MCU Lille	Rapporteur
Mme CHAUSSAIN Catherine PU-PH Paris	Rapporteur
Mme BERTRAND Caroline PU-PH Bordeaux	Examineur
M. DAVID Laurent PU Lyon	Invité
Mme MONTEBAULT Alexandra MCU Lyon	Invitée
Mme BORDENAVE Laurence PU-PH Bordeaux	Directrice de thèse

Validation pré-clinique d'un produit d'ingénierie vasculaire à base d'hydrogel de chitosane

Objectifs. Les substituts vasculaires synthétiques sont à l'origine de nombreux échecs pour le remplacement des vaisseaux de petit calibre. L'émergence de l'ingénierie vasculaire ouvre des perspectives face à ce problème de santé publique. Le chitosane, polymère naturel, peut être utilisé comme matrice en ingénierie vasculaire. L'objectif de cette thèse était de produire des hydrogels de chitosane et d'étudier les propriétés mécaniques, biologiques et la biointégration. **Matériel et Méthodes.** Les hydrogels ont été caractérisés mécaniquement *in vitro*. En augmentant la concentration en chitosane, la résistance à la suture, à l'éclatement et les modules élastiques augmentaient de manière significative. Une série d'expériences, allant de l'évaluation *in vitro* à l'analyse *in vivo* de la biocompatibilité a été réalisée. *In vitro*, les hydrogels permettaient la prolifération des progéniteurs endothéliaux (EPCs) et étaient hémocompatibles. *In vivo*, les hydrogels n'étaient pas résorbés après 60 jours, dans un modèle d'implantation hétérotopique chez le rat. De plus, la biointégration du chitosane a été étudiée. *In vitro*, l'endothélium à la surface des hydrogels se comportait comme celui d'un vaisseau natif. *In vivo*, les hydrogels de chitosane étaient capables de moduler la réponse inflammatoire, dans un modèle d'implantation ectopique chez le rat, en favorisant la polarisation des macrophages vers le phénotype M2. Enfin, 2 tubes de chitosane ont été implantés avec succès pour des pontages carotidiens pendant 3 jours chez le mouton. **Conclusion.** En modulant la concentration de chitosane, nous avons produit des matrices avec des propriétés adaptées pour l'ingénierie vasculaire

Mots clés : ingénierie vasculaire, hydrogels de chitosane, biocompatibilité, *in vitro*, *in vivo*

Pre-clinical validation of chitosan hydrogels for vascular engineering

Aims. Vascular grafts made of synthetic polymers perform poorly in small-diameter applications. Consequently, there is strong clinical to produce small caliber vessels with better patency. The emergence of vascular engineering opens new possibilities. Chitosan, a natural polymer, can provide a scaffold for vascular engineering. The goal of this thesis was to produce chitosan-based hydrogels and to assess their biological and mechanical properties and their biointegration. **Methods and Results.** Hydrogels were mechanically characterized *in vitro*. By increasing chitosan concentration, suture retention value, average burst strength and elastic moduli increased significantly. A series of experiments ranging from *in vitro* biocompatibility tests to *in vivo* studies was performed. *In vitro*, chitosan supported human endothelial progenitor cells (EPCs) proliferation and was hemocompatible. *In vivo*, no resorption of chitosan was observed in a rat heterotopic implantation model. In addition biointegration of chitosan hydrogels were investigated. *In vitro*, chitosan endothelialized with EPCs behave as a native endothelium. *In vivo*, chitosan hydrogels were able of modulating the inflammatory response of injured host tissue by favouring polarization of macrophages towards the beneficial M2 phenotype in a rat ectopic implantation model. Finally, as a proof of concept, 2 chitosan tubes were implanted successfully as carotid interposition grafts for 3 days in sheep. **Conclusion.** By modulating chitosan concentration, we produced scaffolds with suitable properties to be implanted *in vivo*.

Keyword: vascular engineering, chitosan hydrogels, biocompatibility, *in vitro*, *in vivo*

Unité de recherche

Bioingénierie Tissulaire (BioTis) Inserm U1026
Université Bordeaux - 146, rue Léo-Saignat - 33076 BORDEAUX cedex - France

REMERCIEMENTS

A MA DIRECTRICE. Madame le Professeur Bordenave. Je tiens à vous remercier sincèrement pour la direction de cette thèse : pour votre présence, votre détermination et votre aide précieuse tout au long de mon parcours. De plus, grâce à vous, j'ai découvert les joies d'un instant thé/gâteau le dimanche tout en travaillant. Je garderai surtout de ces 4 ans, les nombreux enseignements que vous avez su me transmettre et qui me seront à jamais bénéfiques. Pour tout cela, veuillez recevoir l'expression de ma profonde considération, ainsi que toute ma gratitude.

A MES MEMBRES DU JURY. Madame le Professeur Bertrand, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et également pour votre présence et votre soutien tout au long de mon parcours universitaire mais également en Recherche. Pour votre accompagnement et votre gentillesse de tous les jours, veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect. **Monsieur le Professeur Bolla,** je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour votre bienveillance lors de nos rencontres, dans divers congrès dentaires. Permettez-moi de vous témoigner toute ma gratitude. **Madame le Professeur Chaussain et Monsieur le Docteur Blanchemain,** je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et surtout pour vos relectures attentives et vos précieux conseils. Pour toute votre sollicitude, soyez assurés de ma profonde gratitude. **Monsieur le Professeur David et Madame le Docteur Clayer-Montebault,** je vous remercie de m'avoir appris « les secrets » du chitosane, mais surtout de m'avoir si bien accueillie lors de mon séjour à Lyon. Vos nombreuses et précieuses relectures lors de la rédaction des articles ont permis l'enrichissement de ces travaux. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma plus profonde estime.

A MES DIRECTEURS DE LABORATOIRE. Madame le Docteur Amédée, je vous remercie de m'avoir acceptée au sein de l'équipe BIOTIS en 2011 et pour votre gentillesse. Une présence qui a compté, auprès de la plus agréable des « DR1 », que je connaisse. **Monsieur le Professeur Fricain,** je vous remercie pour votre soutien depuis ma thèse d'exercice et jusqu'à aujourd'hui. Merci pour la confiance que vous me portez depuis ces années et pour votre aide quotidienne précieuse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A MES COLLEGUES DE BIOTIS. Reine et Robin, merci pour ces longs moments passés à mes côtés afin de m'expliquer les rudiments de la culture cellulaire et me faire progresser un peu plus chaque jour. **Noëlie,** merci de m'avoir fait découvrir la Recherche et de m'avoir accompagnée au cours de ces dernières années. **Nicolas,** merci pour tes précieuses relectures et surtout pour nos passionnantes conversations autour de ton excellent café. **Claudine,** merci de m'avoir fait découvrir « tous les secrets des macrophages et de leur phénotype ». **Béatrice,** merci pour ta présence et ton aide précieuse lors de nos « manip plaquettes ». **Jean,** merci pour avoir partagé toutes vos connaissances sur l'hémocompatibilité. **Patrick,** merci pour ta disponibilité et ta gentillesse perpétuelle. Merci à tous les étudiants et plus particulièrement, aux anciens (**Julien, Lila, Emeline**), moins anciens (**Carole, Camille, Véra, Mathieu, Clément**) et plus jeunes (**Agathe, Yohan, Laure**). Merci à tous mes collègues de Master 2, et plus particulièrement à **Alice et Kostinette,** pour tous les bons moments passés à Paris et Bordeaux. Merci à la « team dentaire » (**Adrien, Raphaël, Sylvain**), à **Muriel, Damien, Delphine** et tous les membres de BIOTIS pour leur présence au cours des dernières années.

AUX COLLABORATEURS DE CETTE THESE. Au cours de cette thèse, j'ai eu le plaisir de travailler avec différents laboratoires ou industriels. Je tiens à remercier le laboratoire LTVS U1148 et Rescoll et plus particulièrement **Didier, Rachida et Marie-Pierre.** Je remercie également les chirurgiens vasculaires, **Vincenzo Brizzi et Xavier Bérard** pour leur aide et leur présence et **Chloé James** pour toute son expertise et sa gentillesse lors de nos échanges sur la plaquette. Je remercie le CIC-IT et plus particulièrement **Marlène Durand, Samantha Delmond et Martine Renard** pour leur accueil et leur gentillesse.

A LA CHEF DU POLE D'ODONTOLOGIE ET DE SANTE BUCCALE. Madame le Professeur Dupuis, je tiens à vous remercier pour votre présence aujourd'hui, mais également lors de mon parcours hospitalier. Je vous remercie de m'avoir permis d'assurer mes vacances hospitalières, tout en laissant une place importante à la Recherche.

A LA SOUS SECTION 58-03. Monsieur le Professeur Ella, je vous remercie chaleureusement de m'avoir accepté dans la sous-section et de me faire confiance. Je tenterai d'en rester digne au cours des années à venir. Monsieur le Docteur Colat-Parros, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de la sous section et plus particulièrement en biomatériaux. Merci pour la confiance que vous m'avez apporté en me laissant dispenser des cours au sein de cette discipline et merci pour vos nombreux conseils. Messieurs les Docteurs Coutant, Culot et Decaup, merci pour tous les moments agréables passés à vos côtés lors des enseignements pratiques et dirigés.

A LA SOUS SECTION 57-03. Madame le Docteur Badet et Monsieur le Docteur Samot, je vous remercie de m'avoir accueillie de 2014 à 2016 au sein de la section 57-03 et de m'avoir accompagnée lors de mes premières années d'assistantat.

A LA SOUS SECTION 56-01. Monsieur le Docteur Delbos, Madame le Docteur Nancy, Monsieur le Docteur Rouas, merci pour votre soutien au cours de ces dernières années et pour m'avoir intégré au sein de l'équipe de pédodontie me permettant d'exercer le plus beau des métiers : dentiste pour enfants.

A MES COLLEGUES HOPITALO-UNIVERSITAIRES ET MES ETUDIANTS. Merci à tous mes collègues PU-PH, MCU-PH, AHU et attachés, pour leur présence et leur soutien, tout au long de mon parcours en odontologie, mais également lors de mon assistantat et la réalisation de cette thèse. Soyez assurés de ma profonde estime. Je tiens à remercier tous mes étudiants qui me confortent chaque jour dans le chemin de vie professionnelle que je souhaiterais prendre.

A LA SFBD. Je tiens à remercier les membres de la SFBD, mais également de la SOP et du COMIDENT, pour m'avoir désignée lauréate en 2015 de la bourse Michel Degrange, qui a été un véritable honneur et une aide précieuse pour continuer mes travaux de Recherche. Je voudrais remercier plus particulièrement Madame le Professeur Grégoire pour sa bienveillance lors de la remise de ce prix, mais également Monsieur le Docteur Attal pour m'avoir proposé de décrire mes travaux dans la revue Biomatériaux Cliniques. Madame le Professeur Grosgeat, merci de m'avoir incité à candidater et pour vos précieux conseils.

A MES AMIS. Je tiens à remercier tous mes ami(e)s, **le gang des AHU (Camille, Elsa, Mathilde et Olivia)** pour nos soirées fil rouge et champagne, **mon trio de cœur (Elsa, Joana et Nathalie)** pour la plus belle et longue des amitiés, **les copains** (les Barous+1, David, Mariette, Lionel, Julien, JJ, Aurélie) pour les soirées retrouvailles.

A MA FAMILLE. Un grand merci à toute **la famille Biscay-Le Treut** pour m'avoir accueillie au sein de leur famille et m'avoir soutenu plus particulièrement lors de ces quatre dernières années. A toute la grande famille Aussel et Juanico, pour leur amour et leur présence depuis ma naissance. Merci à la famille Quetin, pour tous les agréables instants passés en famille ensemble. Merci, à Claude, pour sa bienveillance à mon égard. Merci à **Céline, Guillaume, Mika** et les **p'tits loups** pour tous ces beaux moments passés ensemble et nos débats cocasses sur le chocolat. Merci à **Delphine** pour avoir été ma sœur de cœur. Merci à **Josette et Jean-Pierre**, pour m'avoir toujours accueillie comme leur propre fille et m'avoir donnée le bonheur dont j'avais besoin.

A MES PARENTS. A toi **Papa**, que j'ai connu si peu mais qui sera à jamais dans mon cœur. A toi **Maman**, qui a connu les débuts de cette thèse et qui m'a toujours poussée à aller plus loin. J'aurai aimé t'avoir à mes côtés aujourd'hui et voir dans tes yeux la fierté et l'amour, que tu m'as toujours portés. Tu m'as toujours tout donné, en faisant passer mes rêves avant tout. Aujourd'hui, le parcours que j'ai effectué, je te le dois maman. Cette thèse n'est que le reflet de ton amour et de ton éducation. Même si tu n'es pas là pour cette soutenance, je sais que vous serez présents au plus proche de moi avec papa dans mon tout mon cœur et dans toute mon âme et ce pour toujours. Je vous aime.

A MON MARI. Grâce à toi, j'ai vu une belle amitié se transformer en la plus belle histoire d'amour. Au cours de cette thèse, nous nous sommes dit oui pour le meilleur et le pire. Certes, nous avons vécu des instants difficiles, mais aussi des moments exceptionnels, qui grâce à toi prennent le dessus sur tout. Tu as le don de m'apaiser quand je suis en colère, me faire relativiser les choses (même si je ne le montre pas toujours), m'aider dans mon travail et croire en moi chaque jour. Tu as cette capacité à trouver les mots et à être à l'écoute des gens, faisant d'ailleurs de toi un médecin exceptionnel à l'écoute de ces patients. Je suis fière de t'avoir comme mari. Mes soirées avec toi et notre petit Athos, au creux du plaid, sont de vrais moments de plaisir qui m'ont permis d'aboutir ce travail de thèse mais surtout qui m'apportent le bonheur quotidiennement. **Pascal**, je tiens à te dédier cette thèse, avec tout mon amour.

TABLE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	12
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1 INGENIERIE VASCULAIRE	16
1.1 PAROI ARTERIELLE NORMALE ET PRINCIPALES PATHOLOGIES VASCULAIRES	16
1.1.1 Physiologie de la paroi artérielle normale	16
1.1.2 Principales pathologies vasculaires	17
1.1.2.1 Athérosclérose	18
1.1.2.2 Thrombose	19
1.1.2.3 Anévrisme	20
1.1.2.4 Dissection aortique	20
1.2 SUBSTITUTION VASCULAIRE	21
1.3 INGENIERIE TISSULAIRE APPLIQUEE AU DOMAINE VASCULAIRE	23
1.3.1 Etat de l'art de l'ingénierie vasculaire	23
1.3.2 Stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire	25
1.3.2.1 Concept du « scaffold-guide »	26
1.3.2.2 Utilisation de matrices décellularisées	28
1.3.2.3 Stratégies de l'auto-assemblage	30
1.3.3 Composante cellulaire en ingénierie vasculaire	32
1.3.3.1 Cellules souches pluripotentes	34
1.3.3.2 Cellules souches adultes multipotentes	36
1.3.3.3 Progéniteurs endothéliaux	37
1.3.3.4 Péricytes	41
1.3.4 Signaux et bioréacteurs : maturation des substituts vasculaires	41
1.3.4.1 Transport de nutriments et facteurs de croissance	41
1.3.4.2 Contraintes mécaniques	42
1.3.4.3 Bioréacteurs	42
2 CAHIER DES CHARGES DES SUBSTITUTS VASCULAIRES	45
2.1 PROPRIETES MECANIQUES REQUISES POUR UN SUBSTITUT VASCULAIRE	45
2.1.1 Etanchéité	49
2.1.2 Résistance à la suture	50
2.1.3 Résistance à la traction	52
2.1.3.1 Résistance à la traction longitudinale	52
2.1.3.2 Résistance à la traction circonférentielle	55

2.1.4	Compliance	56
2.1.4.1	Résistance à l'éclatement	58
2.2	PROPRIETES BIOLOGIQUES REQUISES POUR UN SUBSTITUT VASCULAIRE	59
2.2.1	Substitut vasculaire et hémocompatibilité	62
2.2.1.1	Exploration de l'hémostase	63
2.2.1.2	Exploration des éléments figurés du sang	73
2.2.1.3	Exploration de la cascade du complément	75
2.2.2	Substituts vasculaires et inflammation	81
2.2.2.1	Phases de l'inflammation après implantation du biomatériau	83
2.2.2.2	Influence du biomatériau sur l'inflammation	90
2.2.3	Stratégies pour améliorer l'hémocompatibilité et contrôler l'inflammation	94
2.2.3.1	Modification de surface pour améliorer l'hémocompatibilité	95
2.2.3.2	Modification de surface pour favoriser l'endothélialisation	99
2.2.3.3	Modification génétique pour favoriser l'endothélialisation	102
3	HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE ET INGENIERIE VASCULAIRE	103
3.1	GENERALITES SUR LE CHITOSANE	103
3.1.1	Définition et structure du chitosane	103
3.1.2	Production de chitosane	103
3.2	PROPRIETES DU CHITOSANE	106
3.2.1	Propriétés physico-chimiques du chitosane	106
3.2.1.1	Degré d'acétylation (DA)	106
3.2.1.2	Masse moléculaire (MM)	106
3.2.1.3	Méthodes de caractérisation du chitosane	107
3.2.2	Propriétés mécaniques du chitosane	107
3.2.3	Propriétés biologiques du chitosane	107
3.2.3.1	Biocompatibilité	107
3.2.3.2	Biodégradabilité	108
3.2.3.3	Propriétés antibactériennes	109
3.2.4	Applications médicales du chitosane	109
3.3	HYDROGELS DE CHITOSANE ET INGENIERIE VASCULAIRE	110
3.3.1	Production d'hydrogels de chitosane	110
3.3.1.1	Définition d'un hydrogel	110
3.3.1.2	Hydrogels de chitosane	110
3.3.2	Hydrogels de chitosane en ingénierie vasculaire	112
	OBJECTIFS	114
	RESULTATS	118

1	EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE	119
1.1	INTRODUCTION	119
1.2	ARTICLE : CHITOSAN-BASED HYDROGELS FOR DEVELOPING A SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFT - <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> EVALUATION	121
1.3	CONCLUSIONS	122
2	EVALUATION DES PROPRIETES MECANIQUES DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE	124
2.1	INTRODUCTION	124
2.2	ARTICLE : <i>IN VITRO</i> MECHANICAL PROPERTY EVALUATION OF CHITOSAN-BASED HYDROGELS INTENDED FOR VASCULAR GRAFT DEVELOPMENT	125
2.3	CONCLUSION	126
3	ETUDE DE LA BIOINTEGRATION DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE POUR DES APPLICATIONS VASCULAIRES : INTERFACE CHITOSANE/ CELLULES VASCULAIRES / TISSU HÔTE	127
3.1	PROJET D'ARTICLE: CELL AND TISSUE RESPONSE AT THE INTERFACE WITH CHITOSAN HYDROGEL <i>IN VITRO</i> AND <i>EX VIVO</i>	127
4	MISE AU POINT D'UNE METHODE DE SUIVI DES EPCS EN INGENIERIE VASCULAIRE	128
4.1	INTRODUCTION	128
4.2	ARTICLE : LABELING AND QUALIFICATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS FOR TRACKING IN TISSUE ENGINEERING: AN <i>IN VITRO</i> STUDY.	129
4.3	CONCLUSION	130
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		131
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES		135
1	COMMUNICATIONS ORALES	136
1.1	COMMUNICATIONS ORALES INTERNATIONALES	136
1.2	COMMUNICATIONS ORALES NATIONALES	136
2	COMMUNICATIONS PAR AFFICHE	136
2.1	COMMUNICATIONS PAR AFFICHE INTERNATIONALES	136
2.2	COMMUNICATIONS PAR AFFICHE NATIONALES	137
BIBLIOGRAPHIE		138

Table des abréviations

- **CE** : Cellule Endothéliale
- **CFH** : Complement Factor H
- **CFI** : Complement Factor I
- **CML** : Cellule Musculaire Lisse
- **CSM** : Cellule Souche Mésoenchymateuse
- **DAF** : Decay Accelerating Factor
- **DAMP** : Danger-Associated Molecular Pattern
- **EPC** : Endothelial Progenitor Cells
- **EPCR** : Endothelial Protein C Receptor
- **ePTFE** : expanded PolyTetraFluoroEthylene
- **FT** : Facteur Tissulaire
- **HGF** : Hepatocyte Growth Factor
- **IFN- γ** : InterFéroN Gamma
- **IH** : Index HémoLytique
- **IL** : Interleukine
- **IPSC** : Induced Pluripotent Stem Cell
- **ITA** : Interne Thoracic Artery
- **MCP** : Membrane Cofactor Protein
- **MEC** : Matrice Extra Cellulaire
- **MMP** : Matrix Métalloproteinases
- **NO** : Nitric oxyde
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

- **PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor
- **PEG** : Polyéthylène Glycol
- **PEO** : Polyéthylène Oxyde
- **PET** : PolyEthylène Téréphtalate
- **PF4** : Platelet Factor 4
- **PNN** : Polynucléaire Neutrophile
- **SV** : Saphenous Vein
- **TCA** : Temps de Céphaline Activée
- **TESA** : Tissue Engineering Self Assembly
- **TFPI** : Tissue Factor Pathway Inibithor
- **TM** : Thrombomoduline
- **TP** : Temps de Prothrombine
- **TT** : temps de thrombine
- **VEGF** : Vacular Endothelial Growth Factor

Table des illustrations

Figure 1 : Structure histologique d'un vaisseau.....	16
Figure 2 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi vasculaire	17
Figure 3 : Développement d'une plaque d'athérome	18
Figure 4 : Thrombose artérielle (a) et veineuse (b)	19
Figure 5 : Anévrisme artériel	20
Figure 6 : Dissection aortique via une déchirure de l'intima (a) ou une rupture du vasa vasorum (b).....	21
Figure 7 : Substituts vasculaires actuellement utilisés en clinique	22
Figure 8 : Taux de perméabilité de substituts vasculaires biologiques et synthétiques	23
Figure 9 : Etapes de l'ingénierie tissulaire	24
Figure 10 : Triade de l'ingénierie tissulaire.....	25
Figure 11 : Elaboration de la composante matricielle selon l'approche du "scaffold-guide"	26
Figure 12 : Elaboration de la composante matricielle par obtention de matrices décellularisées	29
Figure 13 : Elaboration de la composante matricielle par auto-assemblage.....	30
Figure 14 : Concept du Tissue Engineering Self Assembly	31
Figure 15 : Cellules utilisées en ingénierie tissulaire	33
Figure 16 : Différenciation in vitro des cellules souches pluripotentes en cellules vasculaires.....	34
Figure 17 : Modélisation de l'utilisation des iPSCs pour des applications cliniques.....	36
Figure 18 : Marqueurs de surface des EPCs précoces et tardifs	38
Figure 19 : Nomenclature et progéniteurs endothéliaux	39
Figure 20 : Rôle des EPCs dans la réparation vasculaire	40
Figure 21 : Différentes stratégies pour la maturation des substituts vasculaires	43
Figure 22 : Exigences requises pour la matrice en ingénierie vasculaire.....	45
Figure 23 : Organisation du collagène dans les 3 tuniques de l'aorte.....	46

Figure 24 : Comportement mécanique du ePTFE	47
Figure 25 : Influence de l'âge sur la compliance des vaisseaux.....	49
Figure 26 : Evaluation de résistance à la suture par test de traction	50
Figure 27 : Propriétés mécaniques de différents produits d'ingénierie vasculaire.....	51
Figure 28 : Dispositif pour tester la résistance à la traction longitudinale.....	52
Figure 29 : Courbe contrainte-déformation calculé à partir d'un essai de traction longitudinale	53
Figure 30 : Courbes contrainte-déformation.....	54
Figure 31 : Dispositif pour tester la résistance à la traction longitudinale.....	55
Figure 32 : Courbes contrainte-déformation obtenues pour les 3 tuniques (adventice, média, intima).....	56
Figure 33 : Relation compliance / perméabilité des substituts vasculaires.....	57
Figure 34 : Evolution de la compliance en fonction de la localisation (A) et du substitut utilisé (B)	57
Figure 35 : Cascade des évènements biologiques possibles après implantation d'un biomatériau	60
Figure 36 : Interaction hémostasie –inflammation	61
Figure 37 : Mécanismes plaquettaires lors de l'hémostasie primaire.....	63
Figure 38 : Initiation et propagation de la coagulation.....	66
Figure 39 : Formation du thrombus	69
Figure 40 : Régulation de l'hémostasie par l'endothélium.....	70
Figure 41 : Mécanisme de production du NO par les cellules endothéliales	71
Figure 42 : Régulation de la cascade de la coagulation par les leucocytes.....	73
Figure 43 : Système du complément	76
Figure 44 : Molécules de régulation dans la cascade d'activation du complément.....	78
Figure 45 : Relations entre hémostasie et complément.....	80
Figure 46 : Différents types cellulaires impliquées dans la cicatrisation tissulaire au cours du temps	81
Figure 47 : Mécanismes immunitaires mis en jeu après implantation d'un biomatériau in vivo.....	82
Figure 48 : Formation d'une matrice provisoire à la surface du biomatériau	83
Figure 49 : Inflammation aigue à la surface du biomatériau.....	85
Figure 50 : Inflammation chronique à la surface du biomatériau.....	86

Figure 51 : Polarisation macrophagique au cours de l'inflammation	87
Figure 52 : Principaux marqueurs utilisés chez la souris pour identifier le phénotype macrophagique.....	88
Figure 53 : Formation d'un granulome à corps étranger à la surface du biomatériau	89
Figure 54 : Propriétés des matériaux influençant l'inflammation.....	90
Figure 55 : Influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux sur l'inflammation.....	91
Figure 56 : Régulation de l'inflammation par la cellule endothéliale.....	93
Figure 57 : Modifications de surface et endothélialisation des biomatériaux en ingénierie vasculaire.....	94
Figure 58 : Stratégies pour modifier l'état de surface des matériaux	96
Figure 59 : Représentation de la structure chimique de chitosane	103
Figure 60 : Purification de la chitine.....	104
Figure 61 : Désacétylation de la chitine	105
Figure 62 : Hydrogels physiques (a), chimiques (b) ou associés à des ions métalliques (c).....	111
Figure 63 : Production d'hydrogels physiques de chitosane Ch5 et Ch10	115
Figure 64 : Objectifs interconnectés du travail de thèse	116
Figure 66 : Hydrogels physiques de chitosane sous forme planaire (A) et tubulaire (B) cellularisés.....	130
Figure 67 : Résultats interconnectés du travail de thèse.....	132

INTRODUCTION GENERALE

Selon l'OMS, les pathologies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité dans les pays développés. Le traitement peut être chirurgical et consiste à ponter l'obstacle athéromateux ou remplacer le vaisseau natif lésé. Le chirurgien doit alors avoir recours à des substituts vasculaires. Le substitut autologue artériel ou veineux, «gold standard», n'est pas toujours disponible. L'alternative est donc d'utiliser des substituts synthétiques. Ils sont couramment utilisés pour des vaisseaux de gros calibre, mais à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques pour les vaisseaux de petit calibre. Cela s'explique par une faible compliance des substituts et une non endothélialisation de leur surface luminale, induisant thrombose et hyperplasie intimale. Ces substituts doivent répondre à un cahier des charges strict et posséder des propriétés biologiques et mécaniques adaptées. Ces substituts ne doivent activer ni le système de la coagulation ni celui du complément, doivent être capables de résister aux contraintes exercées sur les parois vasculaires et de s'adapter aux variations de pression sanguine. Actuellement, le biomatériau idéal n'existe pas, mais fait l'objet de nombreuses recherches. L'une des stratégies est la réalisation de substituts issus de l'ingénierie tissulaire.

Par définition, l'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire, au carrefour des sciences de l'ingénieur et de la biologie ayant pour but de développer des substituts biologiques afin de restaurer ou d'améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe. On parle de triade de l'ingénierie tissulaire, car elle fait appel à trois éléments fondamentaux : un biomatériau d'origine synthétique ou biologique, dégradable ou non, des cellules réparatrices et des signaux (hypoxie, contraintes mécaniques, morphogènes, *etc.*). Ces dernières années, l'ingénierie tissulaire a connu un essor important notamment grâce aux progrès accomplis dans la compréhension des cellules souches et dans le développement de matériaux. Les vaisseaux font partie des tissus pour lesquels l'ingénierie tissulaire s'est considérablement développée, de la recherche fondamentale jusqu'aux essais cliniques.

L'objectif général de ce travail était, tout d'abord, d'élaborer un substitut vasculaire artériel de petit calibre, produit d'ingénierie vasculaire. Nous avons utilisé comme biomatériau des hydrogels physiques de chitosane. Le chitosane semblait une matrice de choix car il est déjà utilisé pour de nombreuses applications médicales et pharmaceutiques. De plus, il présente de nombreux avantages : biocompatibilité, biodégradabilité, bioadhésion, propriétés antibactériennes et bioactivité. Le chitosane est un polysaccharide et polymère naturel avec une structure proche de celle de l'acide hyaluronique. Il est obtenu principalement à partir de crustacés ou de champignons. L'objectif secondaire était de valider pré-cliniquement ces hydrogels physiques de chitosane.

Ce manuscrit est décomposé en 4 parties :

- La première partie de cette thèse correspond à une revue de la bibliographie. Elle décrit des notions importantes et actualisées permettant une meilleure compréhension de ce travail de thèse. Elle décrit notamment le concept d'ingénierie vasculaire, les propriétés requises pour un substitut

vasculaire constituant le cahier des charges pour produire une matrice d'ingénierie vasculaire et le chitosane, matrice choisie dans le cadre de ce travail.

- La deuxième partie expose l'objectif général de cette thèse, à savoir la production et la validation pré-clinique d'un produit d'ingénierie vasculaire à base d'hydrogel de chitosane. La validation pré-clinique est recherchée en évaluant les propriétés biologiques, les propriétés mécaniques et enfin la l'intégration des hydrogels de chitosane chez le receveur.

La troisième partie expose les résultats issus du travail de ce doctorat sous forme d'articles : 3 publiés et un projet d'article. Le premier article (publié) évalue les propriétés biologiques des hydrogels de chitosane pour l'ingénierie vasculaire. Le second (publié) détermine les propriétés mécaniques des hydrogels de chitosane dans le cadre d'application vasculaire. Le troisième est un projet d'article qui s'intéresse à l'interface du chitosane avec la cellule endothéliale et le tissu d'implantation. Enfin, un dernier article (publié), concerne un projet parallèle et complémentaire à ce travail de thèse. Nous avons mis au point et évalué la fiabilité d'un outil de suivi pour les cellules utilisées en ingénierie vasculaire. Nous avons ainsi évalué l'impact de l'infection des progéniteurs endothéliaux par un vecteur lentiviral contenant le gène codant pour la protéine Td Tomato. Le but était de définir si cette technique pouvait être utilisée de façon fiable dans le suivi des progéniteurs endothéliaux en ingénierie vasculaire. Chaque article fait l'objet d'une discussion.

- La dernière partie correspond à la conclusion générale de ces travaux en abordant les forces et les faiblesses de cette étude. Elle s'ouvre sur les perspectives de ce travail.

Ce travail a été principalement conduit dans le cadre d'un projet de recherche soutenu par l'ANR TECSAN 2010 : CHITOART et a également été financé par une bourse de recherche (Michel Degrange). La continuité de ces travaux sera réalisée grâce à l'obtention d'un appel d'offre de la Fondation de l'Avenir (2017).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 INGENIERIE VASCULAIRE

1.1 **Paroi artérielle normale et principales pathologies vasculaires**

1.1.1 *Physiologie de la paroi artérielle normale*

La paroi d'une artère normale est constituée de trois tuniques et dont la paroi interne est au contact du flux sanguin (*Figure 1*) (Patel and Honore 2010). De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue: l'adventice, la média et l'intima. L'adventice (ou tunique externe) est composée de tissus de connexion en lien avec les tissus environnants et permettant l'innervation et la vascularisation des gros vaisseaux. Cet adventice contient aussi des vaisseaux " propres ", appelés *vasa vasorum*, destinés à la vascularisation de la paroi. On admet que le tiers interne de la paroi se nourrit directement à partir du sang contenu dans la lumière et que le tiers externe, est irrigué par ces *vasa vasorum*. La média est constituée principalement de cellules musculaires lisses (CMLs) et de matrice extracellulaire (MEC), responsables de la vasomotricité du vaisseau. Enfin, l'intima (ou tunique interne), la couche la plus interne, est un sous-endothélium supportant une monocouche de cellules endothéliales (CEs) en contact direct avec le flux sanguin. L'endothélium joue un rôle clef dans la régulation de l'hémostase, de l'inflammation, de la vasorégulation et de l'angiogenèse.

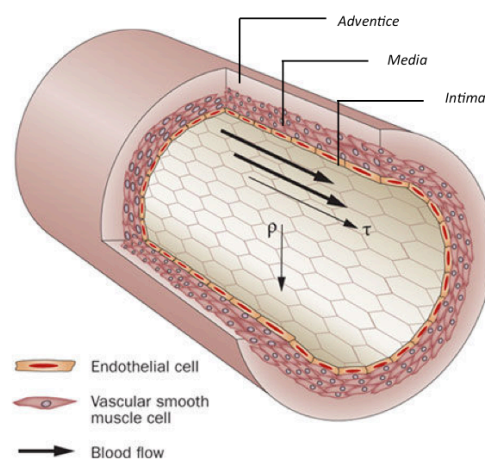


Figure 1 : Structure histologique d'un vaisseau

D'après (Patel and Honore 2010)

Les vaisseaux sanguins sont exposés à trois types de contraintes mécaniques : l'étirement cyclique, la pression transmurale et les contraintes de cisaillement (*Figure 2*) (Ohashi and Sato 2005).

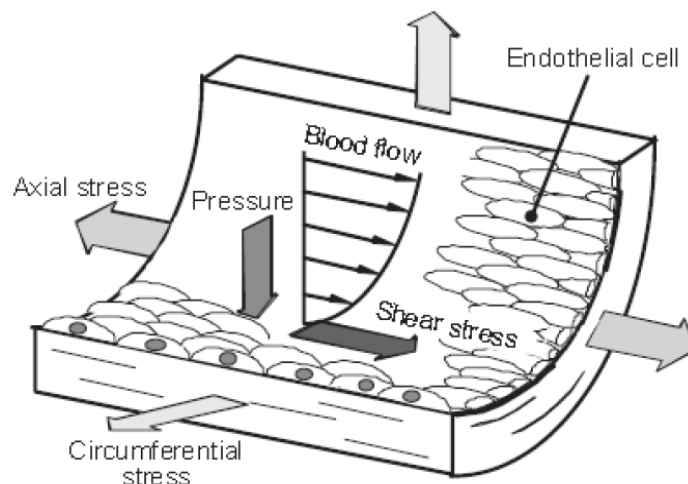


Figure 2 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi vasculaire

(Ohashi and Sato 2005)

L'étirement cyclique (ou circonférentiel) est dû à la pression et à la pulsativité du sang. Il se traduit par une distension de la paroi induite par l'augmentation de la tension pariétale (T). Il est fonction de l'épaisseur du vaisseau, de sa teneur en élastine et collagène et de la capacité contractile des cellules musculaires lisses. La pression transmurale (P) correspond à la force cyclique normale exercée par la pression sanguine sur la paroi vasculaire. Cette force agit perpendiculairement à la paroi et sur la contraction des cellules musculaires lisses. La loi de Laplace lie la tension pariétale et la pression sanguine, selon la formule : $T = p \times r$, où r correspond au rayon du vaisseau. La contrainte de cisaillement (τ) est une force latérale qui agit sur l'endothélium. Il s'agit de la force de friction due à l'écoulement du sang, exercée sur la face apicale des CEs et des CMLs du fait du flux interstitiel. In vivo, les CEs peuvent être exposées à un flux laminaire ou turbulent. Le flux laminaire est généralement retrouvé au niveau des portions vasculaires droites et permet un alignement des CEs dans le sens du flux. Le flux turbulent est plutôt retrouvé au niveau des anastomoses et des bifurcations et des sténoses. Les CEs conservent leur morphologie pavimenteuse mais ne présentent pas d'orientation particulière. Le flux turbulent est considéré comme une source d'agression pour les CEs.

1.1.2 Principales pathologies vasculaires

Des vaisseaux lésés ou obstrués sont à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, la thrombose, la dissection ou l'anévrisme. Les thérapeutiques mises en jeu peuvent alors nécessiter l'utilisation de substituts vasculaires.

1.1.2.1 Athérosclérose

L'athérosclérose ou athérome est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme " une association de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaires, avec remaniements de la média". Elle correspond au développement d'une plaque athéromateuse au sein de la paroi vasculaire, conduisant à l'obstruction partielle (sténose) ou totale (obstruction) de la circulation sanguine. Longtemps décrite comme une pathologie résultant de l'accumulation passive de lipides dans la paroi vasculaire vieillissante, elle est actuellement reconnue comme une maladie inflammatoire chronique où les systèmes immunitaires innés et adaptatifs ont des rôles clés (Skeoch and Bruce 2015). Les phénomènes initiaux de l'athérosclérose dépendent principalement d'anomalies de l'endothélium (*Figure 3*) (Libby *et al.* 2011).

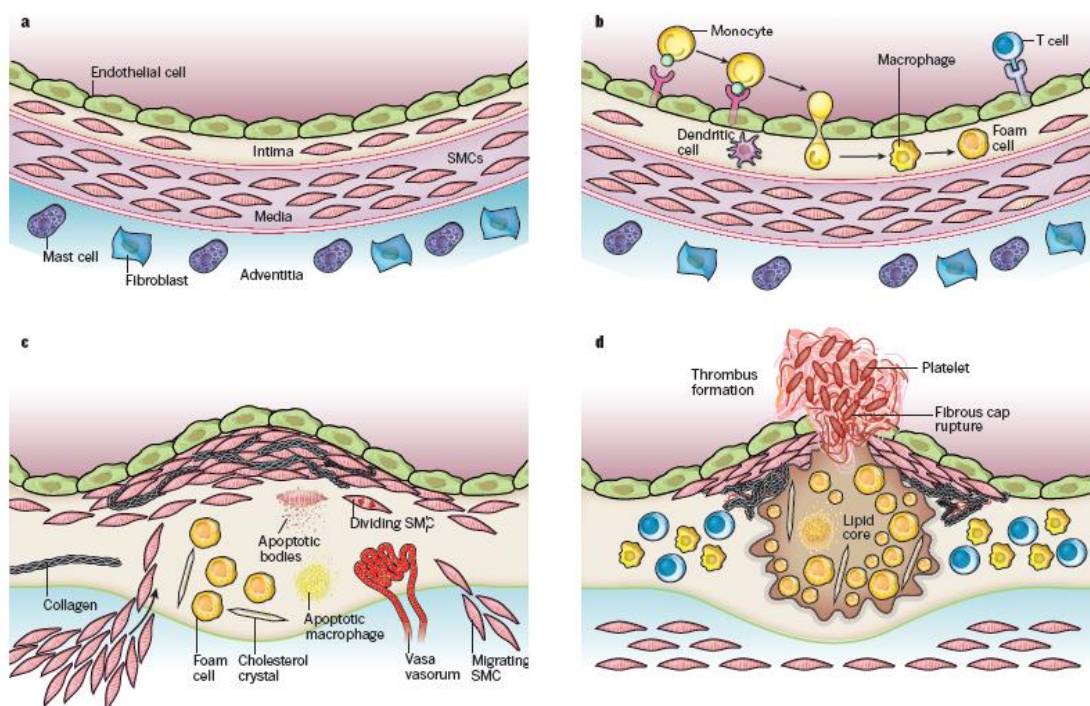


Figure 3 : Développement d'une plaque d'athérome

(Libby *et al.* 2011)

L'athérogénèse débute par l'accumulation de lipoprotéines dans l'intima (*Figure 3a*), où elles sont oxydées (*Figure 3b*), induisant l'activation des cellules endothéliales (CEs) qui expriment des récepteurs d'adhésion (V-CAM, I-CAM,...). Cette activation entraîne l'adhésion des leucocytes et des monocytes qui pénètrent dans l'espace sous-endothélial où ils se différencient en macrophages

puis en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydés. Les macrophages et les lymphocytes, infiltrant la lésion athéromateuse, entretiennent une réaction inflammatoire chronique. Les CMLs passent d'un phénotype différencié « contractile » à un phénotype « sécrétoire ». Elles migrent de la média vers l'intima où elles prolifèrent et sécrètent du collagène, des fibres élastiques et des protéoglycanes qui, avec les macrophages, assurent la stabilité de la plaque (*Figure 3c*). Les segments athéroscléreux peuvent alors évoluer vers une thrombose, une sténose ou un anévrisme (*Figure 3d*).

1.1.2.2 Thrombose

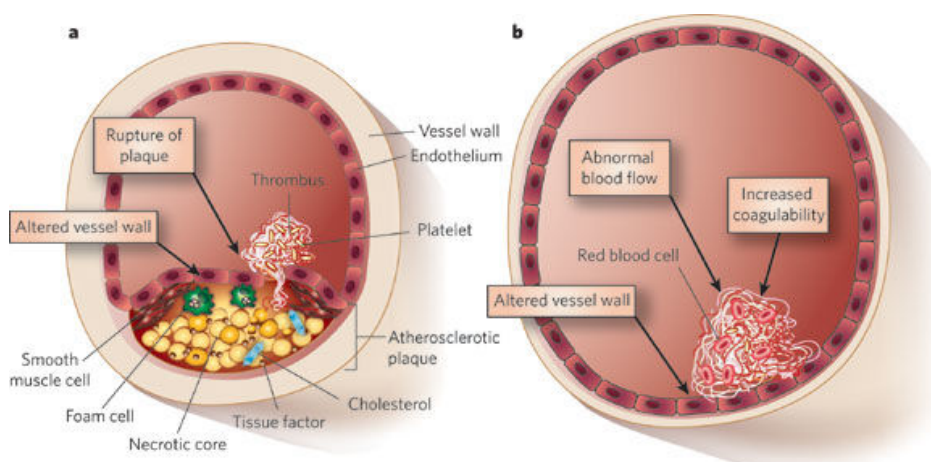


Figure 4 : Thrombose artérielle (a) et veineuse (b)

(Mackman 2008)

La thrombose correspond à la formation d'un caillot sanguin, ou thrombus, susceptible d'obturer intégralement la lumière du vaisseau et bloquant le flux sanguin. Un thrombus est adhérent à la paroi vasculaire et est principalement constitué de plaquettes, de fibrine et de globules rouges. La thrombose artérielle aiguë est la cause principale des infarctus du myocarde et est responsable d'environ 80% des accidents vasculaires cérébraux. La physiopathologie de la thrombose artérielle diffère de celle de la thrombose veineuse (*Figure 4*) (Mackman 2008). Le principal déclencheur de la thrombose artérielle est la rupture d'une plaque athérosclérotique, impliquant une perturbation de l'endothélium et la libération des constituants de la plaque dans la lumière du vaisseau sanguin (*Figure 4a*). Dans la thrombose veineuse, l'endothélium reste intact, mais sa surface peut être modifiée suite à différents facteurs (flux sanguin anormal, propriétés altérées du sang, etc.) et ainsi acquérir des propriétés procoagulantes conduisant à la thrombose (*Figure 4b*).

1.1.2.3 Anévrisme

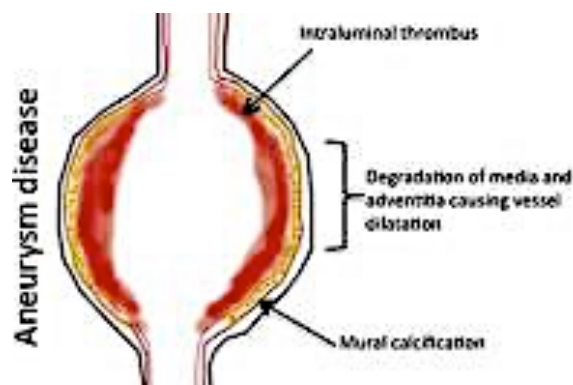


Figure 5 : Anévrisme artériel

(Forsythe et al. 2016)

Un anévrisme artériel est une dilatation focale et permanente de l'artère avec une perte du parallélisme de ses parois et dont le diamètre est supérieur à une fois et demi le diamètre d'amont. Outre le risque de rupture et donc d'hémorragie, l'anévrisme induit la formation de thrombus par la perturbation du flux sanguin (*Figure 5*) (Forsythe et al. 2016). Les anévrismes de l'aorte abdominale sont les plus fréquents. L'anévrisme peut être fusiforme lorsque la dilatation est symétrique et circonférentielle ou sacciforme si la dilatation se restreint à un segment de la paroi. Certains facteurs de risque de l'anévrisme (tabagisme, hypertension, âge avancé) ont clairement été identifiés. Certains processus biologiques (néovascularisation, inflammation, microcalcifications...) peuvent également conduire indirectement à la formation d'anévrisme. La combinaison des facteurs de risque liés aux patients et des processus biologiques conduit à une expansion de l'anévrisme et à une vulnérabilité à la rupture (Forsythe *et al.* 2016).

1.1.2.4 Dissection aortique

La dissection aortique se définit comme un accident vasculaire au cours duquel le courant sanguin quitte le chenal aortique normal et, au travers d'une déchirure intimale, pénètre entre la couche interne et la couche externe de la média, constituant un faux chenal. Dans la dissection aortique, la rupture intimale est primitive, permettant ainsi au sang de s'infiltrer dans la média (*Figure 6a*). La dissection aortique peut également être secondaire à un hématome ou à un clivage de la média notamment par rupture du *vaso vasorum* (vaisseaux de très petit calibre cheminant dans l'adventice pour assurer la vascularisation de la paroi artérielle) (*Figure 6b*) (Nienaber *et al.* 2016).

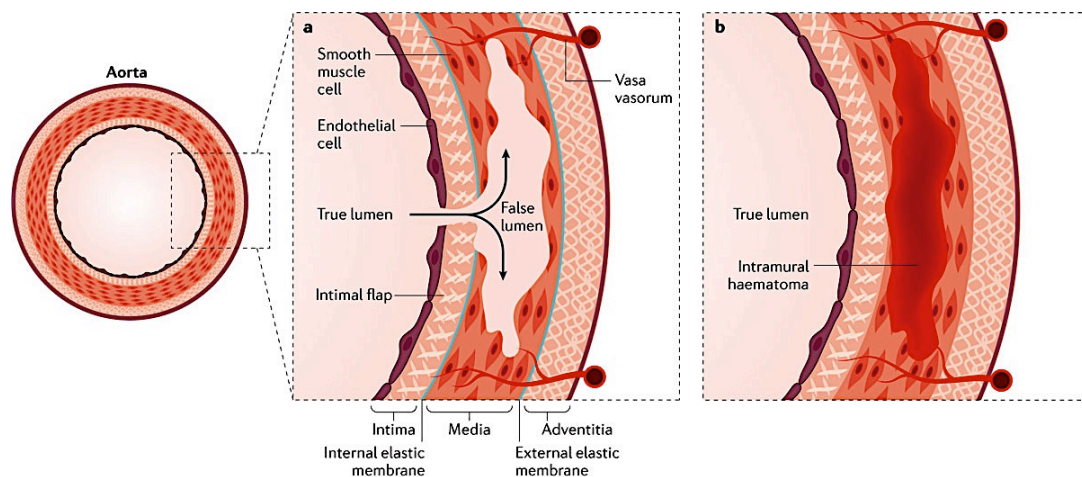


Figure 6 : Dissection aortique via une déchirure de l'intima (a) ou une rupture du vasa vasorum (b)

(Nienaber et al. 2016)

1.2 Substitution vasculaire

Les pathologies cardiovasculaires restent la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux. Selon des études statistiques, plus de 17,3 millions de personnes sont décédées suite à des pathologies cardiovasculaires en 2013, représentant 1 décès sur 4 dans le monde (Mozaffarian *et al.* 2016). Ce nombre devrait même atteindre les 23,6 millions d'ici 2030 (Mathers and Loncar 2006). Les pathologies cardiovasculaires constituent donc un véritable problème de santé publique. Actuellement, face aux atteintes de l'intégrité du système vasculaire, différentes thérapeutiques sont : les techniques curatives endovasculaires (angioplastie, endartériectomie et endoprothèse vasculaire ou stent) et les techniques réparatrices de pontage du segment artériel défectueux par un substitut vasculaire. Le choix du traitement s'effectue en fonction du stade d'évolution et de la gravité de la pathologie. La chirurgie de revascularisation s'applique schématiquement à deux types d'artères : des artères de gros et moyen calibre pour la chirurgie de l'ensemble de l'aorte et du carrefour aortique et des artères de petit calibre pour la chirurgie de revascularisation sous-inguinale, des artères viscérales et des troncs supra aortiques (Chakfe *et al.* 2004). Aujourd'hui, les chirurgiens ont à leur disposition des substituts vasculaires biologiques et synthétiques.

Parmi les substituts biologiques, les autogreffes veineuses et artérielles restent le « gold standard ». Les autogreffes artérielles (artère thoracique interne et radiale) présentent des perméabilités supérieures aux autogreffes veineuses (Athanasίου *et al.* 2011, Masden *et al.* 2012). Cependant, leur disponibilité reste limitée et les complications post-opératoires sont plus importantes (Pashneh-Tala *et al.* 2015). La veine saphène reste donc l'autogreffe la plus utilisée, plus particulièrement en raison de sa disponibilité plus importante (Harskamp *et al.* 2013). Cependant, les

substituts autologues peuvent induire une morbidité du site donneur et ne sont pas toujours disponibles, notamment en fonction de l'état de santé du patient (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

Des greffes synthétiques ont donc été développées comme alternatives aux autogreffes. Deux matériaux sont principalement utilisés : le polyéthylène téréphtalate (PET) ou Dacron® et le polytétrafluoroéthylène microporeux ou ePTFE (expanded-PTFE ; Gore-Tex®). Ces deux matériaux ont progressivement évolué et sont actuellement les meilleurs substituts possibles pour les artères de gros calibre (supérieur à 8 mm). Ils sont notamment utilisés comme substitut aorto-iliaque. Ils représentent aussi une alternative acceptable dans les cas fréquents d'absence ou d'inadéquation de substituts veineux autologues pour les artères de moyen calibre (6-8mm), comme pour la carotide ou l'artère fémorale. Généralement, le Dacron est utilisé pour les vaisseaux de gros calibres et le ePTFE pour des diamètres inférieurs. Pour les vaisseaux de petit calibre, ils sont utilisés uniquement, si aucun autre substitut autologue approprié n'est disponible (*Figure 7*) (Chlupac *et al.* 2009).

<i>Vascular substitute choice</i>	Large-caliber arteries (≥ 8 mm)	Medium-caliber arteries (6-8 mm)	Small-caliber arteries (≤ 6 mm)	Venous reconstructions
	Aorta, arch vessels, iliac and common femoral arteries	Carotid, subclavian, common femoral, visceral and above-the-knee arteries	Coronary, below-the-knee, tibial and peroneal arteries	Superior and inferior vena cava, ilio-femoral veins, portal vein, visceral veins
<i>1st choice</i>	Prosthesis (Dacron, ePTFE)	Prosthesis or autograft (equal)	Arterial or venous autograft	Saphenous spiral vein graft, deep venous autograft
<i>2nd choice</i>	Allograft, deep venous autograft	Prosthesis or autograft	Composite graft, vein interposition, prosthesis (ePTFE, Dacron), allograft, biosynthetic	Allografts, ePTFE, Dacron, biografts

Figure 7 : Substituts vasculaires actuellement utilisés en clinique

(Chlupac *et al.* 2009)

Pour les vaisseaux de petit calibre (inférieur à 6 mm), comme les artères coronaires, infra-inguinales ou infra-géniculées, les prothèses vasculaires synthétiques présentent des résultats de perméabilité à long terme insuffisants et largement inférieurs aux substituts autologues (Pashneh-Tala *et al.* 2015). En effet, pour des pontages coronariens, la perméabilité moyenne du PTFE est seulement de 32% à 2 ans et inférieur à 20% à 4 ans, alors que la perméabilité moyenne des substituts autologues (veines saphènes) est supérieure à 90% à 2 ans et supérieure à 80 % à 4 ans (*Figure 8*) (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

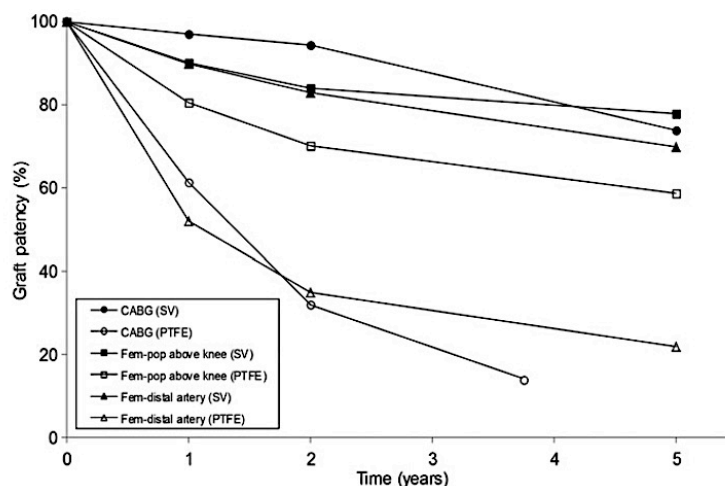


Figure 8 : Taux de perméabilité de substituts vasculaires biologiques et synthétiques

veine saphène [SV] et Polytétrafluoroéthylène [PTFE] après pontage de vaisseaux de petit calibre (pontage coronaire [CABG], pontages fémoraux)
(Pashneh-Tala *et al.* 2015)

Les substituts synthétiques présentent deux limites majeures pour le remplacement des vaisseaux de petit calibre : leurs propriétés mécaniques (faible compliance comparativement aux artères natives) et biologiques (non-recouvrement par un endothélium) (Vinatier *et al.* 2011). En effet, chez l'homme, les prothèses vasculaires ne permettent pas la régénération d'un endothélium, même après des décennies d'implantation. Bien que cela n'affecte pas la performance clinique des substituts de gros calibre, elle contribue de manière significative au taux d'échec élevé des substituts de petit calibre. En revanche, chez l'animal, il existe une endothélialisation spontanée des prothèses vasculaires. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux peut être critiquée, pour la validation de nouveaux substituts vasculaires (Zilla *et al.* 2007, Pashneh-Tala *et al.* 2015).

1.3 Ingénierie tissulaire appliquée au domaine vasculaire

1.3.1 Etat de l'art de l'ingénierie vasculaire

Comme décrit précédemment, le remplacement vasculaire de petit calibre présente actuellement des limites. La faible disponibilité des vaisseaux biologiques et la faible hémocompatibilité des substituts synthétiques nécessitent le développement de nouvelles technologies. Ainsi, le remplacement des vaisseaux de petit calibre est actuellement un axe de recherche très développé, où l'ingénierie tissulaire est en plein essor.

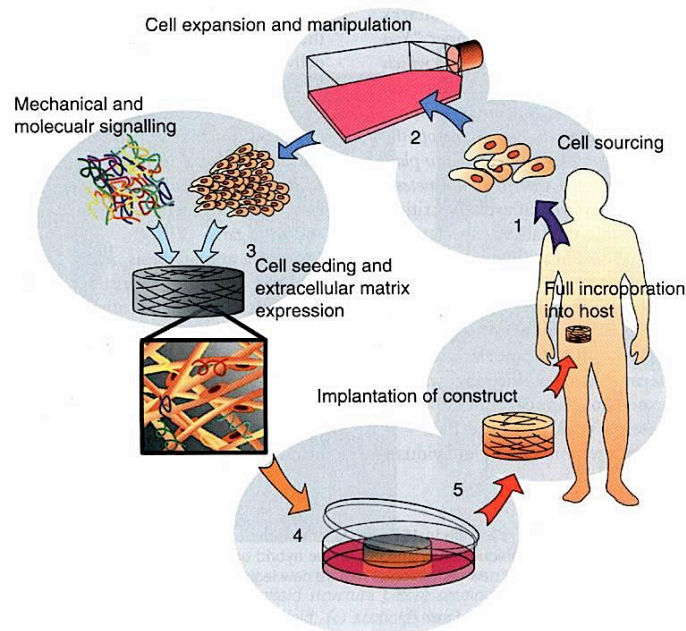


Figure 9: Etapes de l'ingénierie tissulaire

(Van Blitterswijk 2008)

Par définition, l'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire qui lie les principes d'ingénierie et de biologie pour le développement de substituts biologiques dans le but de restaurer ou d'améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe complet et ainsi pallier l'insuffisance des biomatériaux existants (Langer and Vacanti 1993). En ingénierie tissulaire, plusieurs étapes sont nécessaires. Les cellules peuvent être prélevées chez le patient, amplifiées et/ou différenciées en culture *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure peut alors être cultivée sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour stimuler la synthèse d'une matrice extracellulaire par les cellules elles-mêmes. Enfin, après maturation ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient. Il assure un support structural et mécanique aux cellules qui le coloniseront. Ce produit d'ingénierie tissulaire doit être résorbable afin de permettre son remplacement progressif par le tissu néoformé (*Figure 9*) (Van Blitterswijk 2008).

L'ingénierie tissulaire correspond à la coalescence de trois éléments : un biomatériau d'origine synthétique ou biologique, dégradable ou non, des cellules réparatrices et des signaux (hypoxie, contraintes mécaniques, morphogènes, *etc.*). On parle de triade de l'ingénierie tissulaire (*Figure 10*) (Simon-Yarza *et al.* 2017). Les produits issus de l'ingénierie vasculaire varient considérablement en termes de matériaux et de sources cellulaires.

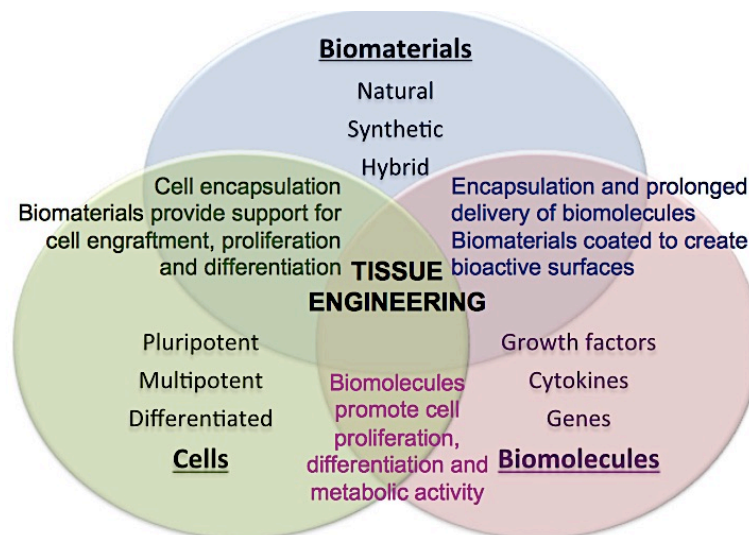


Figure 10 : Triade de l'ingénierie tissulaire

(Simon-Yarza et al. 2017)

Ces dernières années, des avancées ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes biologiques qui régissent la différenciation des cellules souches et dans le développement de matériaux en contrôlant leurs propriétés biologiques et physico-chimiques. Cependant, de nombreux verrous technologiques et réglementaires devront être levés avant que l'ingénierie tissulaire puisse passer du laboratoire à la clinique et entrer dans l'arsenal thérapeutique de la médecine régénératrice. Les vaisseaux font partie des tissus pour lesquels l'ingénierie tissulaire s'est considérablement développée, de la recherche fondamentale jusqu'aux essais cliniques. Dans l'acceptation la plus étendue de l'ingénierie tissulaire, plusieurs approches sont envisageables en ingénierie vasculaire : transplantation de cellules dans un territoire ischémié, fonctionnalisation de matrices par des cellules *in vitro* ou de revêtements pour recruter *in situ* les cellules adéquates. Un des objectifs majeur est d'obtenir des biomatériaux non thrombogènes et aux propriétés mécaniques adaptées au site d'implantation (Vinatier *et al.* 2011).

1.3.2 Stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire

Depuis l'émergence de l'ingénierie vasculaire, plusieurs approches ont été développées pour la production de substituts vasculaires. Les produits d'ingénierie vasculaire peuvent être classés en trois catégories selon les procédés d'obtention des matrices: le « scaffold-guide », les matrices biologiques décellularisées et l'auto-assemblage (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

1.3.2.1 Concept du « scaffold-guide »

L'approche du « scaffold-guide » consiste à prélever des cellules chez l'hôte (*Figure 11 ①*), qui sont ensuite isolées (*Figure 11 ②*) et amplifiées *in vitro* (*Figure 11 ③*). Deux approches peuvent ensuite être utilisées : soit les cellules sontensemencées dans une matrice, tel que du collagène ou de la fibrine et la matrice est ensuite façonnée dans un moule tubulaire (*Figure 11 ④i*); soit les cellules sontensemencées dans un échafaudage poreux (*Figure 11 ④ii*). La construction subit ensuite un processus de maturation dans un bioréacteur (*Figure 11 ⑤*). Le produit d'ingénierie vasculaire peut alors être implanté (*Figure 11 ⑥*). Dans le concept du « scaffold-guide », plusieurs types de matrices peuvent être utilisés en ingénierie vasculaire : synthétiques, biologiques et hybrides.

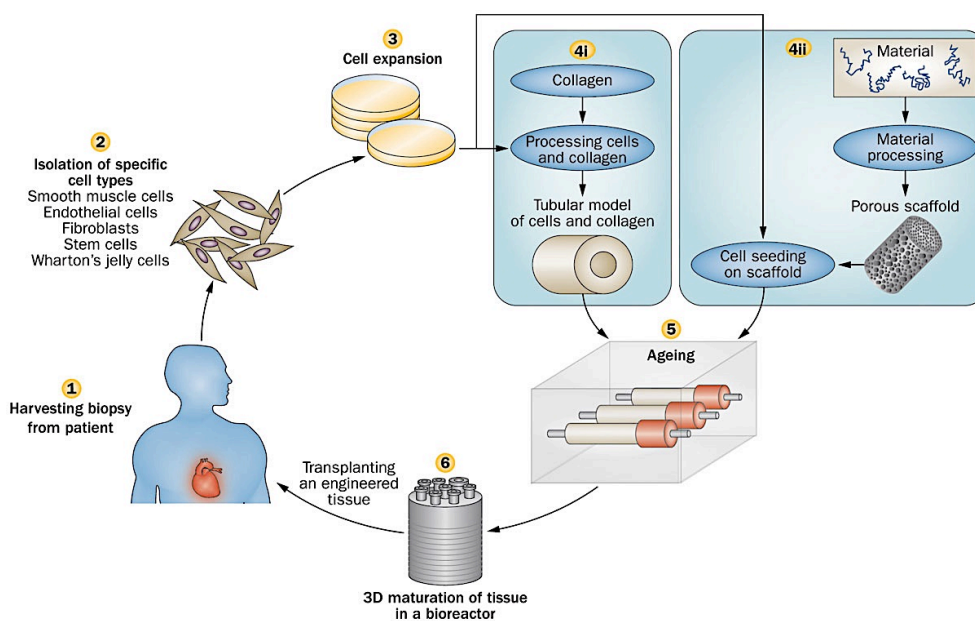


Figure 11 : Elaboration de la composante matricielle selon l'approche du "scaffold-guide"

(Seifu *et al.* 2013)

1.3.2.1.1 Matrices synthétiques

On distingue deux types de matrices synthétiques : les matrices non dégradables (PTFEE, Dacron®, polyuréthane) et les matrices dégradables (acide polyglycolique, polylactique, polycaprolactone et copolymères, *etc.*). Les matrices synthétiques les plus utilisées sont actuellement à base de *polyesters dégradables* composés de glycolide et de lactide et leurs copolymères (acide polyglycolique, acide poly-L-lactique et polycaprolactone) et à base de polyuréthanes (Tiwari *et al.* 2002). Niklason *et al.* sont les premiers auteurs à avoir élaborer des vaisseaux sanguins fonctionnels obtenus à partir d'acide polyglycolique. Le taux de perméabilité était de 100% après 4 semaines

d'implantation chez le porc et la résistance à l'éclatement était supérieure à 2000 mmHg (Niklason 1999). L'utilisation de *matrices synthétiques acellulaires* est également en cours d'exploration. Matsumura *et al.* ont élaboré des substituts vasculaires acellulaires à partir d'acides polyglycoliques, polylactiques et de polycaprolactones. Après 12 mois d'implantation, en remplacement de l'artère pulmonaire chez le chien, la matrice était résorbée et colonisée par des CEs et CMLs (Matsumura *et al.* 2013).

Les substituts synthétiques sont très attrayants en raison de leur coût abordable et de leur disponibilité (Zhang *et al.* 2007). De plus, leurs propriétés mécaniques, leur vitesse de dégradation, leur porosité et leurs microstructures peuvent être contrôlées et adaptées aux exigences requises (Seifu *et al.* 2013). Cependant, même si les polymères synthétiques sont prometteurs, leurs propriétés restent insuffisantes en terme de bioactivité (Yow *et al.* 2006). Certains auteurs ont donc proposé d'incorporer des peptides d'adhésion cellulaire à la surface du polymère (Ye *et al.* 2000). Un autre inconvénient des matrices à base d'acide polyglycolique concerne les produits de dégradation acides provenant de l'hydrolyse des matrices. Ils peuvent créer des zones à faible pH diminuant le taux de mitoses des CMLs et modifiant leur état de différenciation (Higgins *et al.* 2003).

1.3.2.1.2 Matrices naturelles

On distingue deux types de matrices naturelles : celles préparées à partir de composants de la MEC (collagène, élastine, fibrine, glycoprotéines d'adhérence, glycosaminoglycanes) et celles préparées à partir de protéines ou de polysaccharides naturels (hydrogels d'agarose, d'acide hyaluronique, de dextrane, chitosane, fibroïne de soie, *etc.*). Parmi les matrices naturelles préparées à partir de composants de la MEC, *la fibrine* est largement utilisée comme matrice en ingénierie vasculaire. Elle peut être produite à partir de fibrinogène polymérisé isolé du plasma sanguin d'un patient (Haisch *et al.* 2000). *La fibroïne de soie* est également une matrice de choix en ingénierie vasculaire. Lovett *et al.* ont démontré une biocompatibilité de matrices de fibroïne obtenues par électrospinning vis à vis de cellules vasculaires (Lovett *et al.* 2010). *Le collagène* peut aussi être utilisé comme matrice vasculaire afin de favoriser l'attachement cellulaire et même la prolifération des CEs. En ingénierie vasculaire le collagène de type I est le plus utilisé pour l'élaboration de matrices. Cependant, utilisé seul comme matrice, le collagène présente des propriétés mécaniques insuffisantes. Il est donc souvent associé. Marelli *et al.* ont démontré que l'adjonction de collagène à la fibroïne améliorait les propriétés mécaniques du substitut ainsi que l'adhésion et la prolifération cellulaire *in vitro* (Marelli *et al.* 2012). *L'élastine* peut également être associée au collagène pour améliorer les propriétés mécaniques (Buttafoco *et al.* 2006). *Les polysaccharides* peuvent également être utilisés pour des applications vasculaires, plus particulièrement sous forme d'hydrogels. Des substituts vasculaires ont été produits à partir d'hydrogels de polysaccharides. Ils ont été obtenus par

réticulation de pullulane et de dextrane, enveloppés d'un treillis de nylon (Chaouat *et al.* 2006). Cependant, malgré une bonne perméabilité après huit semaines d'implantation chez le rat, la surface luminale n'était que peu endothélialisée. Le chitosane est également un polysaccharide permettant l'élaboration de matrices en ingénierie vasculaire (Kong *et al.* 2012) (*cf. partie 3. Hydrogels physiques de chitosane et ingénierie vasculaire*).

Les matrices naturelles présentent des propriétés intéressantes en termes d'adhésion cellulaire et de biocompatibilité. Cependant, leurs propriétés mécaniques restent inférieures aux matrices synthétiques et aux vaisseaux natifs (Pashneh-Tala *et al.* 2015). L'utilisation de bioréacteurs pourrait toutefois améliorer les propriétés mécaniques (Syedain *et al.* 2011).

1.3.2.1.3 Matrices hybrides

De nombreux chercheurs associent polymères synthétiques et naturels, afin de pallier les insuffisances biologiques et mécaniques. Le collagène, la fibronectine (Dubey and Mequanint 2011), l'élastine (Lin *et al.* 2011) et la gélatine (Wang *et al.* 2009) sont employés pour améliorer l'adhésion cellulaire à des matrices synthétiques. Les polymères synthétiques sont utilisés pour assurer un renforcement mécanique des matrices et pallier les insuffisances des matrices naturelles. Ainsi, plusieurs auteurs ont associé le chitosane à des matrices synthétiques, notamment des matrices à base de polycaprolactone (Fukunishi *et al.* 2016) et à base d'acide polylactique (Yao *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2014).

1.3.2.2 Utilisation de matrices décellularisées

Les matrices décellularisées sont de plus en plus utilisées comme échafaudage en ingénierie vasculaire (*Figure 12*) (Pashneh-Tala *et al.* 2015). Pour les obtenir, du tissu est prélevé, généralement à partir d'une source animale. Il peut s'agir de vaisseaux sanguins, de sous-muqueuse intestinale (SIS) ou de membrane amniotique (*Figure 12*ⓐ). Le tissu est ensuite décellularisé à l'aide de divers procédés chimiques et/ou mécaniques (*Figure 12*ⓑ). Dans le cas d'un prélèvement de vaisseaux sanguins, un tube contenant uniquement de la MEC est directement obtenu (*Figure 12*ⓒ). Avec l'utilisation d'une membrane sous-muqueuse intestinale ou d'une membrane amniotique, une étape supplémentaire est nécessaire afin de mettre en forme ces tissus à l'aide d'un mandrin (*Figure 12*ⓓ). Après l'obtention de ces matrices tubulaires décellularisées, des cellules provenant du patient sontensemencées dans la matrice et dont la structure aboutira après maturation à l'obtention d'un produit d'ingénierie tissulaire (*Figure 12*ⓔ).

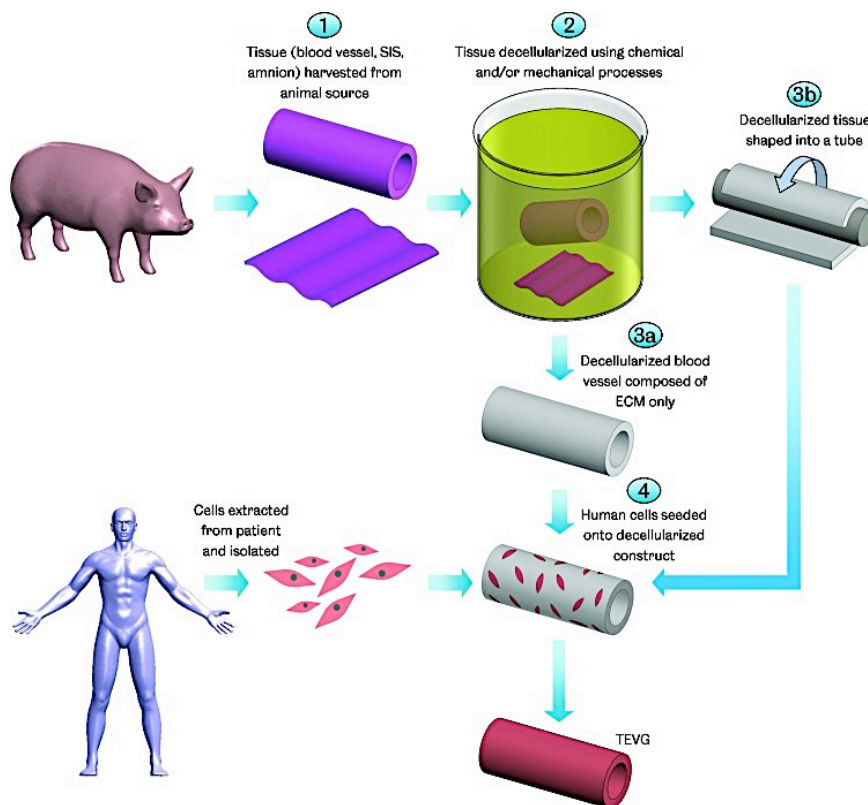


Figure 12 : Elaboration de la composante matricielle par obtention de matrices décellularisées

(Pashneh-Tala et al. 2015)

Différents moyens peuvent être utilisés pour décellulariser la matrice : agents chimiques (acides, bases, solutions hypo/hypertoniques, détergents, solvants), agents biologiques (enzymes, agents chélatants) et méthodes physiques (agitation, pression, abrasion) (Crapo *et al.* 2011). L'objectif de la décellularisation est d'obtenir un compromis entre l'obtention d'un degré élevé de décellularisation et la préservation de la structure et des propriétés de la MEC.

L'implantation d'une veine iliaque humaine décellularisée, puis cellularisée avec des cellules autologues, a récemment été réalisée (Olausson *et al.* 2012). Ce substitut a été implanté chez une enfant de 10 ans dans le but de contourner l'obstruction de la veine porte extra-hépatique. La veine a été décellularisée avec des détergents et des enzymes. Des CEs et CMLs issues de la moelle osseuse de l'hôte ont été cultivées *in vitro*, puisensemencées sur la veine décellularisée. Après une phase de maturation dans un bioréacteur, le vaisseau a été implanté avec succès. La perméabilité du vaisseau était conservée à 2 ans, bien que le rétrécissement de la greffe, à 9 mois, ait nécessité une deuxième intervention.

L'utilisation de matrices décellularisées reste une approche avantageuse car la disponibilité des matrices est plus importante. De plus, leurs performances mécaniques sont semblables à la MEC

des tissus naturels dont elles proviennent et ces matrices sont peu immunogènes. En effet, les protéines de la MEC, telles que le collagène et l'élastine, qui forment une grande partie de la construction, sont généralement non immunogènes lorsqu'elles sont implantées chez un patient (Rosellini *et al.* 2010, Quint *et al.* 2011). Cependant, même si les matrices décellularisées sont très prometteuses en ingénierie vasculaire, certains points restent à optimiser. Les techniques de décellularisation doivent être perfectionnées pour éviter d'endommager la matrice. En outre, les propriétés mécaniques de la matrice restent variables en fonction des échantillons et plus particulièrement selon les espèces, l'âge et le sexe (Birchall and Hamilton 2012, Olausson *et al.* 2012, Quint *et al.* 2012).

1.3.2.3 Stratégies de l'auto-assemblage

Initialement, les techniques d'auto-assemblage ne comprenaient que le « TESA » (Tissue Engineering Self Assembly) (*Figure 13a*). Actuellement, d'autres techniques telles que les « agrégats cellulaires de micro-tissu » (*Figure 13b*) et la « bio-impression » (*Figure 13c*) sont considérées comme de l'auto-assemblage (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

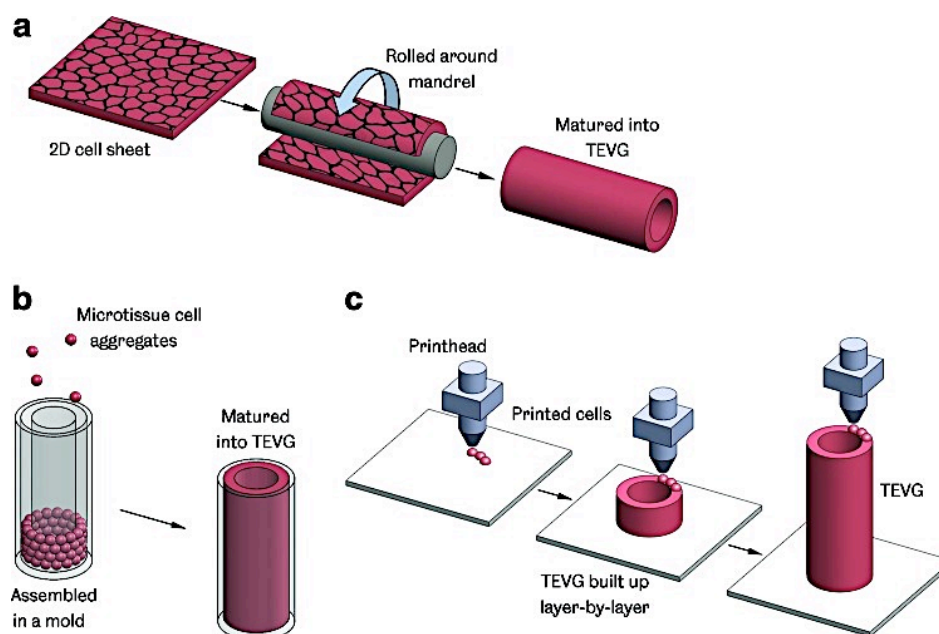


Figure 13 : Elaboration de la composante matricielle par auto-assemblage

(Pashneh-Tala et al. 2015)

1.3.2.3.1 « TESA » (*Tissue Engineering Self Assembly*)

Le TESA est un concept développé par L'Heureux *et al.* (L'Heureux *et al.* 1998). Il consiste en l'auto-assemblage des feuillets cellulaires constitués de collagène et de cellules (*Figure 14*) (Stoclet *et al.* 2004).

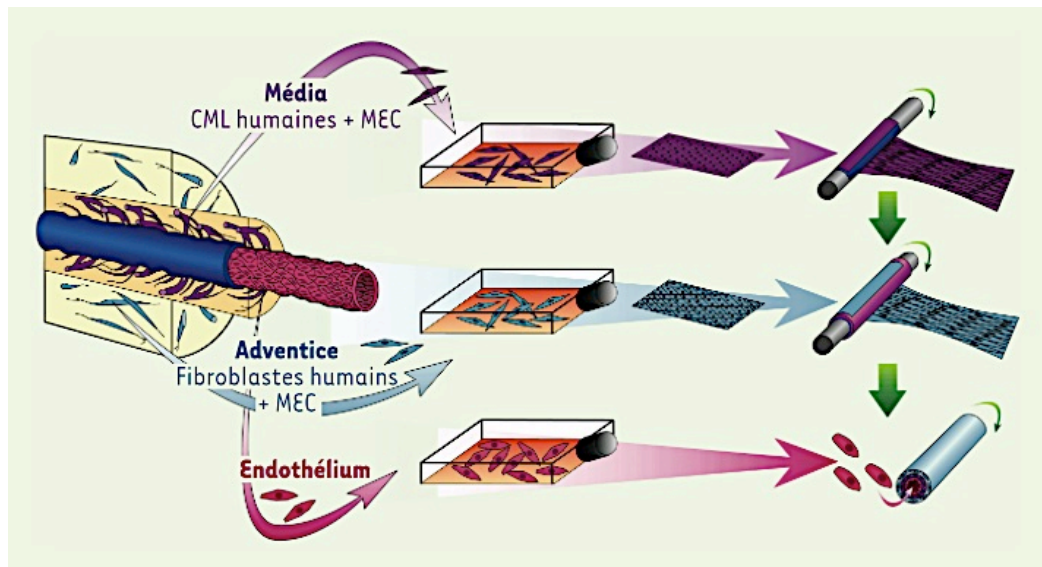


Figure 14 : Concept du Tissue Engineering Self Assembly

(Stoclet *et al.* 2004)

Cette technique permet la reconstitution d'un vaisseau dans son ensemble. Tout d'abord, 3 types cellulaires sont isolés à partir de tissus humains. Les CE et CMLs sont issues de la veine ombilicale humaine et les fibroblastes sont obtenus à partir du derme. Les différents types cellulaires sont ensuite cultivés *in vitro*. Des feuillets tissulaires produits à partir des CMLs (cultivées dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique pour favoriser la formation de la MEC) et des fibroblastes sont enroulés autour d'un mandrin pour reconstituer la média et l'adventice. Après la maturation du tube, le mandrin est enlevé et les CE sontensemencées au niveau de la surface luminale du tube pour recréer l'intima.

L'Heureux *et al.* ont ainsi produit des substituts avec des propriétés mécaniques proches de celles du vaisseau natif (L'Heureux *et al.* 2006). De plus, une étude *in vitro* a comparé les propriétés mécaniques de ces substituts produits par TESA et de vaisseaux natifs (artères mammaires et veine saphène). Même si la résistance à la pression et à la suture semblait meilleure pour les substituts issus du TESA, leur compliance demeurait moins importante que celle des vaisseaux natifs (Konig *et al.* 2009). Des études *in vivo* ont été menées chez le singe et le chien et les résultats étaient

encourageants avec une perméabilité de 86 % des substituts implantés et formations de *vasa vasorum* et de média à 8 mois. Des essais cliniques ont été amorcés. Des greffes vasculaires allogéniques ont été produites à partir de fibroblastes et ont été implantées en tant que fistule artério-veineuse chez trois patients hémodialysés. Le greffon vasculaire a d'abord été stocké pendant 9 mois, sans perte de résistance mécanique. Les greffes implantées n'ont montré aucun signe de dégradation, de dilatation ou de réaction immunitaire néfaste à 11 mois (Wystrychowski *et al.* 2014).

1.3.2.3.2 « Agrégats cellulaires de micro-tissu »

De nouvelles approches ont été rapportées impliquant la production de produits d'ingénierie vasculaire par auto-assemblage d'agrégats de micro-tissus (Kelm *et al.* 2010) (*Figure 13b*). A partir de culture de fibroblastes issus de l'artère humaine et des CEs de la veine ombilicale humaine, des agrégats cellulaires piégés dans la MEC ont été obtenus. Ils ont été ensuite assemblés dans une structure cylindrique grâce à une technique automatisée de microgouttes. Après 14 jours, sous flux pulsatile, les agrégats ont fusionné et formé un substitut vasculaire cohésif (Kelm *et al.* 2010).

1.3.2.3.3 « Bio-impression »

La technique de bio-impression est de plus en plus pratiquée. Elle repose sur le principe d'assemblage de différents types cellulaires pour former une structure en trois dimensions semblable à celle de l'organe lésé (*Figure 13c*). Les cellules en solution constituent l'encre d'impression (bio-encre) et sont imprimées sur un support biocompatible (bio-paper), le plus souvent des hydrogels d'agarose ou de collagène (Jakab *et al.* 2010). Les cellules peuvent être imprimées sous forme sphéroïde ou cylindrique. Le tube final est obtenu après une étape d'incubation au cours de laquelle les différentes couches cellulaires fusionnent, permettant le retrait des hydrogels de soutien. Enfin, une étape de perfusion est nécessaire pour apporter au substitut vasculaire les propriétés mécaniques adéquates (Norotte *et al.* 2009, Marga *et al.* 2012). Malgré des perspectives intéressantes, le temps de fabrication et de maturation peut constituer une limite.

1.3.3 Composante cellulaire en ingénierie vasculaire

La composante cellulaire joue un rôle important pour la longévité et la perméabilité du substitut vasculaire. La cellule endothéliale possède un rôle clé dans la fonctionnalité des vaisseaux, notamment en régulant l'hémostase, l'inflammation, la vasorégulation et l'angiogenèse. L'endothelialisation des matériaux est donc un concept particulièrement développé. Le but est de créer une surface hémocompatible et d'améliorer la perméabilité à long terme de la construction. Les

CEs matures peuvent être une source cellulaire en ingénierie vasculaire. Cependant, leur utilisation nécessite le prélèvement de vaisseaux. Leur disponibilité reste donc limitée. De plus, les CEs matures présentent de faibles capacités de prolifération et de différenciation. D'autres types cellulaires peuvent alors être utilisés en ingénierie vasculaire telles que les cellules souches pluripotentes, les cellules souches adultes multipotentes et les péricytes. Les cellules souches ont un potentiel de prolifération élevé et sont relativement accessibles pour l'ingénierie vasculaire.

Par définition, les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables de s'auto-renouveler, de se différencier en d'autres types cellulaires et de proliférer en culture. On distingue plusieurs types en fonction du développement embryonnaire : (i) les *cellules souches totipotentes* présentant le pouvoir de différenciation en tout type cellulaire du tissu embryonnaire et extra-embryonnaire, capable ainsi de produire un individu en entier ; (ii) les *cellules souches pluripotentes* capables de former tous les types cellulaires du tissu embryonnaire; (iii) les *cellules souches multipotentes* pouvant former tout type cellulaire dans un des trois feuillet (ectoderme, mésoderme, endoderme) ; et (iv) les *cellules souches unipotentes* capables de se différencier en un seul type cellulaire (*Figure 15*) (Watt and Driskell 2010).

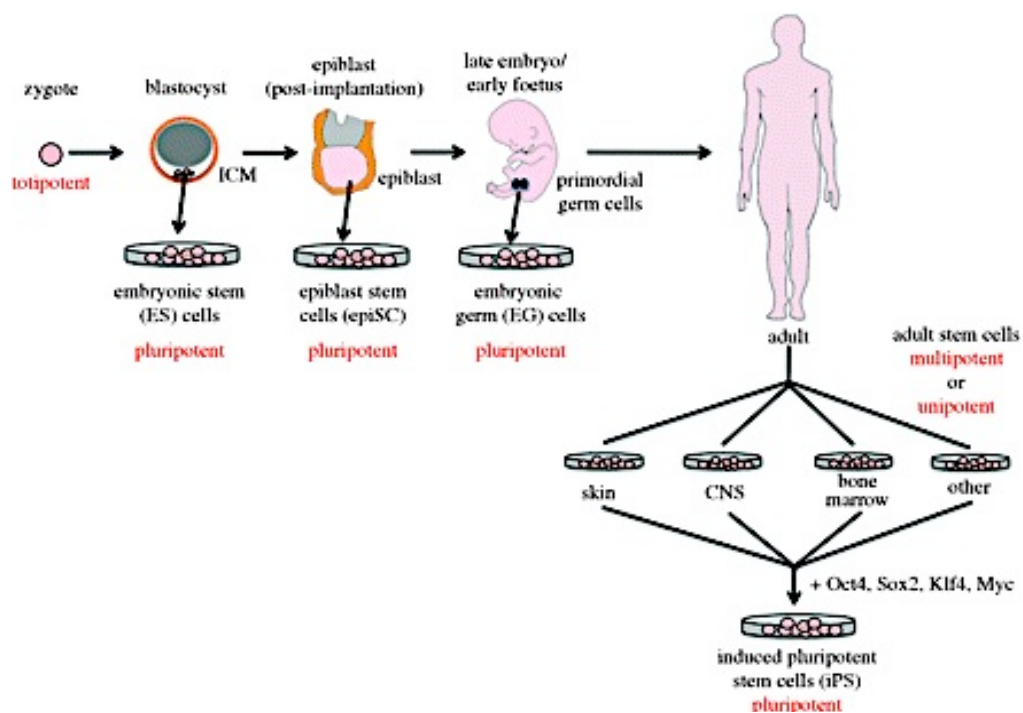


Figure 15 : Cellules utilisées en ingénierie tissulaire

(Watt and Driskell 2010)

1.3.3.1 Cellules souches pluripotentes

1.3.3.1.1 Cellules souches pluripotentes fœtales et embryonnaires

Après le stade de blastocyste, les cellules embryonnaires perdent leur caractère totipotent et deviennent pluripotentes. Cultivées dans des conditions spécifiques, sous stimulation biochimique et /ou mécanique, la différenciation des cellules souches pluripotentes peut être contrôlée et induite vers plusieurs lignages cellulaires, notamment le lignage vasculaire (Hanjaya-Putra and Gerech 2009). Ainsi, des cellules souches pluripotentes humaines ont été différenciées *in vitro* en cellules constitutives des vaisseaux : les CEs (James *et al.* 2010, Nourse *et al.* 2010) et CMLs (Huang *et al.* 2006, Sone *et al.* 2007).

La différenciation *in vitro* des cellules souches pluripotentes en cellules vasculaires est régie par différentes voies de signalisation et facteurs de croissance (**Figure 16**) (Bajpai and Andreadis 2012). L'engagement des cellules souches pluripotentes dans la voie de différenciation mésodermale implique les voies de signalisation Wnt, Activin/Nodal et BMP4. La mise en culture *in vitro* de cellules embryonnaires pluripotentes en présence de facteurs de croissance tels que la BMP4, le FGF2 et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) induit leur différenciation en hémangioblastes. Cultivés dans un milieu riche en facteurs de croissance, tels que le VEGF et le FGF (Fibroblast Growth Factor), les hémangioblastes aboutissent à la formation de cellules endothéliales matures. En présence de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et de TGFβ (Transforming Growth Factor β), les cellules mésodermes FLK1+ se différencient en CMLs.

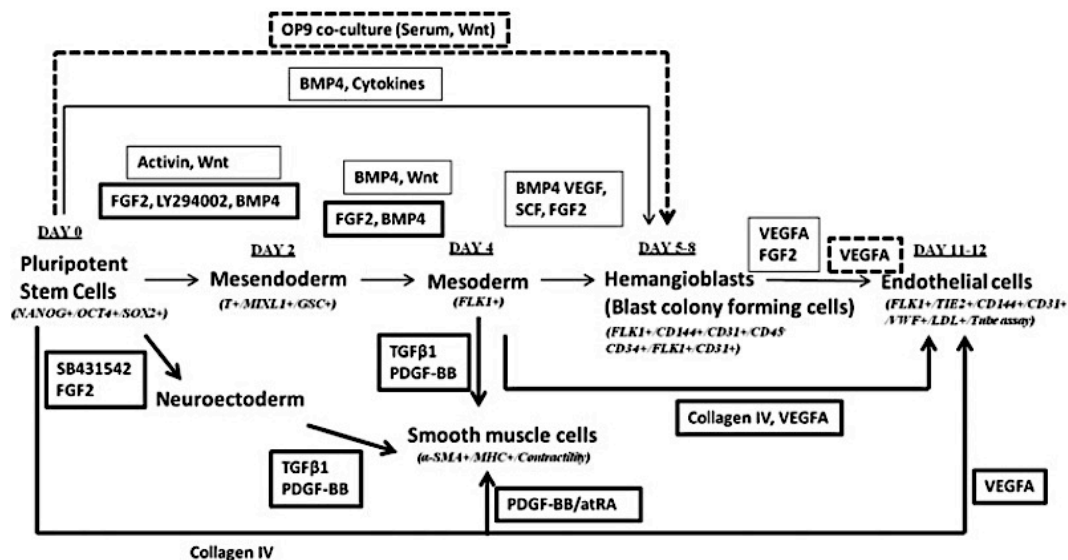


Figure 16 : Différenciation *in vitro* des cellules souches pluripotentes en cellules vasculaires

(Bajpai and Andreadis 2012)

Bien que les cellules souches pluripotentes soient une source cellulaire intéressante, leur utilisation nécessite l'accès aux embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro* ou obtenus après une interruption volontaire de grossesse. Malgré l'assouplissement des lois bioéthiques françaises observées depuis 2004, l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines en recherche médicale reste encore limitée.

1.3.3.1.2 Cellules pluripotentes induites

Les cellules pluripotentes induites (iPSCs, induced Pluripotent Stem Cells) sont obtenues par la modification génétique de cellules somatiques. Yamanaka *et al.* ont démontré que les fibroblastes embryonnaires de souris et les fibroblastes adultes pouvaient acquérir des propriétés semblables aux cellules souches embryonnaires, par l'infection de fibroblastes adultes de souris avec des rétrovirus contenant des gènes codant des facteurs de transcription tels que OCT4, SOX2, KLF4 et cMyc (Takahashi and Yamanaka 2006, Okita *et al.* 2007, Takahashi *et al.* 2007, Okita *et al.* 2008). Par la suite, de nombreux travaux ont été menés aboutissant à l'induction de cellules pluripotentes à partir de fibroblastes, de cellules sanguines (Ye *et al.* 2009), de cellules souches mésenchymateuses (Park *et al.* 2008) ou encore de lymphocytes T (Brown *et al.* 2010).

Les iPSCs sont une source cellulaire particulièrement intéressante, car ces cellules peuvent être obtenues à partir des cellules du patient, limitant le risque de rejet. De plus, elles peuvent se différencier en cellules vasculaires et sont donc utilisées comme source cellulaire en ingénierie vasculaire (Xie *et al.* 2011, Hibino *et al.* 2012, Margariti *et al.* 2012, Wang *et al.* 2014). Cependant, plusieurs problèmes limitent actuellement leurs utilisations en clinique, notamment les variations du potentiel de différenciation selon le type cellulaire (Kim *et al.* 2010) et le fort potentiel oncogène des iPSCs dû à l'accumulation d'anomalies chromosomiques induites par le processus de reprogrammation (Gore *et al.* 2011, Laurent *et al.* 2011). Diverses méthodes ont donc été développées pour contourner le risque de mutagenèse telle que la reprogrammation à l'aide de vecteurs viraux non intégratifs (virus Epstein Barr, virus Sendaï) ou des vecteurs non viraux (plasmide) ou directement des ARNm ou des protéines. Le risque de mutagenèse insertionnelle de ces techniques est nettement diminué voire inexistant pour les virus ARN non intégratifs (Sendaï), les ARNm ou les protéines. L'utilisation des iPSCs en clinique devra donc comporter des étapes de contrôle strictes pour un éventuel usage en clinique (**Figure 17**) (Shi *et al.* 2017).

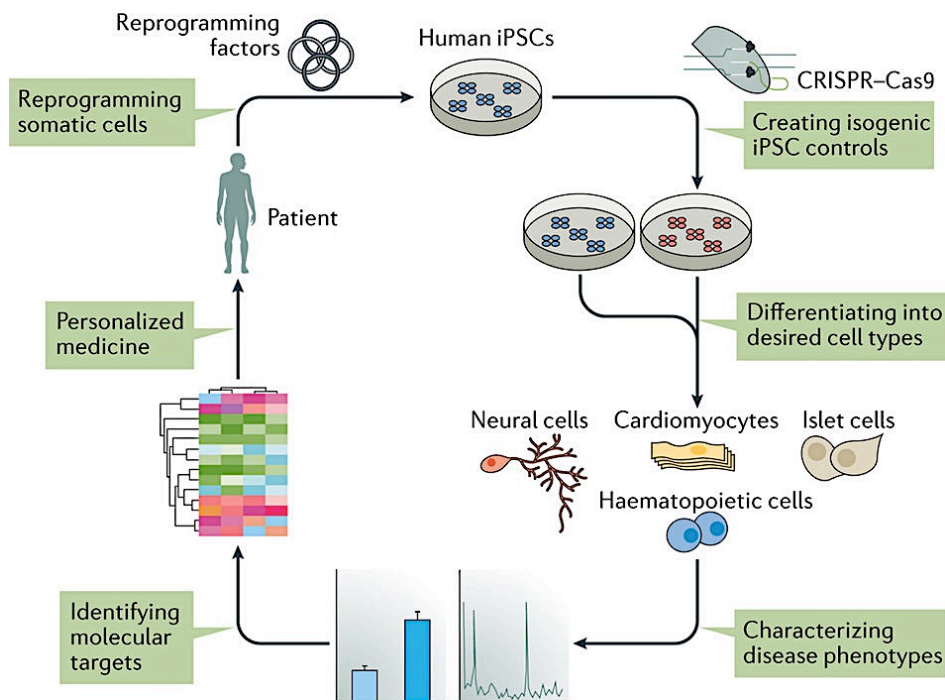


Figure 17 : Modélisation de l'utilisation des IPSCs pour des applications cliniques

(Shi et al. 2017)

1.3.3.2 Cellules souches adultes multipotentes

1.3.3.2.1 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont les cellules souches adultes multipotentes les plus utilisées en ingénierie tissulaire. Elles ont été découvertes par Friedenstein en 1966. La principale source est la moelle osseuse en termes de quantité et d'accessibilité. Cependant, le prélèvement au niveau de la moelle osseuse est relativement invasif avec un volume limité et un taux de rendement relativement faible. Les autres sources de cellules mésenchymateuses sont le tissu adipeux, le sang, le follicule pileux, le muscle, le poumon, la rate, le foie et la dent (Bajpai and Andreadis 2012, Cui et al. 2017). Selon la Société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT), les CSMs sont définis comme des cellules fibroblastiques adhérentes et positives pour CD105, CD90 et CD73 et négatives pour CD34, CD45 et CD14 ou HLA-DR, CD19, CD11b et CD79a (Dominici et al. 2006). Les CSMs sont des sources cellulaires intéressantes pour l'ingénierie vasculaire étant donné leur capacité de se différencier en CE (Oswald et al. 2004) et CMLs (Gong and Niklason 2008) grâce à l'usage de facteurs de croissance ou de contraintes mécaniques adaptées.

1.3.3.3 Progéniteurs endothéliaux

Les progéniteurs endothéliaux (EPCs, Endothelial Progenitor Cells) ou précurseurs endothéliaux sont apparentés à des cellules souches adultes multipotentes. Cependant, la définition précise des EPCs reste source de débats. Les EPCs ont été mis en évidence par Asahara *et al.* (Asahara *et al.* 1997), après avoir isolé des EPCs à partir de sang périphérique. Ces cellules ont été décrites comme des cellules CD34+ circulantes dans le système vasculaire humain et impliquées dans l'homéostasie vasculaire et la réparation endothéliale.

1.3.3.3.1 *Source des EPCs*

Plusieurs sources ont été décrites pour isoler les EPCs, notamment la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical, le sang périphérique, le tissu adipeux et la rate (Simard *et al.* 2017). Les EPCs issus de la moelle osseuse ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques dans le cadre de revascularisation suite à un infarctus aigu du myocarde avec des taux de réussite variables en termes de mortalité et de récupération ventriculaire (Fisher *et al.* 2015). Les EPCs peuvent également être issus du tissu adipeux. Ils ont été mis en évidence par Planat-Benard *et al.* (Planat-Benard *et al.* 2004). Des adipocytes humains ont été différenciés en cellules endothéliales grâce à des conditions appropriées (Planat-Benard *et al.* 2004). L'isolement des EPCs provenant du sang périphérique étant chronophage, le tissu adipeux peut représenter une source alternative pour isoler les EPCs. Des études ont montré que les EPCs dérivés de tissus adipeux (ADEPCs) étaient positifs pour CD34, Stro-1, VEGFR-2 (KDR), eNOS et CD31 et participait à la néovascularisation après transplantation des ADEPCs au niveau de lésions cérébrales traumatiques chez le rat (Xue *et al.* 2010). De plus, les ADEPCs étaient capables d'améliorer la formation de réseaux capillaires sur support Matrigel (Zhou *et al.* 2015). La rate peut également être une source intéressante pour isoler les EPCs, car la plupart des cellules souches hématopoïétiques migrent vers les sinusoides dans la moelle osseuse et la rate (Zhao *et al.* 2010). Des EPCs isolés à partir de la rate ont été utilisés chez le rat dans un modèle de cardiopathie non ischémique. La présence des EPCs a permis d'améliorer les performances cardiaques (Werner *et al.* 2005).

1.3.3.3.2 *Nomenclature des EPCs*

Actuellement, les EPCs sont identifiés selon deux méthodes : l'identification des marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux et la capacité à former des colonies (Simard *et al.* 2017). Les cellules sont considérées comme des EPCs si elles présentent les marqueurs suivants : CD146, MCAM, MUC18, S-endo-1, CD34, CD133, Tie-2, FLK-1, VEGFR-2, l'Ephrine B2 et B4 (Obi *et al.*

2009). Cette caractérisation doit être complétée par des tests fonctionnels : capacité d'incorporer des dil-LDL acétylés et d'interagir avec l'Ulex (Asahara *et al.* 1997, Dernbach *et al.* 2004, Hristov and Weber 2004) ; aptitude à former des colonies cellulaires à partir de la mise en culture de cellules mononucléées issus du sang (Simard *et al.* 2017).

On distingue les EPCs précoces et les EPCs tardifs (*Figure 18*) (Shantsila, Watson *et al.* 2008). Les EPCs précoces sont issues de la lignée monocyttaire CD14+. Ils expriment comme marqueurs de surface : VEGFR-2, CD34, CD133 et CD45 (Shantsila *et al.* 2008). *In vitro*, ils prolifèrent peu, présentent une morphologie fusiforme et s'organisent en colonies cellulaires. D'un point de vue fonctionnel, ils ont une activité de phagocytose (Zhang *et al.* 2006, Yoder *et al.* 2007) et antithrombotique (Smadja *et al.* 2009). Par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissances ils participent indirectement par une action paracrine au processus d'angiogenèse (Sieveking *et al.* 2008, Smadja *et al.* 2009). Les EPCs tardifs ont, quant à eux, une origine hématopoïétique CD34+ (Shantsila *et al.* 2008, Shantsila *et al.* 2008). Les EPCs tardifs sont CD34+, CD133+, KDR+ et expriment exclusivement des marqueurs spécifiques des CE après leur mise en culture et s'organisent en colonies pavimenteuses et montrent un pouvoir prolifératif important (Smadja and Gaussem 2009).

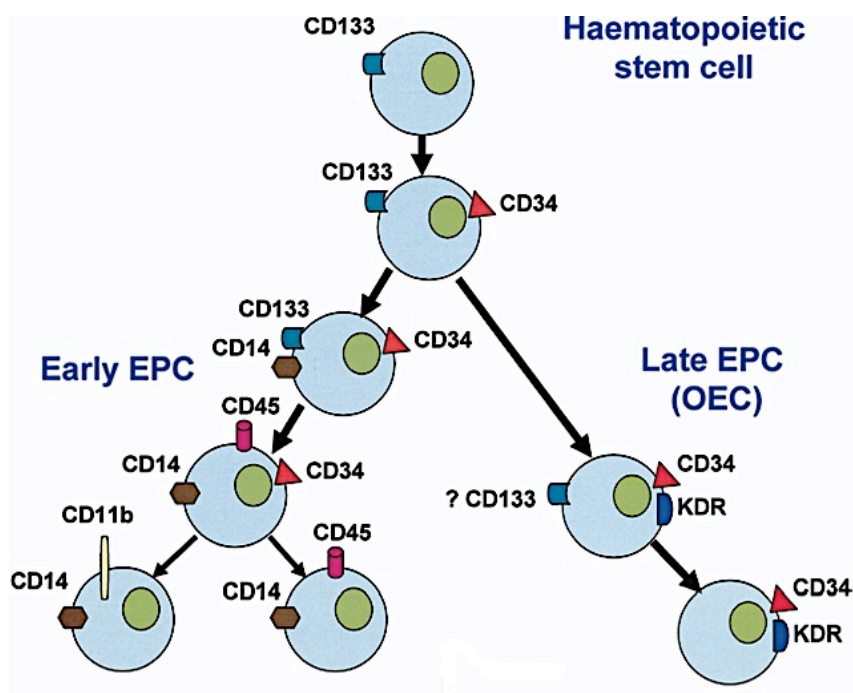


Figure 18 : Marqueurs de surface des EPCs précoces et tardifs

(Shantsila *et al.* 2008)

Cependant, depuis leur découverte, la nomenclature des EPCs reste ambiguë et représente un obstacle majeur à la compréhension de la biologie et l'utilisation de ces cellules en clinique. Principalement en raison de l'absence de marqueur spécifique unique, il existe aujourd'hui un grand nombre de sous-types cellulaires regroupés à tort sous le terme «EPC». Medina *et al.* ont proposé récemment une classification pour distinguer les EPCs en fonction de l'origine hématopoïétique ou mésenchymateuse et de leur phénotype (Medina *et al.* 2017). Ainsi, plusieurs sous types cellulaires peuvent être distingués : BOEC (Blood Outgrowth Endothelial Cell), CAC (Circulating Angiogenic Cell), CFU (Colony Forming Unit), ECFC (Endothelial Cell Forming Colony), OEC, (Endothelial Outgrowth Cell), EPC (Endothelial Progenitor Cell), MAC (Myeloid Angiogenic Cells), PAC (Pro-Angiogenic hematopoietic Cells) (*Figure 19*) (Medina *et al.* 2017). Idéalement, le terme « progéniteur endothélial » devrait être strictement réservé aux cellules avec un phénotype endothélial, un potentiel d'auto-renouvellement et une capacité pour la formation de vaisseaux sanguins *in vivo*. Le terme d'EPC ne devrait pas être utilisé pour nommer des cellules telles que les MACs ou les CACs car ces cellules ne sont pas des cellules endothéliales ni progénitrices (Medina *et al.* 2017).

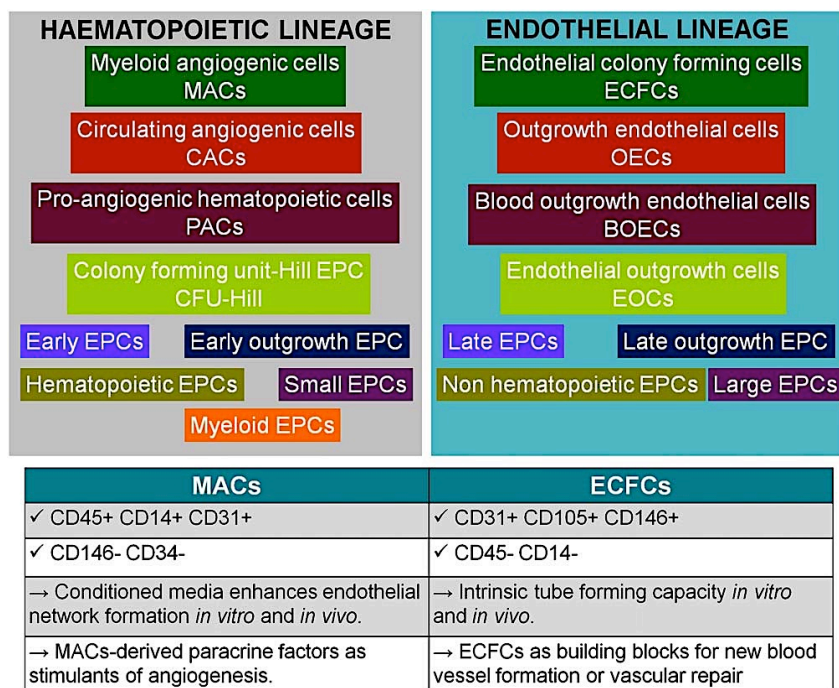


Figure 19 : Nomenclature et progéniteurs endothéliaux

(Medina *et al.* 2017)

1.3.3.3 Rôle des EPCs dans la réparation vasculaire

Lors de la pose d'un stent pour traiter notamment une maladie coronarienne obstructive, la plaque d'athérome est repoussée contre la paroi vasculaire, pouvant entraîner la perte de cellules endothéliales tapissant la face luminale du vaisseau (*Figure 20a*) (Simard *et al.* 2017).

Les EPCs circulants sont alors mobilisés au niveau des lésions vasculaires. Plusieurs facteurs favorisent la mobilisation, la différenciation et la migration des EPCs : le « Granulocyte-Colony Stimulating Factor » (G-CSF), le « Chemokine Stromal Derived factor-1 » (SDF-1), le VEGF, l'angiopoïétine et l'érythropoïétine (EPO). Les EPCs participent à la réparation vasculaire par des phénomènes de différenciation ou des mécanismes paracrines. En effet, ils peuvent se différencier en CEs matures (*Figure 20b*) après avoir adhéré à la paroi vasculaire (Simard *et al.* 2017). Cette différenciation peut être initiée par les contraintes de cisaillement ou par une stimulation biochimique. Le VEGF active l'expression de gènes codant le CD31 et le vWF (Wijelath *et al.* 2004) et les contraintes de cisaillement de type artériel induisent la surexpression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ par lesquelles les EPCs adhèrent à la paroi vasculaire lésée. Les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ traduisent également le signal mécanique en signal biochimique de différenciation des EPCs (Cui *et al.* 2012).

Les EPCs peuvent également sécréter de nombreuses chimiokines qui stimulent les cellules environnantes, permettant la prolifération migration de ces dernières vers le site de blessure (*Figure 20c*) (Simard *et al.* 2017). Grâce à ces différents mécanismes, la couche endothéliale lésée est restaurée (*Figure 20d*) (Simard *et al.* 2017).

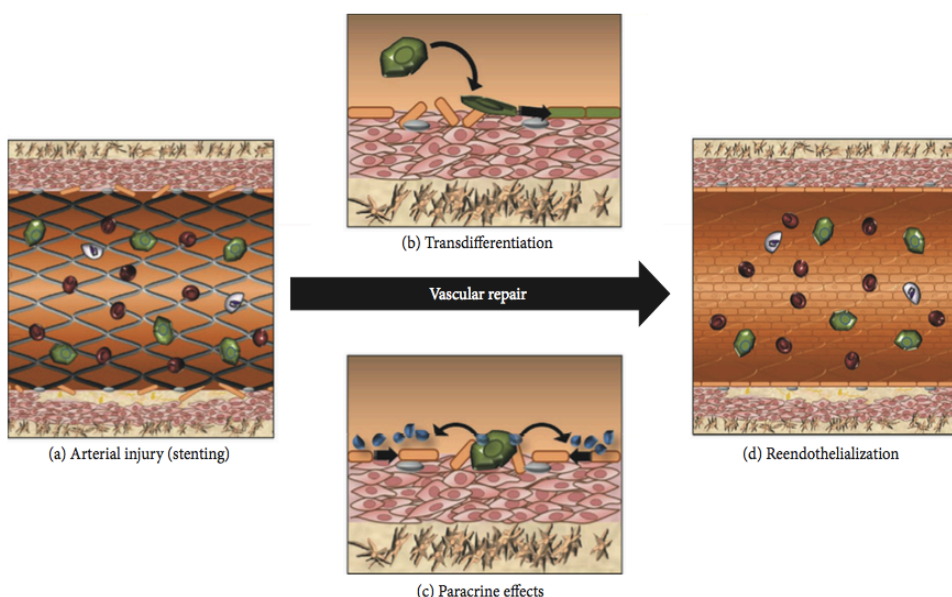


Figure 20 : Rôle des EPCs dans la réparation vasculaire

(Simard *et al.* 2017)

Les EPCs sont largement utilisés en ingénierie vasculaire, afin d'améliorer la perméabilité des substituts vasculaires en créant une surface non-thrombogène (Yang *et al.* 2006, Zhang and She 2007, Achneck *et al.* 2011, Quint *et al.* 2011). Ils sont notamment utilisés pour la cellularisation *in vitro* de prothèses. Ainsi, plusieurs équipes ont reconstitué *in vitro* un endothélium au niveau de la surface luminale de substituts vasculaires synthétiques et biologiques à l'aide d'EPCs (Griese *et al.* 2003, He *et al.* 2003, Aper *et al.* 2007). Les EPCs peuvent également être recrutés *in situ*, notamment en modifiant la surface des prothèses vasculaires (Aicher *et al.* 2005, de Mel *et al.* 2008, Avci-Adali *et al.* 2010) (**cf. partie 2.2.3.2 Modification de surface pour favoriser l'endothélialisation**).

1.3.3.4 Péricytes

Les péricytes sont des cellules péri-vasculaires qui interagissent avec l'endothélium dans les capillaires. Ils participent à la stabilisation des vaisseaux, à la synthèse de protéines matricielles, au contrôle de la tension artérielle, à la prolifération et à la différenciation des cellules endothéliales, à la contractilité des CMLs vasculaires, à la cicatrisation des plaies, à l'angiogenèse et au maintien à long terme de cellules souches hématopoïétiques dans la niche de la moelle osseuse. Ils peuvent être isolés à partir de plusieurs tissus et organes et en particulier la rétine et le cerveau (Gokcinar-Yagci *et al.* 2015). He *et al.* ont élaboré un substitut vasculaire biodégradable synthétique de petit calibre cellularisé par des péricytes humains. Après 8 semaines d'implantation chez le rat, la perméabilité de ce substitut est de 100% avec un remodelage du substitut (He *et al.* 2010).

1.3.4 Signaux et bioréacteurs : maturation des substituts vasculaires

Les bioréacteurs sont des systèmes de culture tissulaire en trois dimensions qui permettent de développer de façon automatisée, un environnement contrôlable, reproductible, mécaniquement actif. Les bioréacteurs ont été développés pour palier les limites de la culture cellulaire statique et ainsi améliorer les apports aux cellules en oxygène et assurer un ensemencement cellulaire plus uniforme (Seifu *et al.* 2013). La culture d'une construction à l'intérieur d'un bioréacteur permet de contrôler plusieurs paramètres, tels que le transport des nutriments et des facteurs de croissance et les contraintes mécaniques.

1.3.4.1 Transport de nutriments et facteurs de croissance

Certains facteurs biochimiques sont indispensables pour la maturation des substituts tels le VEGF, facteur de croissance permettant la différenciation des cellules souches en cellules

endothéliales matures. D'autres facteurs angiogéniques sont également connus, tels que le FGF, HGF (Hepatocyte Growth Factor), le facteur de croissance placentaire et SDF-1. *In vivo*, ces facteurs sont apportés par le sang ou produits localement par les CEs ou par les cellules musculaires lisses (Atluri and Woo 2008). Le degré d'oxygénation à l'intérieur du substitut vasculaire est également un élément clé pour la maturation du produit d'ingénierie vasculaire. Si l'apport en oxygène est inadéquat, l'hypoxie est fréquente dans les zones les plus centrales de la construction vasculaire. Le manque d'oxygène peut créer un environnement létal et limiter la croissance cellulaire. Grâce à l'utilisation d'un bioréacteur, il est possible de perfuser la construction endothélialisée afin de permettre la pénétration de l'oxygène jusqu'à l'intérieur et d'augmenter le dépôt de matrice ainsi que la prolifération cellulaire (Malda *et al.* 2007). Cependant, l'hypoxie est également connue pour favoriser l'angiogenèse et stimuler le recrutement des EPCs (Dai *et al.* 2017).

1.3.4.2 Contraintes mécaniques

Les facteurs mécaniques ont également un rôle fondamental dans la maturation des substituts vasculaires obtenus par ingénierie tissulaire. Les contraintes mécaniques ont une influence sur l'endothélium. En effet, les contraintes de cisaillement sont perçues par des mécanorécepteurs endothéliaux. Le signal mécanique est ensuite converti en signaux chimiques. Différentes voies de signalisation (cascade des MAPKinases, voie PI3K-Akt, GTPases de la famille Rho, *etc.*) sont alors activées, induisant un remodelage du cytosquelette et conduisant aux changements structurels des CEs. Si les contraintes sont élevées, on observe un turn-over lent des cellules endothéliales, un alignement cellulaire, une faible perméabilité, une activation de gènes anti-inflammatoires et un stress oxydatif minimum. Par contre, si le flux est turbulent, le turn-over est rapide, l'alignement cellulaire est faible, la perméabilité est élevée, des gènes pro-inflammatoires sont activés et un stress oxydatif est généré (Vinatier *et al.* 2011).

1.3.4.3 Bioréacteurs

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées *in vitro*, *in vivo* ou *in situ* pour permettre la maturation des substituts vasculaires (*Figure 21*). Le type de bioréacteur dépendra notamment de la stratégie d'élaboration choisie pour obtenir les substituts (*cf. partie 1.3.2 Stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire*).

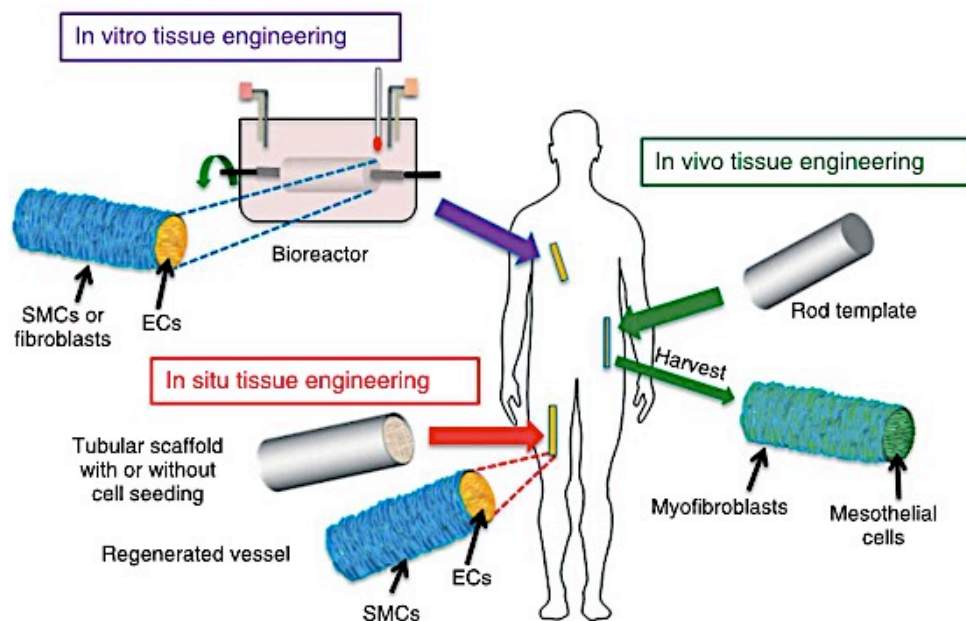


Figure 21 : Différentes stratégies pour la maturation des substituts vasculaires

(Li et al. 2014)

Les bioréacteurs peuvent être utilisés *in vitro*. Ils miment *in vitro* les conditions cardiovasculaires auxquelles sont soumis les substituts vasculaires. Il s'agit de bioréacteurs à perfusion, systèmes en trois dimensions, constitués de deux chambres et permettant de développer de façon automatisée un environnement contrôlable, reproductible et mécaniquement actif. Ils permettent de contrôler différents paramètres tels que : la densité d'ensemencement cellulaire, le transport des nutriments et de l'oxygène, la libération des molécules bioactives et les contraintes mécaniques (pulsatile, statique, de cisaillement, tension, compression). Les systèmes de perfusion produisent un flux pulsatile intra-luminal et permettent ainsi d'exposer les cellules endothéliales à des contraintes de cisaillement. Il a été démontré que l'utilisation de bioréacteurs augmentait la résistance mécanique des substituts vasculaires, la production de collagène et les marqueurs d'expression des CMLs (Wendt *et al.* 2009). La maturation des substituts peut également être réalisée *in vivo*. Le corps humain est alors utilisé comme bioréacteur. La matrice produite est d'abord (i) implantée *in vivo* dans des sites choisis, tels que la cavité péritonéale ou la peau ; (ii) après maturation, la matrice est prélevée et cellularisée *in vitro* ; (iii) enfin, le substitut vasculaire est implanté en tant que greffe vasculaire (Li *et al.* 2014). Pour la maturation *in situ*, des matrices cellularisées ou non sont produites et implantées en tant que greffe vasculaire, sans phase de maturation. Ces matrices favorisent le recrutement *in situ* des cellules de l'hôte et le remodelage du substitut vasculaire *in situ* (Li *et al.* 2014).

En conclusion, en se basant sur la description des différentes stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire (cf. partie 1.3.2 *Stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire*), l'utilisation de matrices naturelles paraît particulièrement avantageuse. En effet, ces dernières présentent des propriétés biologiques intéressantes, en termes d'adhésion cellulaire et de biocompatibilité, contrairement aux polymères synthétiques dont les propriétés restent insuffisantes en terme de bioactivité. Certes, les propriétés mécaniques des matrices naturelles restent inférieures aux matrices synthétiques, mais elles peuvent être améliorées grâce à l'utilisation des bioréacteurs. Contrairement aux matrices naturelles, les matrices décellularisées peuvent être dégradées par les procédés physiques et/ou chimiques de décellularisation et les propriétés mécaniques de la matrice peuvent varier en fonction des échantillons. Enfin, même si la technique d'auto-assemblage offre des perspectives intéressantes, le temps de fabrication et de maturation constitue une véritable limite.

Concernant la composante cellulaire (cf. partie 1.3.2 *Stratégies d'élaboration des substituts en ingénierie vasculaire*), les EPCs constituent une source cellulaire intéressante. En effet, contrairement aux cellules endothéliales matures, leur isolement reste aisé (différentes sources possibles) ainsi que leur mise en culture (capacité de prolifération importante). De plus, ces cellules sont déjà largement utilisées en ingénierie vasculaire, afin d'améliorer la perméabilité des substituts vasculaires en créant une surface non thrombogène (cellularisation *in vitro* de prothèses ou recrutement *in situ*). Certes, les cellules souches pluripotentes fœtales et embryonnaires et les iPSCs sont des sources cellulaires intéressantes, cependant les difficultés éthiques engendrées par les premières et le fort potentiel oncogène des secondes limitent actuellement l'utilisation de ces cellules en clinique.

2 CAHIER DES CHARGES DES SUBSTITUTS VASCULAIRES

L'ingénierie des tissus vasculaires vise à appliquer les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts vasculaire avec des propriétés proches de celles des vaisseaux natifs (Couet *et al.* 2007). Les matrices, utilisées en ingénierie vasculaire, doivent donc répondre à un cahier des charges strictes (*Figure 22*).

CAHIER DES CHARGES DE LA MATRICE EN INGENIERIE VASCULAIRE

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES	PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES	MISE EN OEUVRE
Non toxicité	Résistance à la suture	Faibles coûts de fabrication
Non immunogénicité	Résistance aux pressions physiologiques	Facilement disponible : variété en longueurs et diamètres
Non thrombogénicité		Stérilisable
Non-susceptibilité à l'infection		Stockage facile
Maintien d'un endothélium fonctionnel		

Figure 22 : Exigences requises pour la matrice en ingénierie vasculaire

D'après (Catto et al. 2014)

Parmi toutes les exigences nécessaires à un substitut vasculaire, les plus strictes concernent la régénération d'un endothélium fonctionnel et des propriétés mécaniques adaptées, critères faisant défaut aux matériaux de substitutions synthétiques tels que le Dacron ou le ePTFE. En effet, la faible compliance de ces substituts (comparativement aux artères natives) et leur non-recouvrement par un endothélium restent des obstacles majeurs à leur utilisation clinique pour des vaisseaux de petits calibres. Cependant, cette balance entre propriétés mécaniques et biologiques impose souvent des compromis.

2.1 Propriétés mécaniques requises pour un substitut vasculaire

La pression artérielle varie physiologiquement de 80 à 140 mmHg à chaque pulsation. Pour un patient souffrant d'athérosclérose la pression artérielle augmente avec des valeurs moyennes de 140 mmHg. D'un point de vue mécanique, les vaisseaux natifs possèdent des structures multicouches avec de fibres de collagène sous tension qui permettent de maintenir la fonction et l'intégrité des artères sollicitées mécaniquement (*Figure 23*) (van Haften *et al.* 2017).

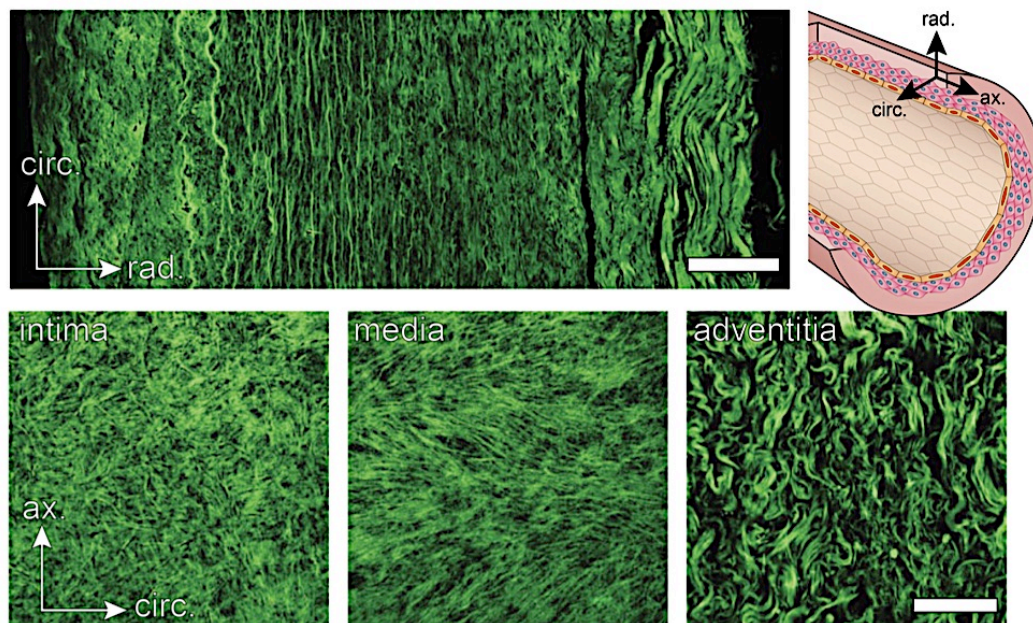


Figure 23 : Organisation du collagène dans les 3 tuniques de l'aorte

(van Haften et al. 2017)

Les vaisseaux possèdent trois caractéristiques essentielles, impactant leurs propriétés biomécaniques : élasticité, anisotropie et capacité de remodelage. L'élasticité des vaisseaux est déterminée principalement par les composants actifs (CMLs) et passifs (élastine et collagène) de la média. L'anisotropie est la variation des propriétés mécaniques dépendant de la direction. L'arrangement des composants structuraux de la paroi comme le collagène est la principale cause de l'anisotropie des vaisseaux sanguins. Les vaisseaux sont également remodelés, par dégradation ou synthèse de nouveaux constituants comme le collagène ou l'élastine, induisant une nouvelle géométrie avec de nouvelles propriétés mécaniques. Les contraintes les plus importantes qui peuvent avoir une influence sont la contrainte circonférentielle générée par la pression sanguine, le cisaillement généré par le flux sanguin et l'élongation axiale du vaisseau. Les stimulations mécaniques jouent donc un rôle essentiel dans la conception de la structure et de la fonction biologique des tissus (Holzapfel 2008).

Concernant les propriétés mécaniques des substituts synthétiques utilisés en clinique, les prothèses en ePTFE possèdent une rigidité modérée et sont des matériaux non poreux (Sarkar *et al.* 2006). En effet, la porosité du ePTFE est considérée comme nulle, car les écarts entre les fibrilles forment des micropores trop petits ($<0,05 \mu\text{m}$) (Sarkar *et al.* 2006). Certaines techniques ont été développées pour augmenter la porosité de prothèses en ePTFE en utilisant une plus grande taille de fibrilles ($60 \mu\text{m}$ contre $20 \mu\text{m}$) et conduisant à la promotion de la croissance cellulaire transmurale (Nishibe *et al.* 2000). Le Dacron, quant à lui, est composé de fibres tissées ou tricotées, lui conférant une résistance à la traction importante (10 fois supérieure à celle du ePTFE) et il s'agit d'un matériau

poreux. Actuellement, étanchéifié par l'impregnation de collagène, les substituts synthétiques utilisés en clinique possèdent des propriétés insuffisantes en terme de compliance. Peck *et al.* ont étudié le comportement du ePTFE suite à l'insertion d'une aiguille d'hémodialyse de calibre 16. Ils ont mis en évidence une faible compliance du PTFE et la génération de fuite au niveau de la prothèse vasculaire, nécessitant une pression pour arrêter le saignement, pouvant engendrer une thrombose (*Figure 24*) (Peck *et al.* 2012).



Figure 24 : Comportement mécanique du ePTFE

D'après (Peck et al. 2012)

En ingénierie vasculaire, l'obtention de propriétés mécaniques proches des vaisseaux natifs est souvent recherchée. La norme internationale ISO 7198 : 1998 définit les tests mécaniques d'évaluation des prothèses vasculaires ainsi que les méthodes d'évaluation avant leur implantation. Ainsi, elle distingue des tests mécaniques menés jusqu'à la destruction de l'échantillon (résistances longitudinale et circonférentielle à la traction ; résistance à l'éclatement ; résistance à l'arrachement des sutures), des tests utiles au chirurgien lors de l'implantation pour fournir des informations dimensionnelles et comportementales (diamètre interne au repos et sous pression ; épaisseur de paroi ; longueur utile ; rayon de plicature ; compliance dynamique), des tests mesurant l'étanchéité de la prothèse (porosité ; perméabilité ; pression d'entrée d'eau ; résistance aux ponctions répétées). Cependant, aucune norme n'existe actuellement pour définir les valeurs minimales des propriétés mécaniques à atteindre (Konig *et al.* 2009). Les propriétés mécaniques de la veine saphène et de l'artère thoracique interne sont souvent utilisées comme valeurs références (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

De façon générale, la prothèse doit posséder une force de rétention de suture suffisante pour permettre son anastomose et résister aux manipulations des chirurgies. Après son implantation, elle doit posséder une pression d'éclatement suffisante afin de résister aux contraintes hémodynamiques (Pashneh-Tala *et al.* 2015). La résistance mécanique du vaisseau doit également lui permettre de ne pas subir une fatigue mécanique liée aux cycles pulsatiles de la circulation sanguine. En effet, cette

usure pourrait mener à une dilatation permanente du diamètre interne. Idéalement, sa compliance devrait être aussi proche que possible de celle d'une artère native afin d'éviter un décalage de la compliance et les effets négatifs associés à un flux sanguin turbulent qui favorisent la formation de sténoses. Actuellement, le substitut disposant de propriétés mécaniques idéales, n'a pas encore été développé (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

Cependant, l'analyse des propriétés mécaniques avant implantation n'est pas toujours prédictive du comportement à long terme de la prothèse. En effet, d'autres critères doivent être pris en compte, comme l'effet du remodelage. Après implantation, les substituts sont remodelés *in vivo* et les propriétés mécaniques initiales sont modifiées (Konig *et al.* 2009). Étant donné que l'hyperplasie intimale est intimement liée au remodelage et constitue l'une des principales causes d'échec thérapeutique, le processus de remodelage du substitut doit être largement pris en compte et analysé. La modélisation informatique de la dynamique des fluides et l'analyse des éléments finis sont de plus en plus développées afin de prédire l'évolution des propriétés mécaniques des produits d'ingénierie tissulaire (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

Au cours du temps, les substituts vasculaires sont également soumis au vieillissement. Selon la nature du milieu et les contraintes auxquelles les prothèses vasculaires sont soumises au cours de leur implantation, ces dernières sont victimes des trois processus du vieillissement : physique, mécanique et chimique. Le vieillissement physique est lié aux conditions environnementales (exposition à une température de 37°C pour une longue durée de vie). Le vieillissement mécanique est lié aux contraintes mécaniques que subissent ces prothèses sous l'effet de la pression hydrostatique et des cycles de fatigue. Le vieillissement chimique est principalement dû à la nature du milieu biologique. Des tests de fatigues sont préconisés et ils devraient précéder les tests de résistance (Dieval *et al.* 2001). Ces tests consistent à faire subir à la prothèse une série de sollicitations, réalisées de façon statique ou dynamique. Les tests de fatigue sont généralement peu réalisés pour les prothèses vasculaires utilisés pour les pontages (Konig *et al.* 2009), contrairement aux stents (Pelton *et al.* 2008, James and Sire 2010, Sweeney *et al.* 2012, Dordoni *et al.* 2014). Un autre paramètre doit également être pris en compte : la variation des propriétés mécaniques selon les dimensions et la localisation des substituts et selon l'âge du patient (Pashneh-Tala *et al.* 2015). En effet, l'âge influence fortement la compliance des vaisseaux (*Figure 25*) (Salacinski *et al.* 2001).

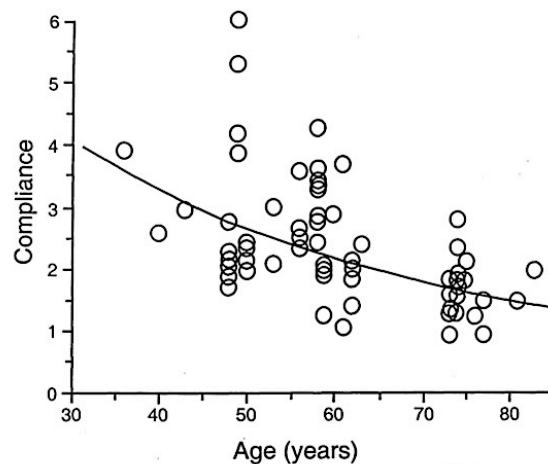


Figure 25 : Influence de l'âge sur la compliance des vaisseaux

(Salacinski *et al.* 2001)

2.1.1 Etanchéité

Les tests d'étanchéité regroupent principalement l'analyse de la porosité et la mesure de perméabilité de la paroi des prothèses. Il est important de s'assurer que la prothèse soit étanche au sang dans les premiers temps de l'implantation. Après cette période critique, la coagulation et la colonisation de la prothèse par les cellules vasculaires du receveur assurent l'étanchéité de la prothèse (Dieval *et al.* 2001).

La porosité du matériau est un critère important et souvent exploré en ingénierie vasculaire (Li *et al.* 2017, Strobel *et al.* 2017, Tan *et al.* 2017). En effet, une porosité appropriée facilite l'échange de nutriments et la prolifération des cellules endothéliales, tout en empêchant l'hyperplasie excessive des cellules musculaires lisses vasculaires autologues (Wang *et al.* 2015), empêchant les phénomènes de thrombose (Musey *et al.* 2002). La porosité quantifie le pourcentage de vide dans la structure des prothèses. Il existe trois méthodes pour la mesure de ce paramètre : planimétrique, microscopique et gravimétrique. Les deux premières méthodes s'appuient sur une analyse microscopique de l'échantillon. La méthode planimétrique consiste à déterminer l'aire des vides par rapport à l'aire occupée par la matière. La porosité est mesurée comme un rapport défini entre l'aire occupée par le vide et l'aire totale occupée (matière et vide). La seconde méthode détermine la distance internodale. La dernière méthode est basée sur la mesure de la masse volumique apparente du matériau, comparée à la masse volumique du polymère le constituant. Cette valeur est mesurée par une colonne à gradient de densité. La porosité idéale utilisée en ingénierie vasculaire pour la pénétration cellulaire devrait généralement être comprise entre 60 et 90% (Zhang *et al.* 2004).

La perméabilité est également un paramètre souvent analysé en ingénierie vasculaire (Morota and Takamoto 2013, Takeuchi *et al.* 2014, Nagiah *et al.* 2015, Li *et al.* 2017). La perméabilité à l'eau test consiste à isoler 0,5 cm² à 1 cm² de prothèse et à mesurer le volume d'eau passant au travers de cette surface pendant une minute sous une pression de 16 kPa (120 mmHg). La perméabilité est donnée par le rapport entre le volume d'eau écoulé au travers de cette surface pendant une minute et la surface d'essai. Cependant, les valeurs qui sont mesurées sont spécifiques au fluide utilisé (en l'occurrence l'eau). Les résultats obtenus permettent donc seulement de comparer une prothèse à une autre et non pas de connaître le comportement du sang vis-à-vis de la prothèse (Dieval *et al.* 2001).

2.1.2 Résistance à la suture

La résistance de la suture à la traction ou suturabilité est l'un des premiers paramètres à étudier *in vitro*. La majorité des tests de suturabilité sont automatisés et déterminent la force de traction qu'il faut exercer sur un fil, dans son axe, pour obtenir sa rupture. Le fil et le matériau sont maintenus à l'aide de mors. La force de traction est progressivement augmentée, par écartement des mors à vitesse constante jusqu'à la rupture. (*Figure 26*) (Kajbafzadeh *et al.* 2017).

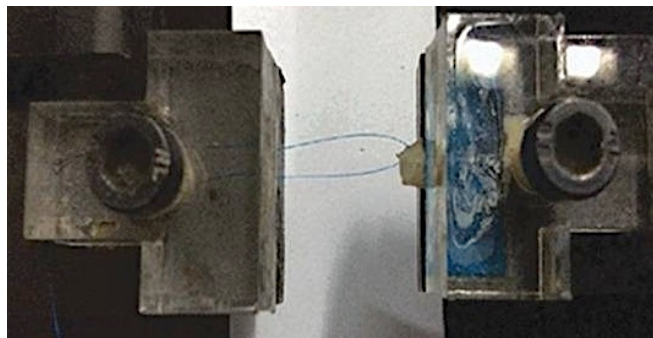


Figure 26 : Evaluation de résistance à la suture par test de traction

(Kajbafzadeh et al. 2017)

La suturabilité dépend du matériau et d'autres paramètres, tels que le type de fil, la distance de la suture par rapport à l'extrémité du substitut ou le nombre de sutures (Konig *et al.* 2009). La suturabilité dépend également du diamètre du fil utilisé. En effet, Zang *et al.* ont étudié la suturabilité de substituts vasculaires obtenus à partir de chitosane et ils ont démontré en changeant la taille du fil (de 5-0 à 9-0), que la suturabilité diminuait. Il est donc important d'identifier clairement ces variables, afin d'assurer une comparaison correcte des différentes valeurs de suturabilité dans la littérature.

Comme il n'existe aucune valeur seuil à atteindre officiellement, la mise en place de critères minimaux devient la responsabilité des groupes œuvrant dans le domaine. König *et al.* ont pu implanter des substituts vasculaires avec des valeurs de suturabilité de 0,75 N sans complication anastomotique chirurgicale ou post-implantation. Ces auteurs ont défini le seuil de 50 gF (0.5N) comme valeur de suturabilité minimale à atteindre (König *et al.* 2009). Cette valeur reste inférieure aux vaisseaux natifs, tels que la veine saphène et l'artère thoracique interne. En effet, ces valeurs sont en moyenne de 1,92 N et 1,72 N, respectivement pour la veine saphène et l'artère thoracique interne (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

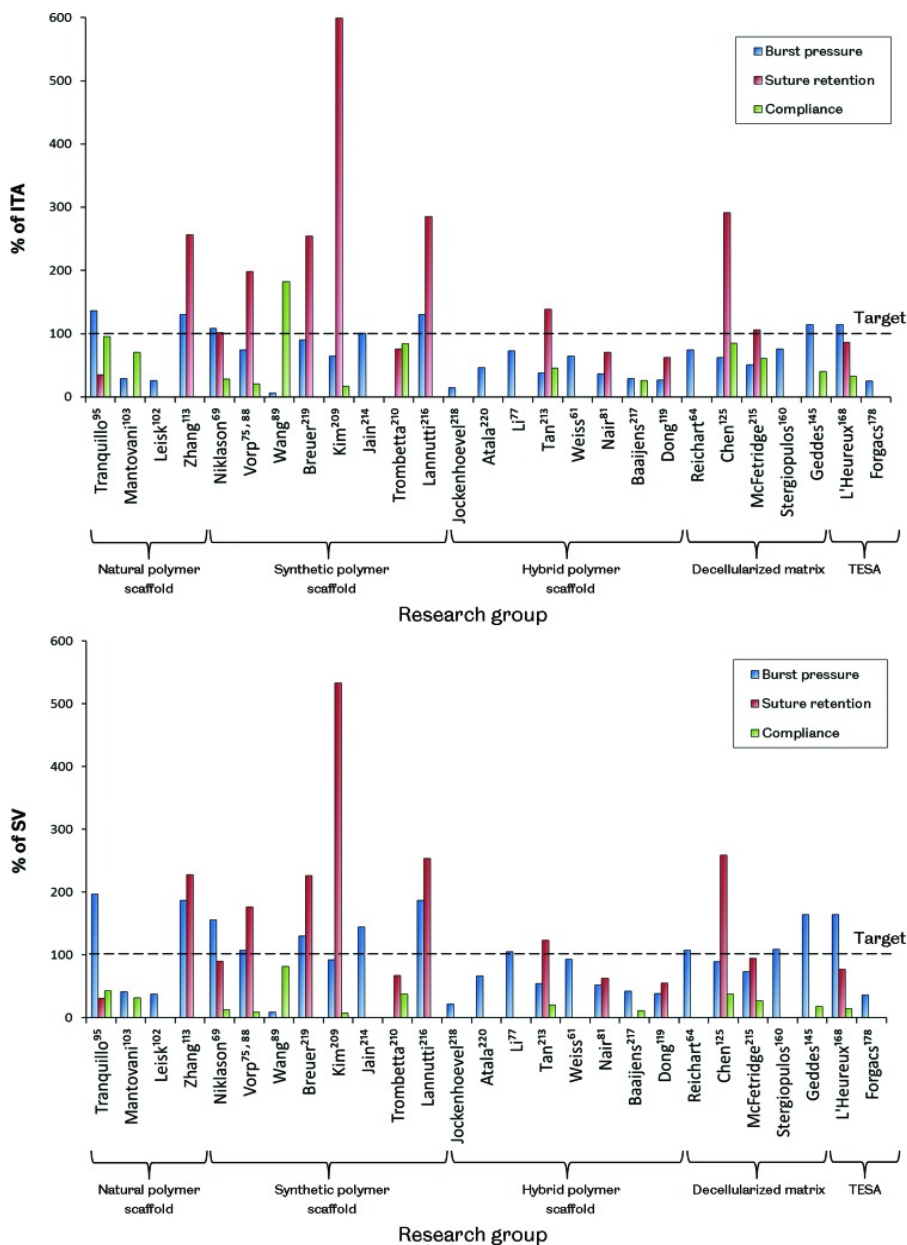


Figure 27 : Propriétés mécaniques de différents produits d'ingénierie vasculaire

(Pashneh-Tala *et al.* 2015)

Pashneh-Tala *et al.* ont étudié la suturabilité de différents substituts vasculaires en fonction de leur nature : naturelle, synthétique, hybride, matrice décellularisée ou matrice obtenue par auto-assemblage (Pashneh-Tala *et al.* 2015). Ces valeurs ont été ensuite rapportées aux valeurs de suturabilité de l'artère thoracique interne (%ITA) et de la veine saphène (%SV). Ces résultats mettent en évidence, des valeurs de suturabilité en moyenne supérieures pour les matrices synthétiques et relativement faibles pour les matrices naturelles. La suturabilité semble améliorée lorsque les matrices naturelles sont combinées à des matrices synthétiques (matrices hybrides) (*Figure 27*) (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

2.1.3 Résistance à la traction

Les tests de traction uniaxiale permettent d'obtenir une multitude de données. Deux grands paramètres peuvent être étudiés : la résistance à la traction longitudinale et circumférentielle.

2.1.3.1 Résistance à la traction longitudinale

Le test de résistance à la traction longitudinale peut être réalisé sur tous types de prothèses. Il consiste à placer longitudinalement un échantillon de prothèse entre les mâchoires d'un dynamomètre. L'échantillon est ensuite étiré à vitesse constante jusqu'à la rupture. Le point caractéristique de l'essai est le point de rupture (Yield point). La force et l'allongement caractérisant l'échantillon sont relevés au niveau de ce point (*Figure 28*) (Dieval *et al.* 2001).

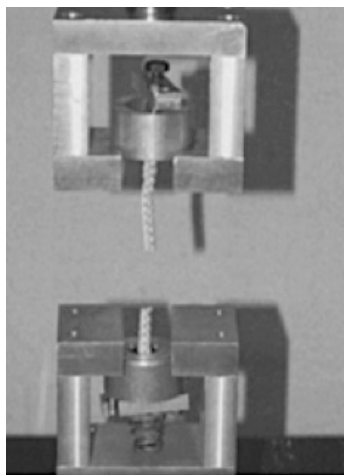


Figure 28 : Dispositif pour tester la résistance à la traction longitudinale

(Dieval et al. 2001)

La norme ISO 7198 :1998 indique que la vitesse de déplacement de la traverse peut être comprise entre 50 et 200 mm/min. Cependant, cette variation peut induire un biais dans la comparaison des différentes prothèses. La charge maximale supportée par l'échantillon est également mesurée. Elle est influencée par le périmètre de la prothèse. Il est donc préconisé de rapporter cette charge maximale au diamètre de la prothèse. Ce test nécessite la mise au point de pinces adaptées pour éviter le glissement ou la rupture de la prothèse au niveau de l'insertion des pinces. Le test de résistance à la traction longitudinale permet d'obtenir des courbes charge-déplacement, qui permettent elles même de calculer les courbes contrainte-déformation (*Figure 29*) (Lim and Hoag 2013).

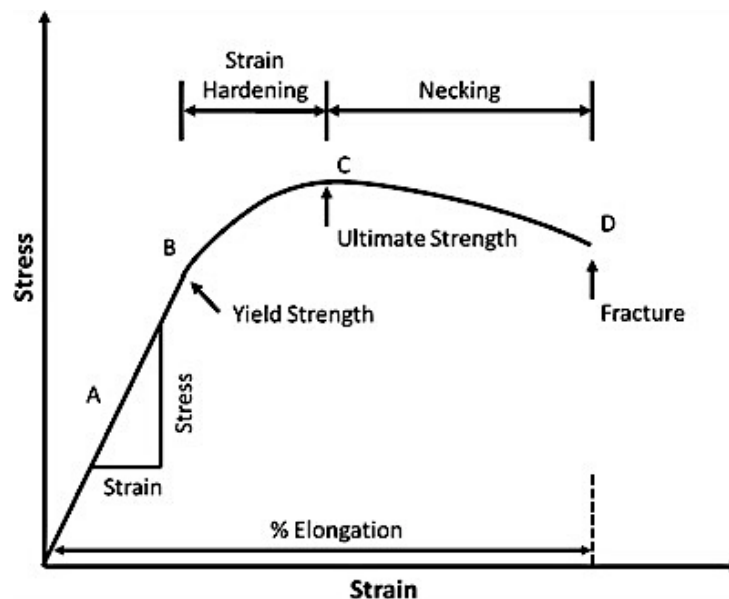


Figure 29 : Courbe contrainte-déformation calculée à partir d'un essai de traction longitudinale

(Lim and Hoag 2013)

La partie élastique d'un matériau se définit comme la gamme de déformation qui n'engendre aucune déformation plastique. La plupart des matériaux ont une partie élastique qui est linéaire. Le module élastique est alors défini comme étant la valeur du coefficient directeur de la relation linéaire entre la contrainte et la déformation résultante aux petites déformations. Le module élastique est relié à la rigidité du matériau et correspond à sa capacité à se déformer de manière élastique lors d'une sollicitation mécanique. La limite d'élasticité est la charge à partir de laquelle la déformation du matériau est irréversible. Cette valeur correspond à la zone de la courbe où la relation contrainte-déformation n'est plus linéaire. Au delà de la limite d'élasticité, la résistance à la traction correspond au maximum de contrainte que peut subir le matériau lors de la sollicitation mécanique. La ténacité est

mesurée par l'aire totale sous la courbe contrainte-déformation et correspond à l'énergie qu'il faut apporter au système pour qu'une microfissure se propage au sein du matériau.

Les vaisseaux sanguins présentent une viscoélasticité et des courbes contrainte-déformation en forme de J (*Figure 30*) (Pashneh-Tala *et al.* 2015). Ces propriétés sont liées à celles des différentes protéines qui forment les parois des vaisseaux. Les faibles déformations ne produisent que de faibles changements de contraintes et correspondant à la réponse des fibres d'élastine. Au fur et à mesure que la déformation augmente, la contrainte augmente, liée à la réponse des fibres de collagène (Pashneh-Tala *et al.* 2015). Le module élastique des artères humaines est en moyenne de 1,5 MPa (Berglund *et al.* 2005, Tajaddini *et al.* 2005, Koobatian *et al.* 2016).

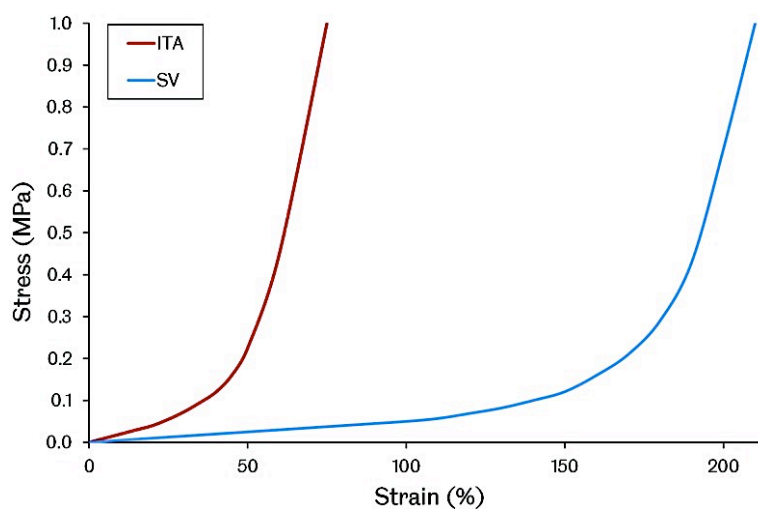


Figure 30 : Courbes contrainte-déformation

obtenues pour l'artère thoracique interne (ITA) et la veine saphène (SV) (Pashneh-Tala et al. 2015)

Une analyse de la littérature met en évidence des valeurs de module d'élasticité très variables, en fonction des matrices produites. Soletti *et al.* ont élaboré des substituts à partir de polycaprolactone et ont obtenu un module élastique proche de celui des vaisseaux natifs ($1,4 \pm 0,4$ MPa) (Soletti *et al.* 2010). Selon Zhu *et al.*, les valeurs du module élastique des prothèses en ePTFE possèdent des valeurs importantes ($54,7 \pm 5,2$ MPa) (Zhu *et al.* 2015). Roh *et al.* ont produit des matrices synthétiques à partir d'acide polyglycolique et d'acide polylactique avec des valeurs de module élastique respectives de $33,0 \pm 7,0$ MPa et $24,0 \pm 5,9$ MPa (Roh *et al.* 2008). Schneider *et al.* ont quant à eux calculé le module de matrices produites par décellularisation de chorion placentaire et obtenu des valeurs de $3,65 \pm 0,93$ MPa (Schneider *et al.* 2016).

2.1.3.2 Résistance à la traction circonférentielle

Comme pour le test de résistance à la traction longitudinale, le test de résistance à la traction circonférentielle peut s'appliquer à tout type de prothèse. Ce test consiste à placer un échantillon tubulaire sur deux demi-cylindres de même diamètre que celui de la prothèse. Les deux demi-cylindres sont étirés à vitesse constante jusqu'à rupture de l'échantillon (*Figure 31*) (Dieval *et al.* 2001). La force obtenue à la rupture est normée pour s'affranchir de la longueur du matériau qui subit la sollicitation. Cette longueur est égale à deux fois la longueur initiale de la prothèse en l'absence d'ondulation de la paroi (cosselage). On obtient alors un paramètre en N/mm (Dieval *et al.* 2001). La norme préconise une vitesse de déplacement de la traverse entre 50 et 200 mm/min.

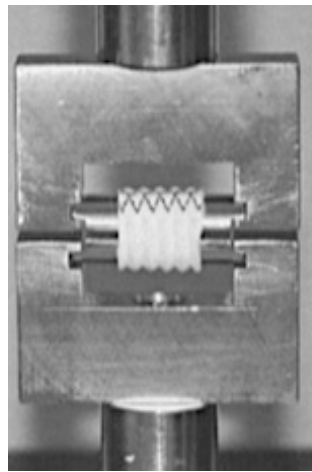


Figure 31 : Dispositif pour tester la résistance à la traction longitudinale

(Dieval *et al.* 2001)

Holzappel *et al.* ont utilisé les 3 tuniques (intima, média et adventice) de 13 artères coronaires humaines dans des essais de traction dans les directions axiale et circonférentielle (*Figure 32*) (Holzapfel *et al.* 2005). Des courbes contrainte-déformation ont été obtenues. Pour chacune des tuniques, il existait une différence significative entre la courbe de l'essai dans la direction axiale (longitudinale) et celle dans la direction circonférentielle. Cette différence très marquée indiquait une forte anisotropie dans chacune des couches. Pour l'intima et l'adventice la direction circonférentielle était celle où l'étirement était le plus important, alors que pour la média, ce phénomène était observé dans la direction axiale (longitudinale). Dans la direction axiale comme dans la direction circonférentielle, la média présentait la courbe la plus basse. Le Dacron et le ePTFE sont également des matériaux anisotropes (Tai *et al.* 2000).

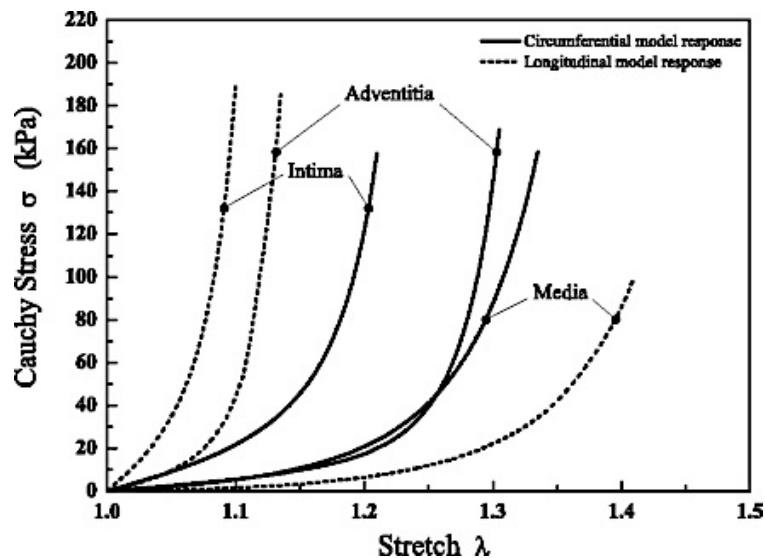


Figure 32 : Courbes contrainte-déformation obtenues pour les 3 tuniques (adventice, média, intima) dans les directions circonférentielles et longitudinales (Holzapfel et al. 2005)

Le critère d'anisotropie est souvent recherché en ingénierie vasculaire. Ainsi, après la production matricielle, plusieurs auteurs ont établi les courbes contrainte-déformation du matériau obtenu dans les directions circonférentielles et longitudinales et ont mis en évidence un caractère anisotropique de leur matériau (Soletti *et al.* 2010, Mauri *et al.* 2013).

2.1.4 Compliance

La compliance artérielle est définie comme la fonction d'amortissement par les troncs artériels de la pulsatilité artérielle générée par l'éjection cardiaque intermittente. Elle représente une mesure de la capacité de distension d'une structure déterminée. La compliance est liée à la capacité de dilatation et de contraction circonférentielle élastique d'une prothèse en réponse à la pression pulsatile. Elle correspond à la variation du diamètre interne sous l'influence d'une variation de pression. Elle reflète la capacité des vaisseaux artériels à s'adapter aux variations de pression sanguine et l'élasticité du vaisseau qui repose sur les fibres élastiques de la média. Il est reconnu que les substituts biologiques ont une compliance bien supérieure à celles des matériaux prothétiques et il existe une relation directe entre compliance et taux de perméabilité, au sens clinique du terme (*Figure 33*) (Salacinski *et al.* 2001).

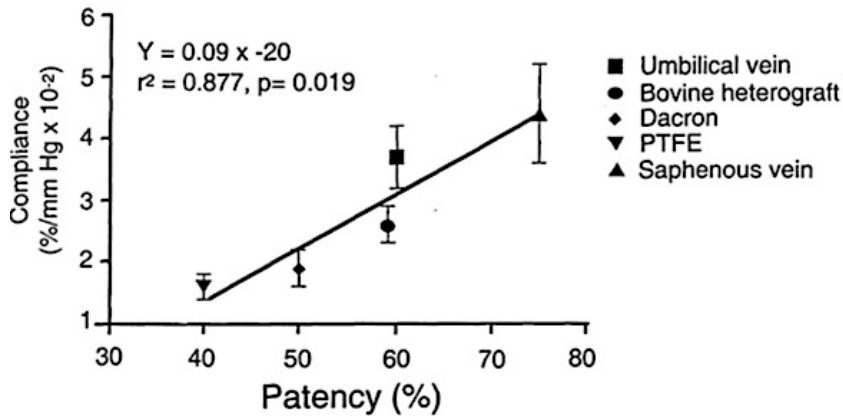


Figure 33 : Relation compliance / perméabilité des substituts vasculaires

(Salacinski et al. 2001)

La non-adéquation de compliance entre artère native et substitut vasculaire lors de pontages est à l'origine de thromboses observées lors du remplacement des vaisseaux de petit calibre. Les anastomoses sont les zones les plus difficiles à contrôler en terme de compliance, car elles sont le siège de fortes variations de compliance. En effet, au niveau de l'anastomose, la compliance chute de façon importante (Figure 34) (Sarkar et al. 2006). A 5 mm de part et d'autre de l'anastomose, on distingue des zones péri-anastomotiques, où la compliance est fortement augmentée (Figure 34A). Le ePTFE, comparé à l'artère possède une faible compliance, une des raisons expliquant son inadéquation pour les vaisseaux de petits calibres (Figure 34B).

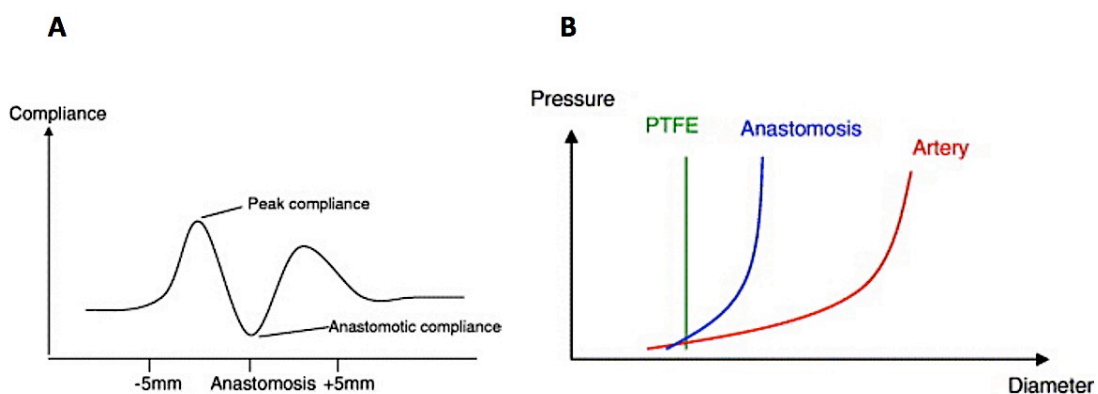


Figure 34 : Evolution de la compliance en fonction de la localisation (A) et du substitut utilisé (B)

(Sarkar et al. 2006)

Ainsi, la compliance d'un substitut vasculaire doit impérativement être déterminée avant l'implantation *in vivo*. Pour estimer la compliance des prothèses, il est important de pouvoir estimer avec précision l'évolution du volume intraluminal de la prothèse sous des charges de pression variables. Il convient de reproduire le plus fidèlement possible les ondes de pression générées par le flux sanguin et d'analyser les variations de dimensions des prothèses à tester. Selon la norme la norme ISO 7198 : 1998, l'appareillage de mesure doit contenir un système permettant de générer un flux pulsé à l'intérieur de la prothèse, un dispositif de mesure de la pression capable de mesurer des pressions pouvant aller jusqu'au 200 mmHg avec une précision de ± 2 mmHg et un système capable de mesurer le diamètre avec une précision de $\pm 0,02$ mm. Le test doit être réalisé sur des échantillons de longueur fixe (longueur supérieure à 10 fois son diamètre) à une température de $37 \pm 2^\circ\text{C}$. L'utilisation d'un ballon introduit à l'intérieur peut être utilisé. A une pression de 120 mmHg, ce ballon doit avoir un diamètre au moins 1,05 fois supérieur à celui du diamètre nominal de la prothèse à tester. Le fluide de circulation peut être l'eau distillée, mais d'autres liquides peuvent être envisagés. Ainsi, pour évaluer la compliance, on soumet un segment de prothèse maintenu sous tension (de 0,294 N à 0,588 N) à une pression cyclique d'eau suivant une fréquence de 60 battements par minute (± 10 battements par minute) en couvrant trois plages de pression avec un minimum et un maximum: 50-90 mmHg, 80-120 mmHg et 110-150 mmHg. La compliance dynamique périphérique traduit la variation relative de diamètre sous charge dynamique cyclique (rapportée à 100 mmHg). Elle est calculée à partir du diamètre interne selon la formule : $C = [(D_{\text{sys}} - D_{\text{dia}}) / D_{\text{dia}}] / [P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}}] \times 10^4$, où D_{sys} correspond au diamètre systolique, D_{dia} au diamètre diastolique, P_{sys} à la pression intraluminale systolique et P_{dia} : pression intraluminale diastolique). De nombreux dispositifs expérimentaux ont été proposés dans la littérature, tels que les systèmes de mesure utilisant des techniques d'imagerie (incluant capteur de pression et caméra CCD) (Chen *et al.* 1999), un système d'échographie (Tai *et al.* 2000) et un interféromètre laser (Marelli *et al.* 2010).

Cependant, l'évaluation de la compliance pré-implantation reste le critère le moins important (Konig *et al.* 2009). En effet, les processus de remodelage des vaisseaux ont des effets importants sur la valeur de la compliance calculée (Opitz *et al.* 2004). Ainsi, dans l'essai clinique de L'Heureux *et al.*, la compliance augmente de 2% à environ 9% pour 100 mmHg au cours des six premiers mois sans dilatation concomitante (L'Heureux *et al.* 2007). Cette hausse de la compliance pourrait être associée à la migration ou à la transdifférenciation des cellules musculaires lisses (L'Heureux *et al.* 2006).

2.1.4.1 Résistance à l'éclatement

Il s'agit d'évaluer la résistance de la prothèse sous haute pression, sachant que la pression sanguine peut augmenter, notamment dans des conditions pathologiques. Les valeurs de pression artérielle normales sont comprises entre 140 et 90 mmHg pour la pression systolique et entre 90 et 50

mmHg pour la pression diastolique. Pour les cas les plus graves d'hypertension artérielle (hypertension de grade 3), les valeurs de pression systoliques sont supérieures ou égales à 180 mmHg et celles de la pression diastolique supérieure ou égale 110 mmHg.

Il existe trois méthodes pour évaluer la résistance à l'éclatement. Le premier principe consiste à utiliser un corps solide. C'est la méthode de l'éclatement par sonde. L'échantillon est maintenu sur la partie basse d'un dynamomètre dans une pince qui laisse apparaître par un orifice la membrane de la prothèse. Un doigt hémisphérique est fixé sur la traverse mobile. En descendant, le doigt va appliquer une pression sur l'échantillon. Il est descendu jusqu'à l'éclatement de l'échantillon. La force à l'éclatement caractérise la résistance de la prothèse. Le second principe de mesure de la résistance à l'éclatement stipule que la pression appliquée à la surface de l'échantillon doit être uniforme. Le test consiste à placer un fragment de prothèse au-dessus d'un diaphragme. La pression exercée par l'intermédiaire d'un fluide sur le diaphragme est immédiatement transmise à l'échantillon. La pression est progressivement augmentée jusqu'à l'éclatement. La résistance est caractérisée par la pression d'éclatement. La dernière méthode est l'éclatement sous pression. Elle consiste à soumettre un fragment de prothèse à une pression interne de fluide ou de gaz, augmentée jusqu'à l'éclatement de l'échantillon. Comme précédemment, la résistance est caractérisée par la pression d'éclatement.

Pour les vaisseaux natifs, les valeurs moyennes de résistance à l'éclatement des vaisseaux natifs sont de 3073 mmHg pour l'artère thoracique interne et de 2134 mmHg pour la veine saphène (Pashneh-Tala *et al.* 2015). La résistance à l'éclatement de certaines prothèses en ePTFE a été mesuré à 1850-2050 mmHg, valeur plus grande que toute pression sanguine physiologique possible (Chen *et al.* 1999).

2.2 Propriétés biologiques requises pour un substitut vasculaire

Dans des conditions physiologiques, le sang entre en contact avec l'endothélium de la surface luminale, qui est tapissé d'une monocouche de cellules endothéliales et présente des propriétés anticoagulantes et antithrombotiques. L'utilisation d'un substitut vasculaire représente l'introduction d'une surface étrangère dans la circulation. Si un endothélium fonctionnel n'est pas recréé, les interactions sang-biomatériau peuvent déclencher une cascade d'évènements biologiques, y compris l'adsorption des protéines, l'activation et l'adhésion des plaquettes et leucocytes, l'activation du complément et de la coagulation. Ces phénomènes biologiques sont fortement liés entre eux (*Figure 35*) (Kwee and Mooney 2015).

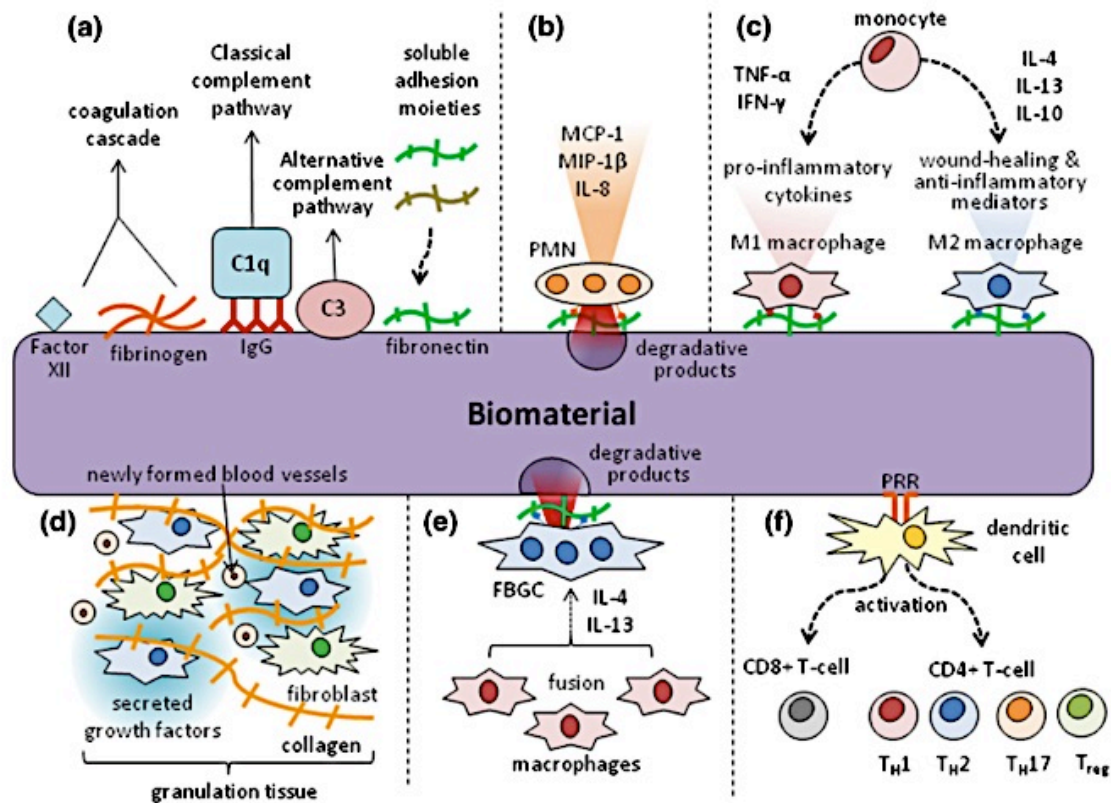


Figure 35 : Cascade des événements biologiques possibles après implantation d'un biomatériau

(Kwee and Mooney 2015)

Dès les premières secondes, après l'implantation du biomatériau, les protéines du tissu environnant et du sang (facteur XII, le fibrinogène, IgG, fibronectine, *etc.*) sont adsorbés à la surface du biomatériau pouvant activer la cascade de la coagulation et du complément, les plaquettes et les cellules immunitaires (Figure 35a). Les cellules de la phase inflammatoire aiguë, les polynucléaires, sont ensuite recrutées et libèrent des produits de dégradation, tels que les enzymes protéolytiques et les ROS et sécrètent des chimioattracteurs et des facteurs d'activation pour les cellules immunitaires (MCP-1, MIP-1b, Interleukine-8) (Figure 35b). Les macrophages dérivés de monocytes circulants, sont alors recrutés sur le matériau et sécrètent des cytokines inflammatoires (TNF α , Interleukine-6, MCP-1) pouvant induire un nouveau recrutement de cellules immunitaires. Selon le matériau, ces macrophages exprimeront principalement l'un des deux états de polarisation, le phénotype M1 ou M2. Le phénotype M1 correspondant à un profil sécrétant des cytokines proinflammatoires généralement associé à une inflammation chronique. Les macrophages de phénotype M2 peuvent produire des facteurs de croissance et des cytokines régulatrices, associés à un profil anti-inflammatoire (Figure 35c). Les facteurs de croissance libérés par les macrophages sont responsables de la formation de tissu de granulation, composé de fibroblastes et de vaisseaux sanguins nouvellement formés (Figure 35d).

La sécrétion non contrôlée de facteurs de croissance par les macrophages peut aboutir à l'activation prolongée des fibroblastes à la production excessive de collagène par les fibroblastes pouvant aboutir à la fibrose. À la surface du biomatériau, ces macrophages peuvent également former des cellules géantes à corps étranger (*Figure 35e*). Enfin, les cellules dendritiques peuvent activer via le récepteur PPR les lymphocytes T cytotoxiques et favorise les réponses des cellules T auxiliaires (Th1, Th2, Th17 ou Treg) en fonction de leur microenvironnement (*Figure 35e*).

Lors de l'implantation d'un biomatériau, les événements biologiques doivent être maîtrisés et contrôlés. Le biomatériau utilisé doit induire une réponse appropriée de l'hôte afin d'obtenir une intégration optimale du biomatériau. La biocompatibilité des biomatériaux est alors une notion fondamentale. Elle a été définie de façon consensuelle sous l'égide d'une société scientifique (European Society for Biomaterials), comme la « capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ». La biocompatibilité intègre différentes notions, telles que l'absence de toxicité du matériau pour l'organisme (cytotoxicité, génotoxicité et carcinogénèse, toxicité systémique).

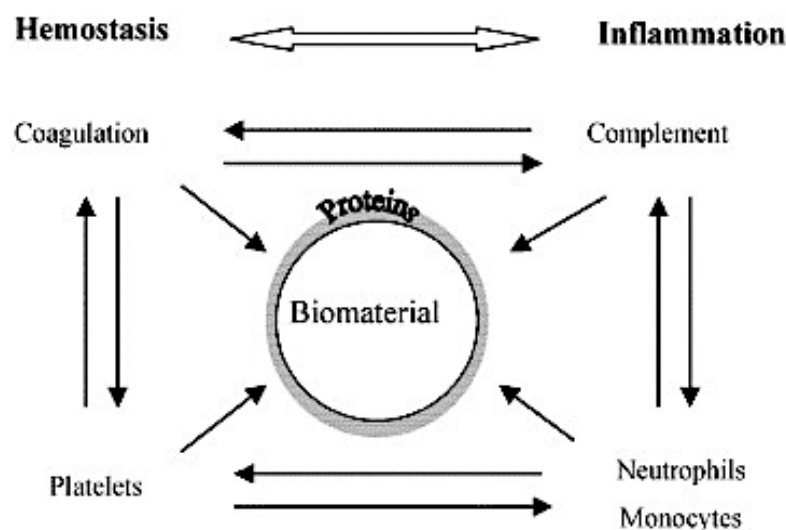


Figure 36 : Interaction hémostase –inflammation

(Gorbet and Sefton 2004)

L'évaluation biologique des dispositifs médicaux est actuellement régie par la norme ISO 10993, composée de 18 parties et décrivant les essais à réaliser pour l'évaluation de la biocompatibilité de ces dispositifs. La biocompatibilité idéale est toujours difficile à atteindre et il faut souvent tendre vers un compromis cliniquement acceptable. Les matériaux, destinés à être au contact du sang, implique la satisfaction d'exigences particulières en terme de biocompatibilité recouvertes notamment

par la notion d'hémocompatibilité. L'inflammation est également un paramètre important à évaluer, car elle est en lien direct avec l'hémostase. En effet, lors de l'implantation d'un biomatériau, l'implication de la cascade de la coagulation, des plaquettes, des neutrophiles et du complément induit une interaction directe entre hémostase et inflammation (*Figure 36*) (Gorbet and Sefton 2004).

2.2.1 *Substitut vasculaire et hémocompatibilité*

Les substituts vasculaires synthétiques utilisés actuellement (Dacron, ePTFE) ne permettent la régénération d'un endothélium fonctionnel. Ils disposent donc d'une faible hémocompatibilité, à l'origine de complications (hyperplasie intimale, thrombose) et de nombreux échecs thérapeutiques dans le remplacement des vaisseaux de petit calibre. L'hémocompatibilité est donc un critère fondamental pour les produits issus de l'ingénierie vasculaire. L'hémocompatibilité rend compte de l'interrelation dynamique entre une surface artificielle et les réactions de défense non spécifique du sang. L'évaluation de l'hémocompatibilité est actuellement régie par la norme internationale NF EN ISO 10993- partie 4 (évaluation biologique des dispositifs médicaux - sélection des tests d'interactions avec le sang), qui aborde 5 paramètres: hématologie, thrombose, coagulation, plaquettes et système du complément. Les normes américaines ASTM F2888-13 et ASTM F 756-00 sont également utilisées pour l'évaluation de la formation de thrombus et de l'hémolyse, respectivement.

L'évaluation de l'hémocompatibilité est effectuée en contact direct ou indirect avec le sang à l'aide de différents tests *in vitro*. L'utilisation du sang humain est plus pertinente car la composition du sang diffère considérablement entre différentes espèces, ce qui entraîne une surestimation ou une sous estimation des réactions sanguines humaines aux biomatériaux (van Oeveren 2013). Un autre déterminant clé à prendre en compte est l'influence des contraintes de cisaillement. En effet, les vaisseaux sanguins subissent en permanence les contraintes engendrées par le flux sanguin pulsatile et plus particulièrement les contraintes de cisaillement, qui ont grand impact sur l'endothélium et la balance hémostatique (*cf. partie 1.1.1 Physiologie de la paroi artérielle normale*). La valeur de la contrainte de cisaillement (τ) peut être calculée par la formule suivante : $\tau = 32Q\eta/(\pi D^3)$ où Q est le débit, η est la viscosité et D est le diamètre du vaisseau. La contrainte de cisaillement est augmentée en regard des anastomoses et l'hémocompatibilité des substituts est alors impactée. Enfin, même si le modèle *in vitro* est très intéressant, il peut être aussi être considéré comme le pire des cas, car les produits d'activation s'accumulent sans être éliminés par les reins ou le foie ou d'autres organes (van Oeveren 2013).

2.2.1.1 *Exploration de l'hémostase*

2.2.1.1.1 *Exploration de l'agrégation et de l'activation plaquettaire*

Physiologie de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire correspond aux mécanismes initiaux mis en jeu pour arrêter l'hémorragie survenant au niveau d'une plaie et consiste principalement en l'activation des plaquettes. Ces dernières sont des cellules anucléées, en forme de disque, d'un diamètre de 3 à 4 μm . Elles sont dérivées de mégacaryocytes de la moelle osseuse. Dans des conditions physiologiques, elles circulent dans le sang dans un état inactif, maintenu par la prostaglandine I₂ sécrétée par l'endothélium. Le processus hémostatique physiologique est déclenché par une perturbation de la paroi vasculaire et par l'exposition des composants sous-endothéliaux (*Figure 37*) (Gresele *et al.* 2008).

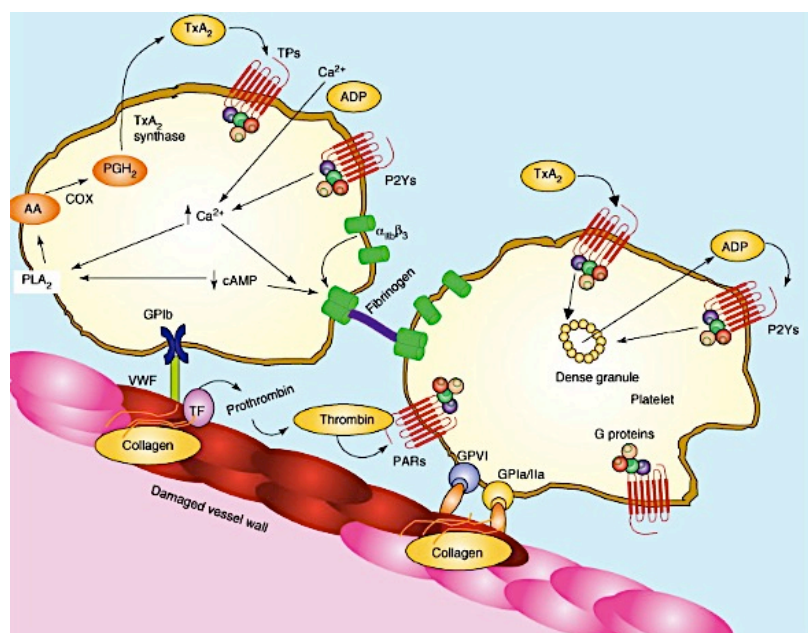


Figure 37 : Mécanismes plaquettaires lors de l'hémostase primaire

(Gresele *et al.* 2008)

Trois grandes fonctions contribuent aux propriétés hémostatiques des plaquettes : leur capacité à adhérer à la surface d'un vaisseau lésé, à s'activer en réponse aux protéines matricielles et à des agonistes solubles et à s'agréger entre elles pour former le clou hémostatique (Jackson 2011). L'adhérence initiale des plaquettes est sous dépendance du facteur de Willebrand qui se lie à la GP Ib-IX et à la GP IIb-IIIa. La GP Ib-IX est exprimée de façon constitutive à la surface des plaquettes au repos, elle ne se lie au facteur Willebrand qu'après interaction avec la matrice sous-endothéliale. Cette liaison entraîne, par la portion cytoplasmique du complexe GP Ib-IX, une activation des filaments

d'actine résultant en une contraction des plaquettes avec formation de pseudopodes. Après adhésion, les plaquettes sont activées par le collagène sous-endothélial et par la thrombine générée à leur surface. Les plaquettes interagissent avec le collagène par la GP Ia-IIa et avec la thrombine par son récepteur fonctionnel. La thrombine active les plaquettes par l'intermédiaire de protéines G couplées au récepteur de la thrombine (protéine G_p, qui active la phospholipase C et protéine G_i, qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et réduit le taux d'AMPc). L'augmentation du calcium cytosolique et l'activation de la protéine kinase C ont pour conséquence l'activation de la phospholipase A, qui clive l'acide arachidonique des phospholipides membranaires en prostaglandines G₂, puis H₂ par la cyclo-oxygénase. La PGH₂ est convertie en thromboxane A₂, puis thromboxane B₂ inactive, dont les métabolites sont excrétés par l'urine. L'activation plaquettaire entraîne la contraction des microtubules et la libération du contenu des granulations endogènes. Les plaquettes activées sécrètent du thromboxane A₂, le contenu de leurs granules denses contenant l'ADP et celui des granules alpha contenant le facteur de Willebrand, la thrombine et d'autres facteurs de croissance qui activent les CEs et d'autres plaquettes. La thrombine, le fibrinogène, le collagène et certaines molécules dérivées de cellules inflammatoires ou de plaquettes, telles que le facteur d'activation des plaquettes (PAF) ou la cathepsine G, sont également de puissants activateurs plaquettaires. L'activation plaquettaire entraîne un changement conformationnel de la GP IIb-IIIa, permettant la liaison à des protéines adhésives solubles telles que le fibrinogène ou le facteur de Willebrand et provoquant une agrégation plaquettaire (Gresele *et al.* 2008).

Les plaquettes peuvent également être activées par les contraintes de cisaillement. En effet, il a été largement démontré que des contraintes de cisaillement élevées pouvaient stimuler les plaquettes et les cellules endothéliales (Nobili *et al.* 2008, Hosseinzadegan and Tafti 2017). Une contrainte de cisaillement élevée entraîne un dépôt de plaquettes plus important et un dépôt de fibrine plus faible. Un flux turbulent peut également induire une agrégation plaquettaire même en l'absence de tout autre facteur exogène (Gorbet and Sefton 2004).

Plaquettes et biomatériaux

Les complications thrombotiques liées aux substituts vasculaires sont connues pour être liées à leur capacité à activer les plaquettes. Les protéines rapidement adsorbées à la surface du biomatériau, en particulier le fibrinogène, jouent un rôle essentiel dans l'adhésion plaquettaire (Gorbet and Sefton 2004). La réponse plaquettaire est influencée par les caractéristiques physiques de surface et la composition chimique du biomatériau (Xu *et al.* 2014). Ainsi, il a été démontré qu'une rugosité du matériau pouvait entraîner une diminution de l'adhérence plaquettaire lorsque les surfaces utilisées sont hydrophiles et une augmentation avec des surfaces hydrophobes (van Oeveren 2013).

L'analyse des plaquettes est un élément clé dans l'évaluation de l'hémocompatibilité des substituts vasculaires. Plusieurs outils sont décrits dans la littérature pour évaluer l'activation plaquettaire *in vitro* : la microscopie à force atomique pour calculer les forces de liaison entre les récepteurs GP IIb-IIIa et le fibrinogène (Samuel *et al.* 2015), la microscopie électronique à balayage pour mettre en évidence un éventuel changement de morphologie et la présence de fibrine (Leszczak and Popat 2014, Alexandre *et al.* 2015), l'aggrégomètre pour mesurer la cinétique d'agrégation des plaquettes sanguines (Fent *et al.* 2015, Samuel *et al.* 2015). Enfin, des marqueurs d'activation plaquettaire, tels que la p-sélectine, GP IIb-IIIa, β -TG, PF-4 et MMP-2, peuvent être mis en évidence par cytométrie en flux (Samuel *et al.* 2015), immunomarquage (de Torre *et al.* 2015, Samuel *et al.* 2015), zymographie (Leszczak and Popat 2014), western blot et test enzymatique par immunoabsorption (Leszczak and Popat 2014, Stang *et al.* 2014). Au regard de la littérature, selon les auteurs et selon les techniques employées, l'activation plaquettaire *in vitro* peut être étudiée en utilisant soit du plasma riche en plaquettes (Leszczak and Popat 2014, Stang *et al.* 2014, Alexandre *et al.* 2015, Samuel *et al.* 2015), soit des plaquettes lavées (Leszczak and Popat 2014, Fent *et al.* 2015, Samuel *et al.* 2015), soit du sang total (Leszczak and Popat 2014, de Torre *et al.* 2015), tous obtenus à partir de sang prélevé sur support citraté. Il est extrêmement important d'utiliser des plaquettes fraîchement préparées, provenant de donneurs sains et prélevé de façon atraumatique afin d'éviter leur activation (van Oeveren 2013).

Il ne semble pas exister de consensus concernant le temps de mise en contact avec l'échantillon à tester et les plaquettes à étudier. En effet, selon les études, ce temps peut varier de 20 minutes à 2 heures (Leszczak and Popat 2014, Stang *et al.* 2014, Alexandre *et al.* 2015, de Torre *et al.* 2015, Fent *et al.* 2015, Samuel *et al.* 2015). Cependant, il peut être impératif de limiter le temps de contact avec le sang dans un modèle *in vitro*. En effet, les produits d'activation s'accumulent sans être éliminés par les reins ou le foie ou d'autres organes. De plus, l'adhésion aux plaquettes est un phénomène très rapide, qui se déroule de quelques secondes à quelques minutes. Enfin, les résultats peuvent être biaisés par des effets indépendants de la matière, comme la dénaturation ou l'agrégation des protéines (van Oeveren 2013).

Etant donné l'importance des contraintes de cisaillement sur l'activité plaquettaire, des auteurs développent des modèles de flux pour recréer *in vitro* les contraintes hémodynamiques du sang. Ces systèmes sont ensuite utilisés lors de l'évaluation de l'hémocompatibilité des substituts vasculaires et plus particulièrement pour l'activation plaquettaire. Deux types de modèles de flux *in vitro* sont principalement utilisés: le système « Chandler Loop » et le système « roller pump closed-loop ». Le système « Chandler Loop » est constitué d'un tube partiellement fermé et rempli d'air. Lors de la rotation, les dispositifs dans le tube circulent de manière répétitive à travers l'interface air-liquide (Chandler 1958). L'utilisation de ce système peut induire des artefacts en raison des forces majeures appliquées aux éléments sanguins et de la dénaturation des protéines à l'interface air-liquide. Le

système « roller pump closed-loop » est un modèle efficace, mis seulement pour des temps courts de circulation. En effet, il entraîne des dommages intrinsèques au sang, réduisant la sensibilité et ne permettant pas une exposition prolongée au sang (*van Oeveren et al. 2012*). Pour surmonter les inconvénients de ces deux modèles précédents, le système « Hemobile » a été développé. Il se compose d'un dispositif mécanique simple qui génère un mouvement semi-circulaire. En outre, le tube ne contient pas d'air et il n'y a pas de dispositif mécanique de compression du tube. De cette façon, les dommages intrinsèques au sang sont réduits (*van Oeveren et al. 2012*). De nouveaux systèmes ont été développés comme le système « Hemocoater », qui ne provoquait pas de dommages sanguins et permettait une évaluation plus fiable de l'activation plaquettaire (*Boudot et al. 2016*).

2.2.1.1.2 Exploration de la coagulation

Physiologie de la coagulation

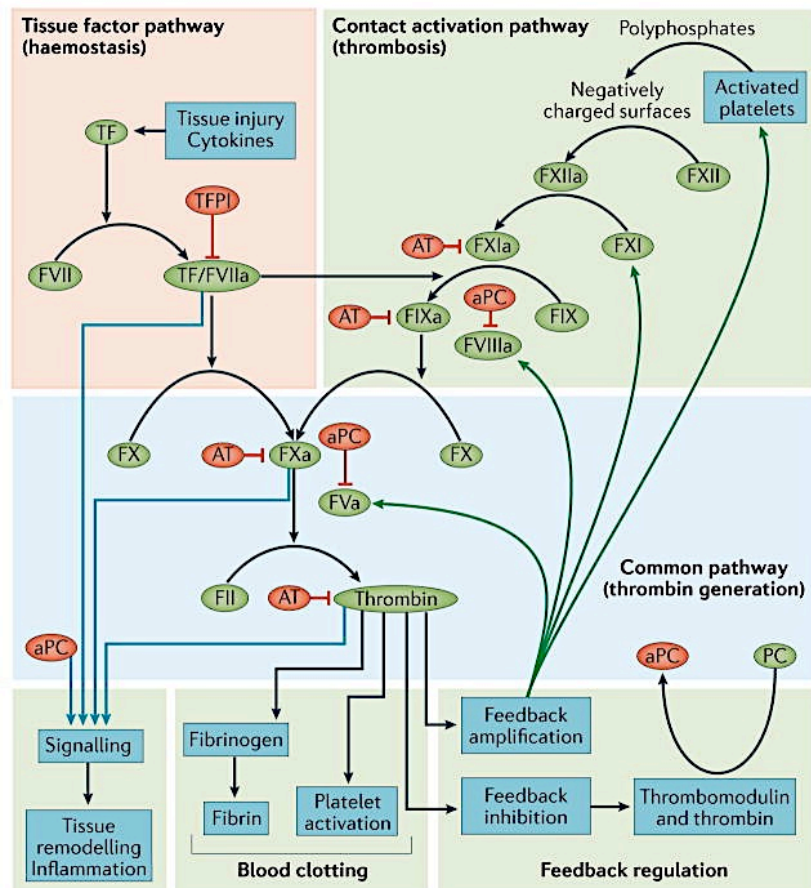


Figure 38 : Initiation et propagation de la coagulation

(Madhusudhan et al. 2016)

L'analyse de la coagulation est également une étape fondamentale dans l'évaluation de l'hémocompatibilité. Après la mise en place de l'hémostase primaire, des protéines circulantes sont activées en cascade. Il s'agit du phénomène de coagulation. Elle met en jeu 2 voies, extrinsèque et intrinsèque, chacune avec un mécanisme unique par lequel la coagulation est initiée. Les 2 voies aboutissent à la production de thrombine et induisent la transformation du fibrinogène en fibrine (*Figure 38*) (Madhusudhan *et al.* 2016). La voie extrinsèque constitue la phase d'initiation du processus de coagulation. Elle est initiée par l'exposition du FT, protéine transmembranaire absente du système vasculaire dans les conditions physiologiques. Lors d'une lésion de la paroi vasculaire et / ou de l'activation des cellules endothéliales, le FT est exposé au sang et se lie au facteur VII, permettant l'activation du facteur VII en facteur VIIa. Le complexe FT-FVIIa clive le facteur IX et le facteur X en facteur IXa et facteur Xa. La voie intrinsèque peut également être impliquée dans la cascade de la coagulation. La coagulation plasmatique peut, dans certaines conditions (infection, inflammation, activation de la cellule endothéliale) être activée sur une surface chargée négativement. Ce système d'activation met en jeu plusieurs protéines de la phase dite « contact » (facteurs XII, XI, kininogène, prékallitrène) et est en relation avec les protéines de l'inflammation. L'activation du facteur XII en XIIa conduit en cascade à l'activation du facteur XI en XIa puis du facteur IX en facteur IXa. Associé au facteur VIIIa le facteur IXa, permet l'activation du facteur X. La voie commune est constituée par le facteur Va et le cofacteur du facteur Xa. Le facteur Xa se complexe au facteur Va, formant le complexe de prothrombinase, qui clive le facteur II (prothrombine) générant la thrombine. La phase d'initiation est suivie de la phase d'amplification, dans laquelle la thrombine active le facteur V, le facteur VIII et le facteur XI. La cascade de la coagulation est régulée par différents mécanismes.

La plupart des facteurs d'activation de la coagulation sont des sérines protéases. Or, le plasma contient plusieurs inhibiteurs de la protéase, tels que l'inhibiteur de la protéase α_1 , l' α_2 -macroglobuline, le cofacteur II de l'héparine et l'antithrombine III. L'antithrombine III neutralise le facteur Xa et la thrombine est également capable d'inhiber les facteurs IXa, XIa et XIIa. Le complexe FT-VIIa est inhibé, quant à lui, par le TFPI. La majeure partie du TFPI se situe sur la surface luminale de l'endothélium et est libéré lors d'injection d'héparine. Les plaquettes portent également 10% du TFPI total, qui est libéré après stimulation par la thrombine et d'autres agonistes. Le TFPI peut également être libéré par les monocytes activés. Le TFPI comporte deux sites inhibiteurs, un pour le facteur Xa et un pour le complexe FT-VIIa. L'endothélium participe également à la régulation de la thrombose par la TM. La thrombine se lie à la TM, présentes sur les cellules endothéliales. Le complexe thrombine/TM active la protéine C, protéine dépendante de la vitamine K qui inactive le facteur Va et VIIIa. La protéine S, également une protéine dépendante de la vitamine K, est un cofacteur nécessaire pour la protéine C activée (Gorbet and Sefton 2004).

Coagulation et biomatériau

Lors de l'implantation d'un biomatériau, l'adsorption des protéines est le premier événement se produisant, pouvant entraîner l'activation de la voie intrinsèque. Le fibrinogène est la protéine adsorbée en plus grande quantité, davantage sur les surfaces hydrophobes qu'hydrophiles. Après le fibrinogène, se rajoutent sur la surface l'albumine, des γ -globulines, la fibronectine, des lipoprotéines, le facteur XII, le KPMH, la prékallikréine, le plasminogène, le complexe von Willebrand-facteur VIII (Gorbet and Sefton 2004). L'exploration de la coagulation est donc un paramètre important .

L'effet des biomatériaux sur l'activation de la voie extrinsèque ou intrinsèque peut être évalué. Plusieurs paramètres sont utilisés dans la littérature, le temps de céphaline activée (TCA), le taux de prothrombine (TP), le fibrinogène (FIB-C) et le temps de thrombine (TT) (Liu *et al.* 2017). Le TCA mesure le temps de coagulation après recalcification d'un plasma citraté appauvri en plaquettes et activation de la phase contact de la coagulation. La céphaline se substitue dans ce test aux phospholipides procoagulants plaquettaires. L'étude du TCA permet d'explorer la voie intrinsèque de la coagulation. Si le TCA d'un donneur sain diminue suite à un contact avec le biomatériau, le biomatériau peut être considéré comme activateur de la coagulation. Selon la norme ASTM F2382-04, on considère un biomatériau activateur de la coagulation, si le TCA est inférieur à 25% du TCA témoin. Le taux de prothrombine (TP) explore la voie directe (dite « extrinsèque ») de la coagulation. Le temps de Quick mesure le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, après recalcification et activation par une thromboplastine (source de FT et de phospholipides procoagulants). Le temps de Quick est ensuite exprimé en pourcentage de la normale, correspondant au TP. Le temps de thrombine (TT) est le temps de coagulation d'un plasma citraté en présence de thrombine. Il explore les premières étapes de la fibrinof formation (action protéolytique de la thrombine et polymérisation) soit le facteur I ou fibrinogène, mais pas la stabilisation du caillot par le facteur XIII (facteur de stabilisation de la fibrine). Enfin, la fonctionnalité du fibrinogène peut être analysée, par la technique chronométrique de Von Clauss : en présence d'un excès de thrombine et de concentrations faibles de fibrinogène, le temps de coagulation est proportionnel au fibrinogène « fonctionnel». Le temps mesuré est transformé en g/l grâce à une droite d'étalonnage effectuée avec un plasma témoin dont la concentration en fibrinogène est connue.

Les contraintes de cisaillement influencent également la cascade de la coagulation, en agissant notamment sur le facteur VIIa et la génération de thrombine. En effet, le facteur VIIa augmente avec la contrainte de cisaillement. A faible débit, une quantité significative de thrombine est produite après un long temps de latence (plus de 10 heures); à débit modéré, une génération significative de thrombine est produite en peu de temps (en quelques minutes); à fort débit, de faibles taux de thrombine sont produits en quelques secondes (Gorbet and Sefton 2004).

2.2.1.1.3 Exploration du thrombus

Physiologie de la thrombose

La formation de thrombus est la conséquence d'un comportement fonctionnel anormal de l'hémostase qui est constitué de quatre phases : la vasoconstriction (*Figure 39A*), l'hémostase primaire (*Figure 39B*) et secondaire (*Figure 39C*) et la fibrinolyse (*Figure 39D*) (Cito *et al.* 2013).

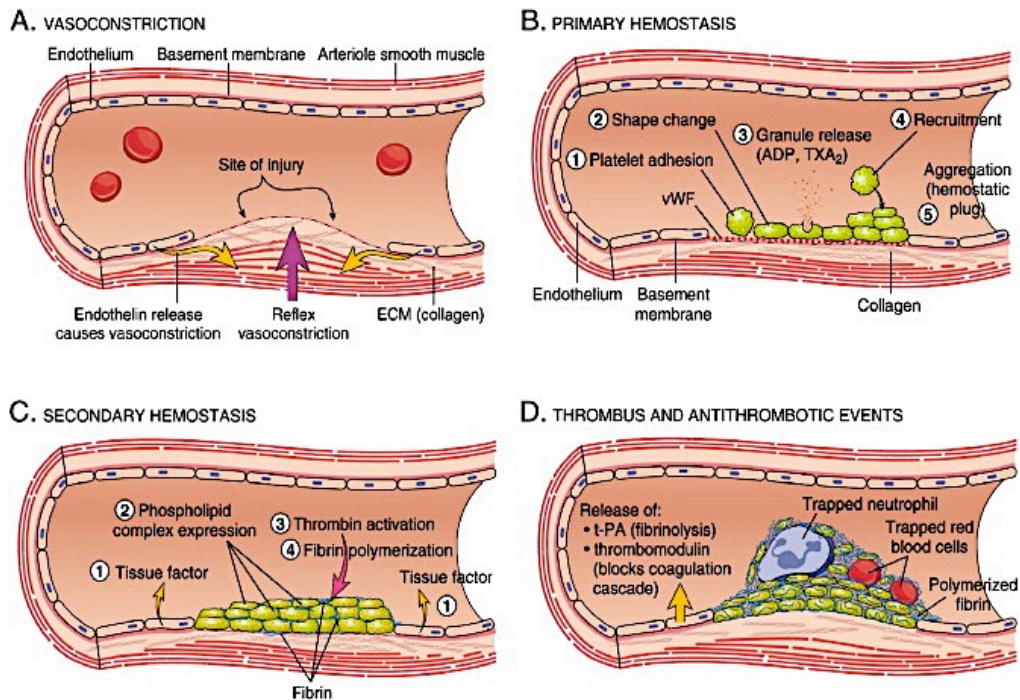


Figure 39 : Formation du thrombus

(Cito *et al.* 2013)

Histologiquement, la thrombose est une masse sanguine solide (le thrombus) adhérent ou non à la paroi et formée d'agrégats plaquettaires, de fibrilles de fibrine et de globules rouges en proportions variables selon les conditions. Un thrombus peut évoluer vers la résolution naturelle par fibrinolyse, processus permettant l'élimination des caillots, une fois l'hémostase atteinte. Le principal médiateur de la fibrinolyse est la plasmine, qui élimine la fibrine et produit des produits de dégradation de la fibrine. Ainsi, la fibrinolyse provoque la dégradation progressive du réseau de fibrine et favorise de manière concomitante la création de nouveaux tissus. Cependant, dans certaines conditions, le thrombus peut rester persistant dans l'intima et être graduellement transformé en tissu fibreux, contribuant à la progression d'une lésion pariétale préexistante, ou enfin à l'occlusion de la lumière vasculaire (Cito *et al.* 2013).

Dans des conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire a un rôle clé dans le maintien de la balance hémostatique, car les molécules sécrétées par l'endothélium agissent pour prévenir la formation des thrombi et réguler le tonus vasculaire. La production d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales permet d'inhiber l'adhésion, l'agrégation et la libération des granules plaquettaires. De plus, il inhibe l'adhérence et l'activation des leucocytes (Naghavi *et al.* 2013). Dans l'endothélium sain, le NO favorise la fibrinolyse par la régulation de l'activateur du plasminogène et de l'inhibiteur du plasminogène-1. La formation de thrombus est également inhibée par le TFPI, qui se lie et inactive le facteur Xa et le complexe FT/VIIa. La thrombomoduline bloque la coagulation en liant la thrombine et en stimulant l'activation de la protéine C, qui inactive les facteurs de coagulation VIIIa et Va, tandis que les protéoglycanes d'héparine sulfate servent de cofacteurs à l'inhibiteur de protéase antithrombine III, ce qui inhibe plusieurs facteurs de coagulation et la thrombine (*cf. partie 2.2.1.1.2 Exploration de la coagulation*) (Figure 40a) (Pober and Sessa 2007, Lavery *et al.* 2017). Le NO diminue également la prolifération des CMLs et la production d'ECM favorisant la vasodilatation (Figure 40b) (Pober and Sessa 2007, Lavery *et al.* 2017).

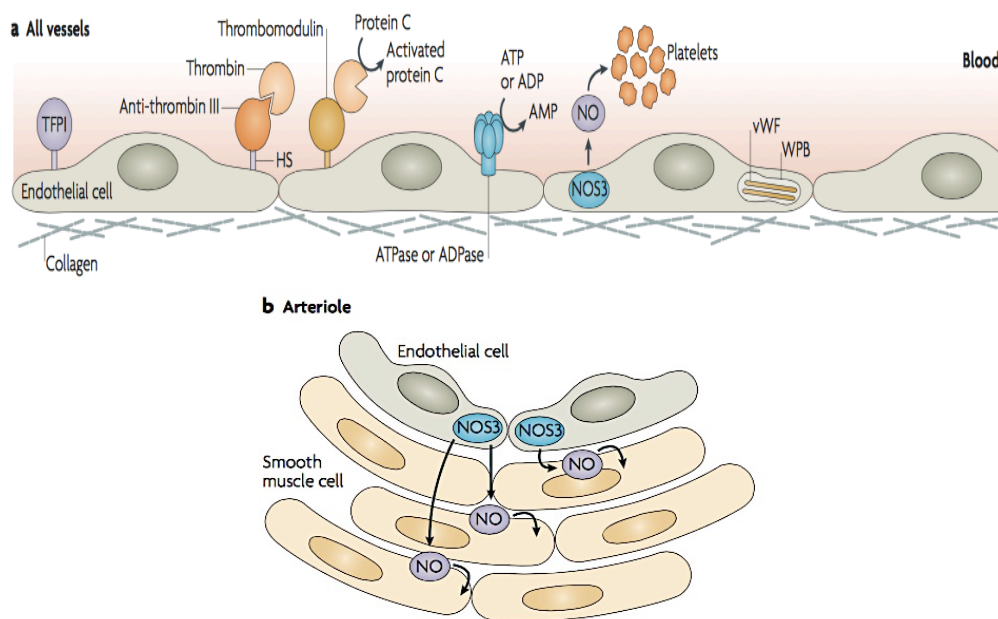


Figure 40 : Régulation de l'hémostase par l'endothélium

(Pober and Sessa 2007)

Le NO est produit par une famille d'enzymes, les NO-synthases, à partir d'un substrat commun, la L-arginine. Trois types de NO-synthases ont été caractérisés : la NO-synthase inductible macrophagique, la NO-synthase constitutive du système nerveux central et la NO-synthase constitutive spécifique de l'endothélium vasculaire. Au niveau de la paroi vasculaire et dans des

conditions physiologiques, la NO-synthase endothéliale (eNOS) est présente constitutivement dans l'endothélium. La NO-synthase inductible peut apparaître dans les cellules vasculaires en réponse à des stimuli pathologiques. Dans les cellules endothéliales, le NO est synthétisé lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline, une réaction qui est catalysée par la eNOS, assurant un faible taux basal de NO. La eNOS peut être activée de manière calcium-dépendante ou calcium-indépendente (*Figure 41*) (Zhao *et al.* 2015).

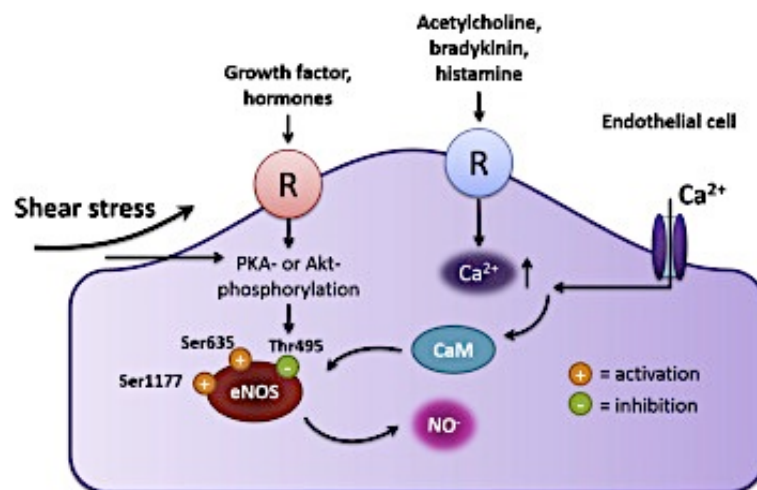


Figure 41 : Mécanisme de production du NO par les cellules endothéliales

(Zhao *et al.* 2015)

La eNOS peut être activée par l'intermédiaire d'agonistes, comme l'acétylcholine, la bradykinine et l'histamine. Ces derniers agissent sur des récepteurs spécifiques, situés sur la membrane des cellules endothéliales, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. L'augmentation des contraintes de cisaillement peut également accroître la concentration intracellulaire de calcium. En se fixant sur la calmoduline (CaM) présente sur la eNOS, le calcium provoque le déplacement de la liaison inhibitrice entre la eNOS et la cavéoline, rendant ainsi la eNOS fonctionnelle. La formation du complexe Ca^{2+}/CaM est essentielle à l'activation de la eNOS dite « Ca^{2+} dépendante » (Zhao *et al.* 2015).

La régulation de la eNOS peut également être obtenue par phosphorylation de différents résidus de la protéine. La eNOS peut notamment être phosphorylée sur des résidus sérine (Ser), thréonine (Thr). Les sites les plus reconnus dans la littérature sont l'activation de l'enzyme par phosphorylation du résidu Ser1177 et son inhibition par la phosphorylation du résidu Thr495 (Fleming 2010). Le résidu Ser1177 est phosphorylé par différentes kinases, en particulier Akt mais aussi par la PKA. Cette phosphorylation est stimulée par divers mécanismes dont principalement les contraintes de cisaillement (PKA et Akt dépendant), l'hypoxie, la stimulation β_3 -adrénergique et divers agonistes

(VEGF, insuline, oestrogènes, bradykinine). D'autres résidus sérines peuvent être impliqués telles que les Ser635 (Zhao *et al.* 2015). La NO synthase est ensuite responsable de la conversion de la L-arginine et de l'O₂ en NO, L-citrulline et H₂O.

Thrombose et Biomatériaux

La lésion endothéliale est fréquente lors de l'utilisation de dispositifs médicaux vasculaires, pouvant provoquer une inflammation et des conditions prothrombotiques. La régénération de l'endothélium vasculaire est souvent incomplète voir absente et les cellules endothéliales exposées au biomatériau peuvent présenter des propriétés physiologiques anormales, caractérisées par des phénotypes proinflammatoires et procoagulants. En outre, la perte de capacité des cellules endothéliales à produire certaines molécules, telles que le NO, entraîne une prolifération et migration des CMLs, contribuant à l'hyperplasie intinale. Bien qu'il existe des matériaux moins thrombogènes, tout matériau étranger implanté dans l'organisme déclenche un certain degré de thrombogénicité.

Pour évaluer la thrombogénicité des substituts vasculaires, en plus de l'évaluation de l'activation plaquettaire et de la cascade de la coagulation, les auteurs étudient le thrombus formé par microscopie (analyse de la taille) (Kealey *et al.* 2010) ou déterminent le poids du thrombus formé ou une analyse gravimétrique (poids du thrombus) (Remy *et al.* 2013), technique préconisée par la norme ISO 10-993 partie 4. Le NO et la balance FT/ TM, comme décrit ci-dessus, sont également des éléments clés à prendre en compte dans la prévention des thromboses. L'un des enjeux de l'ingénierie vasculaire est de créer des substituts permettant la régénération d'un endothélium fonctionnel. Ainsi, après avoir démontré la compatibilité des matériaux avec l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales et/ou musculaires lisses, les auteurs s'intéressent à la fonctionnalité des cellules endothéliales à travers l'étude de la production de NO, de FT et de TM. La production de NO est explorée dans la littérature à travers différentes techniques (Paul *et al.* 2011, Hoshi *et al.* 2013, Zhu *et al.* 2015). Les produits finis obtenus par dégradation du NO peuvent être dosés (nitrites/nitrates) par dosage colorimétrique (Griess) ou fluorimétrique (DAN). Cependant, ces techniques sont peu sensibles. Le NO peut être étudié grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes piégeant le NO. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le caractère très labile du NO (quelques secondes). Enfin, les phosphorylations de la NOSynthase peuvent être analysées par Western Blot. La balance FT/THBM est explorée à l'aide de différents tests : le dosage du facteur Xa (Tunstall *et al.* 1994, Rubens *et al.* 1997, Motlagh *et al.* 2006), du FT et de TM (She *et al.* 2007, Thébaud *et al.* 2010) par immunoadsorption enzymatique, la mise évidence de FT et TM par immunofluorescence et l'étude de l'activité de la protéine C.

2.2.1.2 *Exploration des éléments figurés du sang*

2.2.1.2.1 *Exploration de l'activation des leucocytes*

Lors de leur exposition à des surfaces artificielles, les leucocytes peuvent subir des modifications morphologiques et fonctionnelles. Ils sont les principaux acteurs dans la réponse inflammatoire suite à l'introduction de dispositifs cardiovasculaires (Gorbet and Sefton 2004).

En plus de leur rôle dans l'inflammation, les leucocytes sont étudiés lors de l'exploration de l'hémocompatibilité, car ils jouent un rôle dans l'hémostase. En effet, les leucocytes régulent la cascade de coagulation et interagissent avec les cellules endothéliales et les plaquettes. Dans des conditions physiologiques, les leucocytes favorisent le maintien de la fluidité du sang, en exprimant notamment le facteur anticoagulant du récepteur de la protéine C endothéliale (EPCR), la thrombomoduline (TM) et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI). Cependant, dans des conditions proinflammatoires ou apoptotiques, les leucocytes peuvent rapidement subir une transformation phénotypique, synthétisant et sécrétant des facteurs ou agents procoagulants qui activent la coagulation (*Figure 42*) (Swystun and Liaw 2016).

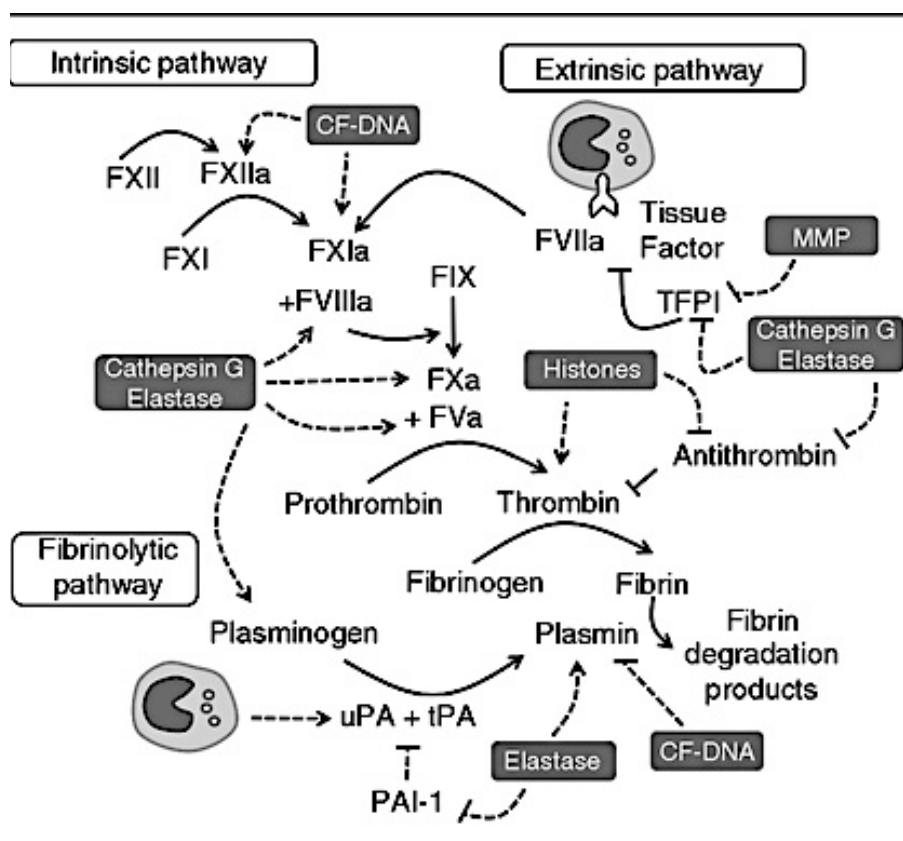


Figure 42 : Régulation de la cascade de la coagulation par les leucocytes

(Swystun and Liaw 2016)

Les monocytes sont la plus grande source intravasculaire de Facteur Tissulaire (FT) (Butenas *et al.* 2005). L'exposition à des agents, favorisant l'inflammation et /ou l'apoptose, augmente l'activité du FT monocyttaire et/ou la génération de thrombine médiée par le FT (Swystun and Liaw 2016). Les neutrophiles stimulés libèrent des métalloprotéinases matricielles et des sérines protéases telles que la cathepsine G et l'élastase. Ces enzymes favorisent l'activation de la coagulation, notamment en agissant sur les cofacteurs d'activation V, VIII et X. Ils peuvent également dégrader les facteurs anticoagulants tels que l'antithrombine, le facteur II et/ou le TFPI (Swystun and Liaw 2016). Les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP), comprenant notamment les histones, sont libérés des noyaux des leucocytes activés ou apoptotiques et favorisent l'activation de la coagulation. Les DAMPs peuvent inhiber les voies anticoagulantes en protégeant la thrombine contre l'inactivation médiée par l'antithrombine et en compromettant l'activation de protéine C par le complexe Thrombine/TM (Ammollo *et al.* 2011). Les médiateurs libérés par les leucocytes activés peuvent également influencer l'activité hémostatique de l'activation endothéliale et plaquettaire, notamment par l'intermédiaire des histones qui stimulent le relargage du facteur de Willebrand (Lam *et al.* 2016).

L'activation des leucocytes peut être mesurée en étudiant par cytométrie en flux, la présence de certains facteurs procoagulants produits par les leucocytes. Cependant, peu d'études explorent l'activation leucocytaire (Dey *et al.* 2010). L'état de surface des matériaux est un caractère important à prendre en compte, car il a été démontré qu'il existait différents mécanismes d'adhésion pour les leucocytes, en fonction de l'hydrophilie de la surface à laquelle ils adhéraient (Eriksson and Nygren 2001). Concernant les contraintes de cisaillement, peu d'études étudient son influence sur l'activation des leucocytes. Concernant l'influence des contraintes de cisaillement sur l'adhésion des leucocytes, des résultats contradictoires ont été obtenus, selon les études révisées par Gorbet *et al.* (Gorbet and Sefton 2004). En effet, le flux permettrait de réduire, d'augmenter ou de laisser une adhésion des leucocytes inchangée sur différents substrats.

2.2.1.2.2 Exploration de l'hémolyse

La notion d'hémocompatibilité implique que le biomatériau n'induit pas d'hémolyse. Les principaux acteurs dans le processus d'hémolyse sont les globules rouges et les plaquettes. La fonction et la morphologie des globules rouges peuvent être altérées par contacts répétés avec les surfaces artificielles. L'utilisation de substituts vasculaires peut, en effet, engendrer des turbulences du courant sanguin à l'origine de lésions des érythrocytes pouvant aboutir à leur destruction. L'hémolyse résulte essentiellement de l'augmentation de la pression osmotique des globules rouges. Au cours de l'hémolyse, la rupture des globules rouges se produit et l'hémoglobine est libérée des globules rouges.

L'évaluation de l'hémolyse, étape cruciale dans l'évaluation de l'hémocompatibilité, peut être réalisée *in vitro* grâce au test d'hémolyse. La majorité des études utilisent ce test dans l'évaluation de l'hémocompatibilité des produits d'ingénierie vasculaire (Mercado-Pagan *et al.* 2014, Caracciolo *et al.* 2017, Li *et al.* 2017, Zamani *et al.* 2017). Ce test est réalisé avec du sang recueilli sur support citraté et mis en contact avec le biomatériau à tester. Le principe de ce test repose sur le dosage de l'hémoglobine et le calcul de l'index hémolytique (IH) défini par la formule $IH = (\text{Hémoglobine libre dans le surnageant} / \text{Hémoglobine totale du substrat sanguin}) \times 100$. Selon la norme ASTM F756-00 (2000), les biomatériaux peuvent être classés en trois catégories différentes selon leur indice hémolytique. Les matériaux avec des taux d'hémolyse supérieurs à 5% sont considérés comme hémolytiques; tandis que ceux avec indice hémolytique compris entre 5% et 2% sont classés comme légèrement hémolytiques. Lorsque le matériau présente un pourcentage d'hémolyse inférieur à 2%, il est considéré comme un matériau non hémolytique.

Le flux a également une forte influence sur l'hémolyse. En effet, des flux turbulents peuvent causer une hémolyse mécanique des globules rouges. Ainsi, des systèmes dynamiques sont de plus en plus développés, afin de modéliser les effets des contraintes de cisaillement sur l'hémolyse. Bien que de nombreux modèles d'hémolyse aient été proposés dans la littérature scientifique au cours des dernières décennies, la modélisation idéale n'a pas encore été mise au point (Yu *et al.* 2017). Il a été démontré que la rugosité du matériau avait une forte influence sur l'hémolyse. La rugosité agit surtout indirectement sur l'hémolyse, en perturbant le flux (Maruyama *et al.* 2006).

2.2.1.3 Exploration de la cascade du complément

Le système du complément est en forte interaction avec l'hémostase. Son exploration est donc primordiale pour évaluer l'hémocompatibilité d'un substitut vasculaire.

2.2.1.3.1 *Mécanismes de la cascade du complément*

Le système du complément comprend plus de 50 protéines, plasmatiques ou à la surface des cellules, participant à l'immunité adaptative et innée. Son activation peut être initiée par trois voies distinctes : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. La cascade du complément est composée d'une phase initiatrice, qui aboutit par divers intermédiaires à l'activation du complément, d'une phase d'amplification et d'une phase effectrice (voie terminale commune), à l'origine des différentes fonctions du complément. L'activation de la cascade du complément conduit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire terminal (MAC) (*Figure 43*) (Trouw *et al.* 2017).

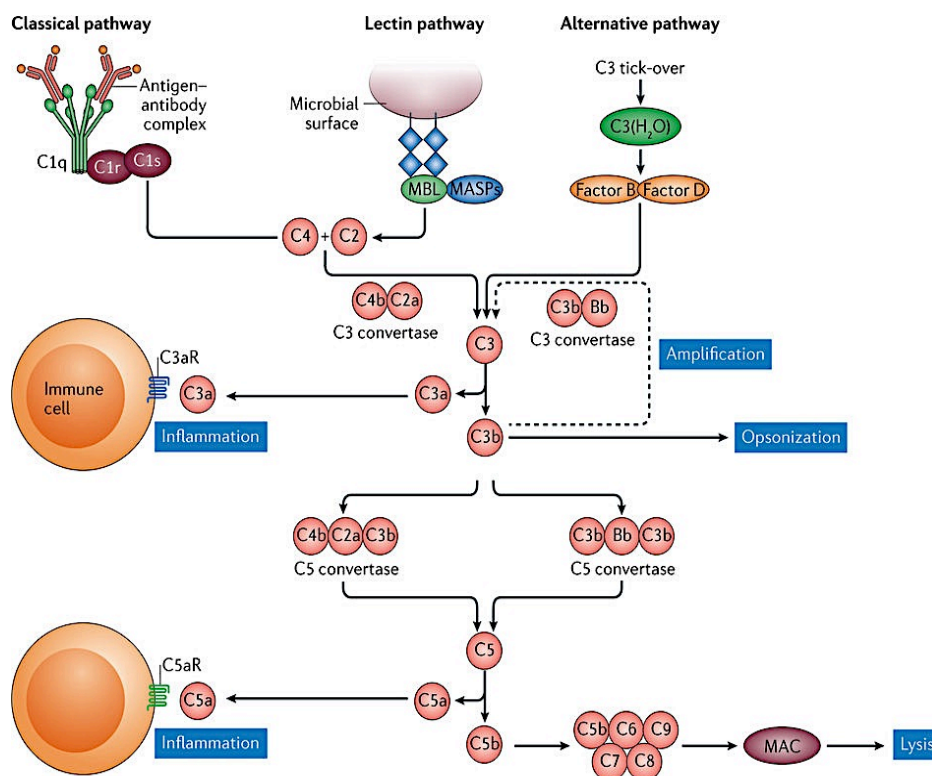


Figure 43 : Système du complément

(Trouw et al. 2017)

Trois voies permettent l'activation de la cascade du complément. La voie classique est initiée par la liaison de la protéine C1q à l'un de ses ligands, majoritairement représentés par les immunoglobulines IgG et IgM. Les ligands peuvent également être des particules microbiennes ou des protéines inflammatoires (Wallis *et al.* 2010). Le C1q constitue la protéine de reconnaissance du complexe macromoléculaire C1 (C1q₂r₂s₂). La fixation du C1q à son ligand induit une auto-activation du C1r, qui peut alors cliver et ainsi activer le C1s. Le C1s activé agit en réalisant deux clivages protéolytiques successifs: celui du composant plasmatique C4, formant ainsi du C4a, anaphylatoxine et du C4b qui se fixe de façon covalente à la surface-cible ; et celui du composant plasmatique C2, formant ainsi du C2a et du C2b. Cette cascade de protéolyse aboutit à la formation, sur la surface activatrice, d'un complexe C4b₂a, qui correspond à une C3 convertase classique, dont l'activité enzymatique est portée par la sous-unité C2a (Wallis *et al.* 2010). La voie des lectines est également déclenchée par une liaison spécifique ligand-protéine de reconnaissance. La protéine de reconnaissance est la protéine MBL ou la ficoline, dont les structures sont proches de celles du C1q. La MBL ou la ficoline peuvent s'associer à des protéases à serine, MASP-1, MASP-2 et MASP-3 et

ainsi former les complexes MBL/MASP-2 ou ficoline/MASP-2 capables d'activer le complément (Wallis *et al.* 2010). La MASP-2 possède une activité catalytique similaire à celle de C1s, lui permettant de cliver les protéines C4 et C2 et donc de former une C3 convertase identique à celle issue d'une activation par la voie classique (Rossi *et al.* 2001). Contrairement à la voie classique et celle des lectines, la voie alterne n'est pas déclenchée par une liaison spécifique ligand-protéine de reconnaissance. Cette voie est initiée par une hydrolyse spontanée du C3, formant du C3(H₂O). En cas de liaison non régulée à une surface activatrice (agents pathogènes étrangers ou issus de l'hôte, tels que les cellules tumorales ou apoptotiques), cette voie aboutit à la formation d'une C3 convertase alterne tissulaire et à l'activation du complément. En effet, le C3(H₂O) est capable de lier le fragment Bb du Facteur B (FB). Cette liaison induit des changements de conformation du FB, permettant son clivage protéolytique en facteurs Bb et Ba par le facteur D. Le fragment Ba est libéré et le fragment Bb, qui porte l'activité enzymatique, reste associé au C3b, formant ainsi une C3 convertase alterne (C3bBb) (Nesargikar *et al.* 2012).

A l'issue des 3 voies d'activation, deux C3 convertases peuvent être formées : C4b2a, la C3 convertase classique et C3bBb, la C3 convertase alterne. Ces deux complexes moléculaires ont une même activité enzymatique qui assure le clivage de la protéine C3 en C3a et C3b. L'anaphylatoxine C3a, libérée en phase fluide, possède des activités biologiques importantes dans la réaction inflammatoire. La C3b se fixe de façon covalente à une surface activatrice sur un résidu thioester. Son devenir est multiple et détermine les différentes voies effectrices du système du complément (Nesargikar *et al.* 2012). Dans la voie d'amplification, la C3, nouvellement formée, peut s'associer avec une nouvelle molécule de facteur B pour former une nouvelle C3 convertase alterne, clivant de nouvelles molécules C3 et ainsi participant à la boucle amplificatrice de la voie alterne. La voie alterne peut également amplifier l'activation du complément initiée par les deux autres voies, classique et des lectines. Ce mécanisme permet l'opsonisation de la surface activatrice, c'est à dire son recouvrement rapide par du C3b. La voie terminale commune est déclenchée par la liaison de C3b à C4b2a (C3 convertase classique) ou C3bBb (C3 convertase alterne), formant ainsi respectivement C4bC2aC3b (C5 convertase classique) et C3bBbC3b (C5 convertase alterne). Ces C5 convertases classiques ou alternes lient puis clivent, C5 via leur sous-unité C2a ou Bb, respectivement. Cette protéolyse du C5 induit la libération en phase fluide de l'anaphylatoxine C5a et du fragment C5b. C5b permet la liaison de la protéine C6, qui stabilise ce complexe soluble, puis de la protéine C7. La liaison de C7 induit une modification structurale du complexe C5b-7, caractérisée par l'exposition de résidus hydrophobes. Le complexe C5b-7, devenu lipophile, s'ancre alors à la double couche lipidique de la surface cible, où il recrute la protéine C8. A son tour, C8 subit une modification conformationnelle, responsable d'une exposition de résidus hydrophobes. La liaison du complexe C5b-8 à la protéine C9 permet la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM ou C5b-9), forme des pores transmembranaires d'un diamètre d'environ 100 Å à la surface des cellules cibles. Ces pores, en

laissant passer les molécules d'eau et petits ions à travers la membrane plasmique, sont responsables d'un déséquilibre osmotique létal. La lyse est d'autant plus efficace que les pores sont nombreux.

Le complément, système puissant mais peu spécifique, requiert un système de régulation. Un ensemble de protéines plasmatiques et membranaires, tels que CFH (Complement Factor H), CFI (Complement Factor I), MCP (Membrane Cofactor Protein), DAF (Decay Accelerating Factor), TM et CD59, sont impliquées dans le contrôle de l'activation du complément. Ces protéines agissent selon deux modes d'action : en favorisant la dissociation de la C3 convertase alterne ou en étant cofacteur du CFI pour la dégradation du C3b (*Figure 44*) (Noris *et al.* 2012).

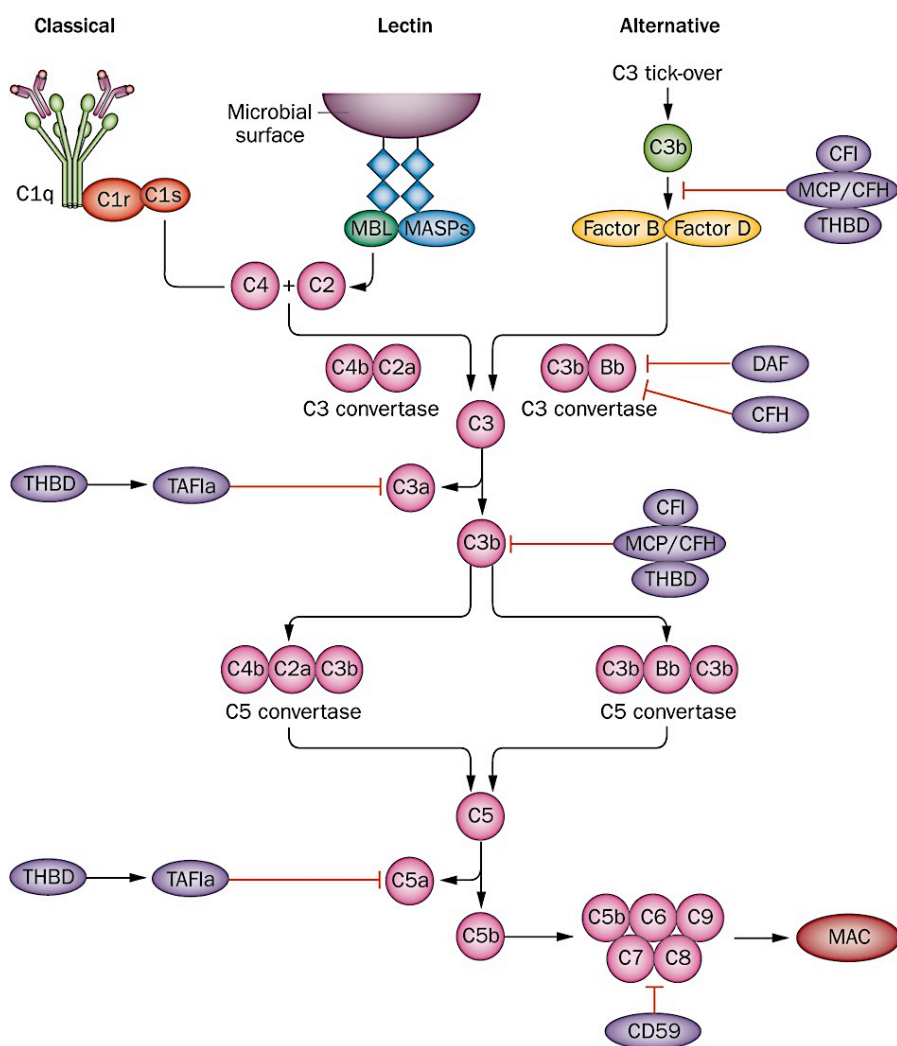


Figure 44 : Molécules de régulation dans la cascade d'activation du complément

(Noris *et al.* 2012)

La protéine CFH est une protéine plasmatique, considérée comme la principale responsable de la régulation de la voie alterne du complément. Elle est capable de se lier à des surfaces riches en glycosaminoglycanes et participe ainsi à la discrimination entre agents pathogènes et cellules hôtes, protégeant ainsi ces dernières de l'activation du complément. CFH a trois fonctions de régulation. D'une part, il entre en compétition avec FB pour la liaison au C3b et peut ainsi prévenir la formation de la C3 convertase. D'autre part, il est un des cofacteurs du FI, qui clive le C3b en iC3b. En effet, FI se fixe au C3b lié au CFH avec plus d'affinité qu'au C3b isolé. Enfin, CFH accélère la dissociation irréversible de la C3 convertase alterne par déplacement du fragment Bb (Ferreira *et al.* 2010). La protéine MCP ou CD46 participe à la régulation des voies classique et alterne par ses fonctions de cofacteur du FI. Elle module ainsi l'inactivation de C3b et C4b (Liszewski and Atkinson 2015). La protéine DAF participe, comme la MCP, à la régulation des voies classique et alterne, non pas par une activité de cofacteur mais en accélérant la dissociation et en prévenant la formation de nouvelles C3 et C5 convertases (Mikesch *et al.* 2006). La TM participe également à la régulation de la cascade du complément en potentialisant l'action du CFH en tant que cofacteur du CFI pour le clivage du C3b. D'autre part, elle active le TAFI, dont l'activité carboxypeptidasique permet le clivage des anaphylatoxines C3a et C5a (Ito *et al.* 2016). Plusieurs protéines régulent la voie terminale commune. Parmi elle, le CD59 intervient en liant le complexe C5b-8 ainsi que C9, bloquant ainsi la formation du canal transmembranaire et la lyse cellulaire (Farkas *et al.* 2002).

Cascade du complément et biomatériau

L'activation du complément est généralement explorée lors de l'étude de la réponse inflammatoire induite par les biomatériaux, mais également dans le cadre de l'hémocompatibilité, étant donné l'interaction entre complément et hémostasie. En effet, même si la cascade de la coagulation et du complément sont souvent étudiées séparément, il est maintenant reconnu que ces deux cascades interagissent entre elles, notamment après contact avec une surface artificielle.

En présence de surfaces chargées négativement, le facteur XII est adsorbé puis activé, induisant la cascade de coagulation avec la génération en aval de la thrombine et de la fibrine. De plus, le facteur XIIa active la prékallikréine formant ainsi de la kallikréine plasmatique, capable de cliver C3 et C5 et générant localement les anaphylatoxines C3a et C5a, sans activation des voies canoniques. En outre, la kallikréine plasmatique peut induire la génération de β -FXIIa qui est capable d'activer C1qrs et ensuite la voie classique. De plus, la thrombine active C3, C5, C6 et le facteur B (*Figure 45*) (Wiegner *et al.* 2016).

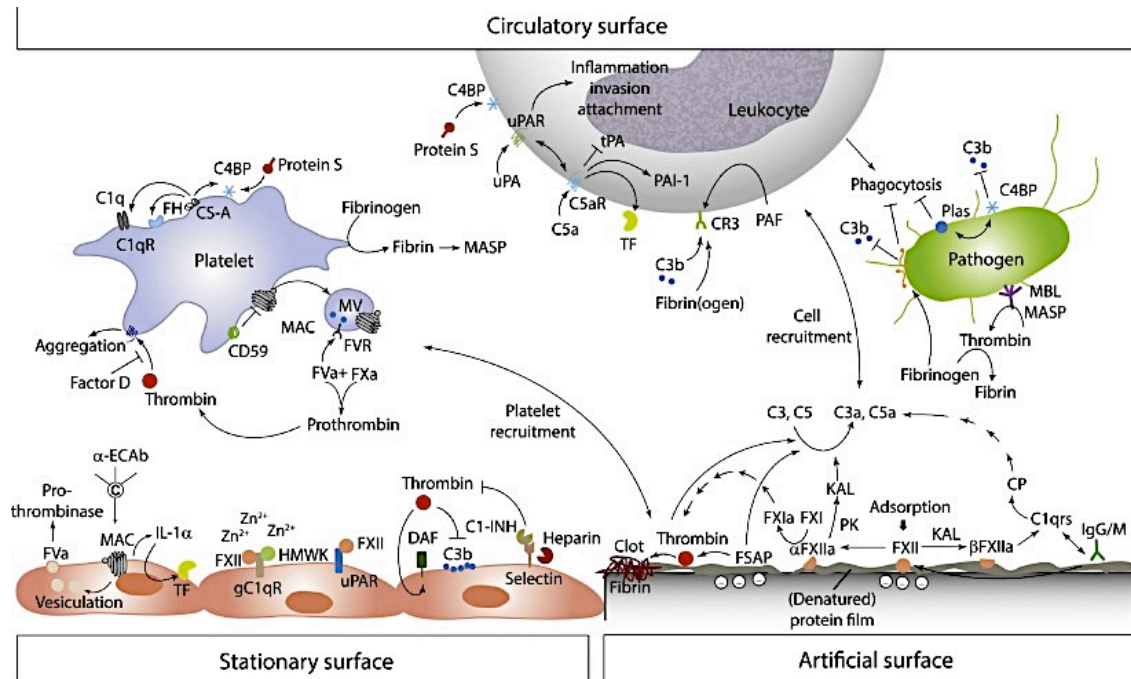


Figure 45 : Relations entre hémostasie et complément

(Wiegner et al. 2016)

Les biomatériaux sont généralement classés comme des surfaces «activatrices» ou «non activatrices». Sur une surface «non activatrice», des groupements chargés négativement, tels que le carboxyle le sulfate, l'acide sialique et l'héparine peuvent favoriser la liaison du C3b et du facteur H, régulant ainsi la voie alterne du complément, en prévenant la formation de la C3 convertase. En revanche, une surface «activatrice» est habituellement caractérisée par la présence de groupements hydroxyles et amines. Ces groupements entraînent une liaison covalente de C3b et favoriser la formation de C3 et C5 convertase. Certains matériaux d'activation génèrent des niveaux élevés de C3b et C5b-9, tandis que d'autres généreront un haut niveau de C3b mais peu de C5b-9. Cependant, même de faibles quantités de C5b-9 sont capables d'activer les leucocytes et induire une réponse inflammatoire significative. L'hypothèse selon laquelle l'activation du complément induite par un matériau se produit exclusivement *via* la voie alternative est désormais contestée (Gorbet and Sefton 2004). En effet, plusieurs études *in vitro* ont démontré l'activation de la voie classique par certains biomatériaux (Sefton et al. 2000).

Selon la norme ISO 10993, plusieurs tests peuvent être réalisés pour explorer la cascade du complément, le génération de C3a, C5a, Bb, iC3b, C4d, SC5b-9, C3 convertase, C5 convertase et la consommation du CH50. Dans la littérature, la voie classique est généralement explorée par le dosage du C3a (Seib et al. 2014, Wells et al. 2017) et la voie finale commune par le dosage du C5b9 (Stang et al. 2014, Brockman et al. 2017, Wells et al. 2017). Certains auteurs dosent également le fragment C5a

(Seib *et al.* 2014, Stang *et al.* 2014), Bb et C4d (Seib *et al.* 2014). Le test hémolytique du CH50 est également utilisé (Brockman *et al.* 2017). Il explore l'activité fonctionnelle globale de la voie classique et de la voie finale commune, en mesurant la lyse de globules rouges de moutons sensibilisés par des anticorps de lapin anti-érythrocytes. Le complexe immun formé active le complément. Le CH50 correspond à la plus petite quantité de sérum donnant 50% d'hémolyse. Le résultat est exprimé en pourcentage par rapport à un témoin constitué d'un pool de plasmas normaux. Dans la littérature, les concentrations plasmatiques de C3a et C5b9 détectées *in vivo* sont beaucoup plus faibles qu'après un contact sanguin *in vitro*, probablement en raison de la clairance *in vivo* (van Oeveren 2013).

2.2.2 Substituts vasculaires et inflammation

Après implantation du matériau, l'hémostase primaire et la cascade de la coagulation peuvent être mises en jeu et suivies par la réponse inflammatoire humorale et cellulaire. Ainsi, les cellules impliquées dans l'hémostase et l'inflammation sont recrutées selon une échelle-temps généralement bien définie (*Figure 46*) (Velnar *et al.* 2016).

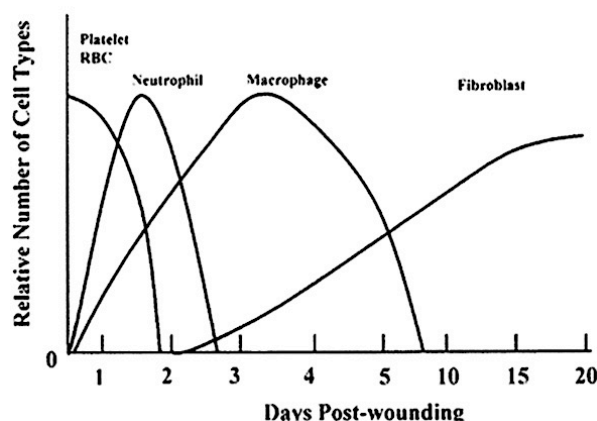


Figure 46 : Différents types cellulaires impliqués dans la cicatrisation tissulaire au cours du temps

(Velnar *et al.* 2016)

La détection et l'élimination des agents infectieux sont les principales tâches du système immunitaire des mammifères. Un agent identifié comme infectieux est reconnu par le système immunitaire inné et principalement éliminé par phagocytose. Ces mécanismes sont généralement suffisants pour les bactéries, virus et protozoaires. Cependant, l'élimination rapide par phagocytose échoue lorsque le corps est en présence de pathogènes résistants ou encore de corps étrangers, comme certains biomatériaux.

Ainsi, différents mécanismes du système immunitaire sont mis en place au cours du temps, pouvant aboutir à une encapsulation fibreuse du biomatériau (*Figure 47*) (Anderson *et al.* 2008).

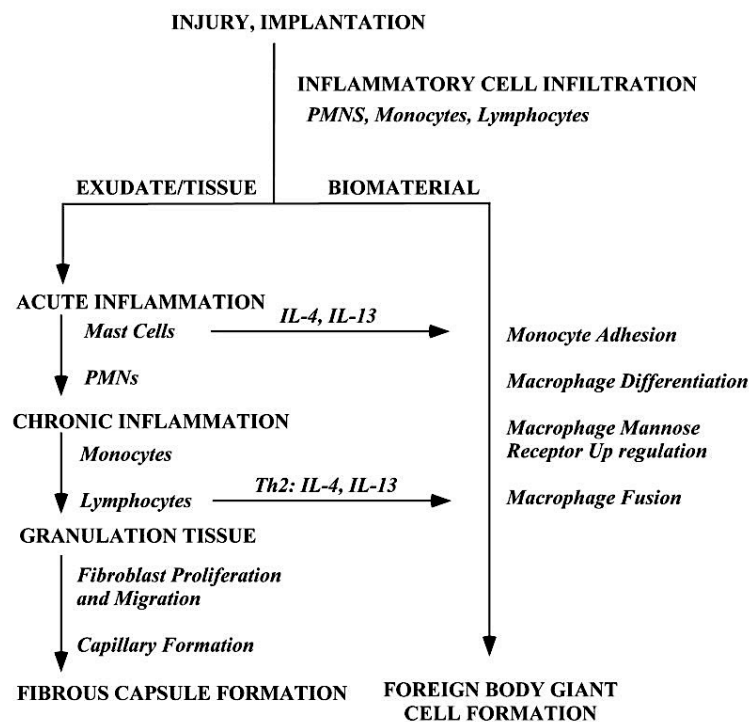


Figure 47 : Mécanismes immunitaires mis en jeu après implantation d'un biomatériau *in vivo*

(Anderson *et al.* 2008)

Le thrombus initial formé à l'interface tissu/matériau est riche en cytokines et facteurs de croissance, qui sont capables de recruter des cellules du système immunitaire inné (*cf. partie 2.2.1.3 Exploration du thrombus*). La présence de neutrophiles caractérise la réponse inflammatoire aiguë. Les macrophages dérivés de monocytes circulants, sont ensuite recrutés sur le matériau et sécrètent des cytokines inflammatoires pouvant induire un nouveau recrutement de cellules immunitaires. La sécrétion non contrôlée de facteurs de croissance par les macrophages peut aboutir à l'activation prolongée des fibroblastes et à leur production excessive de collagène pouvant aboutir à la fibrose. À la surface du biomatériau, les macrophages peuvent également former des cellules géantes à corps étranger. Tous ces mécanismes, décrits sous le terme de « réaction à corps étranger » peuvent aboutir à l'encapsulation du biomatériau.

L'ingénierie vasculaire vise à produire des biomatériaux qui induisent une réaction inflammatoire contrôlée et résolutive. En effet, l'un des objectifs de l'ingénierie vasculaire, est d'obtenir une résorption progressive du biomatériau après reconstitution *ad integrum* du vaisseau par

colonisation cellulaire. Une réaction à corps étranger est donc un élément critique, car l'encapsulation du matériau empêche la colonisation cellulaire ainsi que la résorption du biomatériau. Récemment, la science des biomatériaux a permis de comprendre les mécanismes inflammatoires mis en jeu après implantation d'un biomatériau et les processus impliqués dans les réactions à corps étranger (Klopfleisch and Jung 2017). Il est clairement établi que les mécanismes immunitaires mis en jeu dépendent des caractéristiques physiques et chimiques du biomatériau et des cellules immunitaires mises en jeu (Klopfleisch and Jung 2017). Ainsi, l'analyse de l'état de surface et des macrophages recrutés sont devenus des voies de recherche importantes.

2.2.2.1 *Phases de l'inflammation après implantation du biomatériau*

2.2.2.1.1 *Phase 1 - Matrice provisoire à la surface du biomatériau*

En quelques secondes, les protéines du plasma sanguin s'adsorbent au biomatériau pour former une matrice provisoire d'environ 2-5 nm (*Figure 48*) (Klopfleisch and Jung 2017). Anderson *et al.* décrivent cette matrice provisoire comme «un système biodégradable et naturel permettant la libération prolongée d'agents bioactifs pour contrôler les phases ultérieures de la guérison des plaies» (Anderson *et al.* 2008).

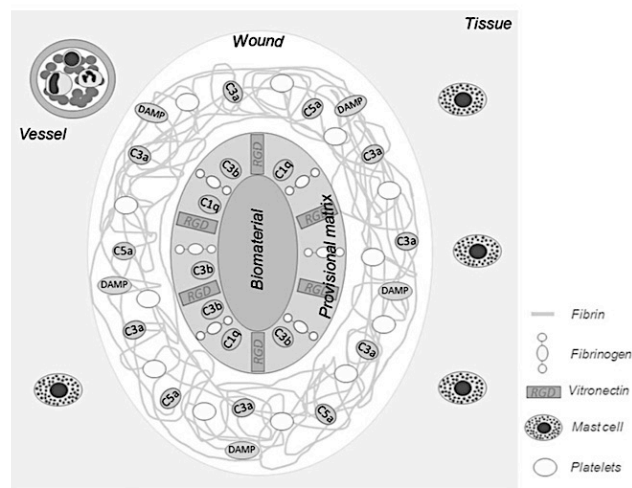


Figure 48 : Formation d'une matrice provisoire à la surface du biomatériau

(Klopfleisch and Jung 2017)

L'adsorption des protéines est décrite par l'effet de Vroman. Les protéines à haute mobilité comme l'albumine sont adsorbées en premier et sont remplacées par des protéines moins mobiles comme le fibrinogène, le kininogène à haut poids moléculaire, la fibronectine et la vitronectine

(Wilson *et al.* 2005). La composition de cette matrice provisoire dépend principalement des propriétés physico-chimiques de la surface du biomatériau et de la composition du plasma sanguin. En effet, l'effet Vroman est plus important sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes. De plus, la concentration de protéines sériques est également un facteur influençant directement la composition de la matrice provisoire. La quantité de vitronectine et de fibronectine adsorbée à la surface du biomatériau revêt une importance majeure pour l'adhésion des monocytes et la formation de cellules géantes grâce à leur interaction avec les intégrines (Jenney and Anderson 2000).

Cette matrice est principalement composée de fibrine. Comme décrit précédemment après implantation d'un biomatériau, l'hémostase primaire et la cascade de coagulation peuvent être enclenchées aboutissant à la transformation du fibrinogène en fibrine (*cf. partie 2.2.1.1 Exploration de l'hémostase et partie 2.2.1.2 Exploration de la coagulation*). Ainsi, une couche de fibrine fibrillaire en forme de maille peut être visualisée à la surface des biomatériaux. Cependant, seule une partie du fibrinogène attaché spontanément à la matrice provisoire est transformée en fibrine. Le fibrinogène non transformé semble subir un changement de conformation, permettant ainsi l'activation et l'agrégation ultérieure de plaquettes supplémentaires. De plus, le fibrinogène est également une matrice d'adhésion potentielle pour les macrophages (Klopfleisch and Jung 2017).

L'implantation de biomatériaux peut également induire l'activation de la cascade du complément entraînant la génération de quantités élevées de C3a et C5a (*cf. partie 2.2.1.3 Exploration de la cascade du complément*), qui sont des chimioattracteurs forts pour les cellules phagocytaires et de puissants stimulants pour la dégranulation des mastocytes et des neutrophiles. Le C3b, présent sur la matrice provisoire, agit comme un ligand pour l'adhésion des leucocytes via des intégrines (Love and Jones 2013).

2.2.2.1.2 Phase 2 - Inflammation aigue à la surface du biomatériau

L'inflammation aiguë, deuxième phase dans la « réaction à corps étranger », est caractérisée par l'infiltration de polynucléaires neutrophiles (PNNs) et des mastocytes (*Figure 49*) (Klopfleisch and Jung 2017). Il s'agit d'une période courte, de quelques heures à quelques jours. Si cette réaction devient plus longue, elle peut aboutir à une inflammation chronique (Klopfleisch and Jung 2017).

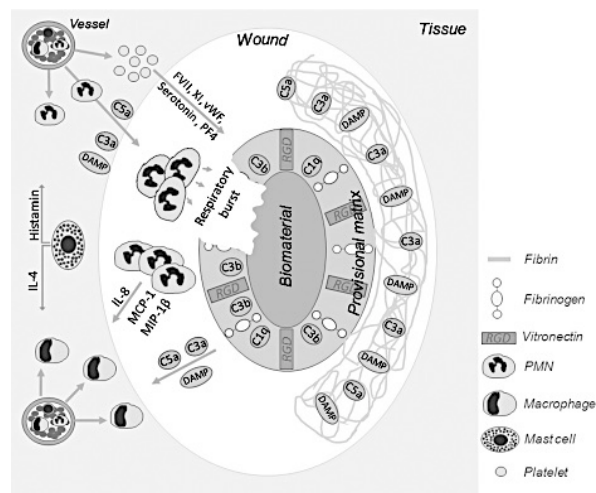


Figure 49 : Inflammation aiguë à la surface du biomatériau

(Klopfleisch and Jung 2017)

Les dégâts tissulaires provoqués lors de l'implantation semblent être le principal déclencheur dans le recrutement des PNNs, lors de la phase d'inflammation aiguë. Les DAMPs sont libérés après la rupture de la membrane cellulaire, puis reconnu par les PNNs et les mastocytes, conduisant à la migration de ces dernières cellules vers le site d'implantation. De plus, les facteurs de coagulation VII et XI, le facteur de Willebrand, le facteur plaquettaire 4 (PF4) et la P-sélectine sont libérés par les plaques activées, les cellules endothéliales et par l'intermédiaire de la cascade du complément. Ces molécules ont un effet chimioattracteur et recrutent les PNNs, puis ultérieurement les macrophages sur le site d'implantation. De plus, les cellules endothéliales interagissent avec les leucocytes (Kreuger and Phillipson 2016). Après adhésion, les PNNs et les mastocytes sont activés, permettant leur dégranulation aboutissant au relargage de chimiokines. Les mastocytes libèrent notamment de l'histamine, de l'IL-4 et de l'IL-13 et les PNNs du MCP-1 (Monocyt Chemotractant Protein 1) et MIP1 β (Macrophag Inflammation Protein 1 β), permettant *in fine* le recrutement de leucocytes supplémentaires y compris les macrophages (Scapini *et al.* 2000). La gravité de l'inflammation aiguë dépend généralement de l'étendue de la lésion tissulaire lors de l'implantation (Klopfleisch and Jung 2017).

2.2.2.1.3 Phase 3 - Inflammation chronique à la surface du biomatériau

Dans le cadre de l'étude des biomatériaux, le terme «inflammation chronique» décrit habituellement une période plutôt courte de 2 à 3 semaines (15^{ème} jour au 35^{ème} jour après implantation). Cette phase est caractérisée par l'infiltration des lymphocytes et des monocytes

circulants, qui sont attirés par les chimiokines produites notamment par les PNNs et les mastocytes. Par contre, cette phase ne comprend pas la formation de granulome à corps étranger et de capsule fibreuse (*Figure 50*) (Klopfleisch and Jung 2017).

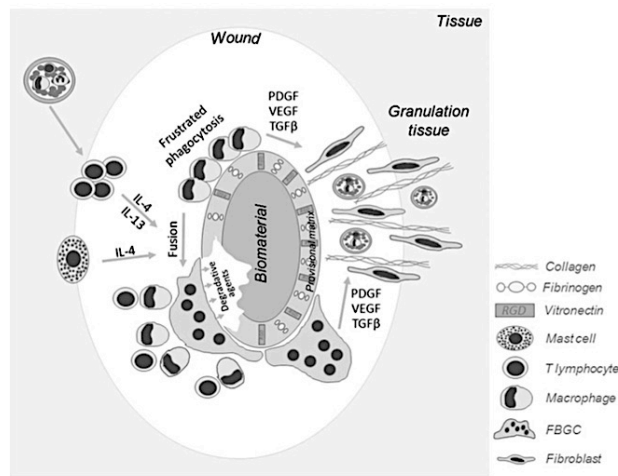


Figure 50 : Inflammation chronique à la surface du biomatériau

(Klopfleisch and Jung 2017)

Le rôle des lymphocytes dans la réaction à corps étrangers reste controversé. Des lymphocytes se retrouvent à proximité, généralement attirés par les cytokines sécrétées par les macrophages. Les lymphocytes sur le site d'implantation sont principalement des lymphocytes T CD4⁺ qui produisent des cytokines anti-inflammatoires, principalement l'IL4 et l'IL13, qui sont capables d'induire un changement de phénotype des macrophages (phénotype M1 vers un phénotype M2) et la formation d'un granulome à corps étranger (Anderson and McNally 2011). Cependant, le rôle des lymphocytes reste controversé, car Kusaka *et al.* a montré que l'implantation de particules de silice chez des souris déficientes en lymphocytes T induisait une réaction à corps étranger, semblable à celle obtenue chez des souris sauvages témoins (Kusaka *et al.* 2014).

Les macrophages, quant à eux, sont considérés comme les cellules centrales dans la réponse de l'hôte aux biomatériaux implantés (Bryers *et al.* 2012). Tout d'abord, les monocytes sont recrutés par différents facteurs : fragments du complément, TGFβ, PDGF, PF4, MCP-1,2,3,4, RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), MIP1α et MIP1β (Klopfleisch and Jung 2017). Ils peuvent également être directement recrutés par l'intermédiaire de récepteurs TLR (Toll Like Receptor) et de récepteurs « éboueurs » (également appelés récepteurs « scavengers ») (Love and Jones 2013). Ensuite, après recrutement, les monocytes adhèrent principalement au fibrinogène, aux fragments du complément, à la fibronectine et à la vitronectine de la matrice provisoire par l'intermédiaire des intégrines β1, β2 et β3 (Berton and Lowell 1999).

Après différenciation des monocytes en macrophages, ces derniers se polarisent et voient leur phénotype et leur fonction se modifier sous l'influence de cytokines et de facteurs de croissance différents (*Figure 51*) (Bryers *et al.* 2012). Les macrophages dit « classiques » ou M1 sont induits par des cytokines de type Th1, telles que le TNF α et l'IL-1 β ou encore l'interféron gamma (IFN- γ) seul ou en association avec le LPS. Ces macrophages sont des cellules de l'immunité innée, effectrices de lutte contre les microorganismes et productrices des cytokines principalement pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-8. Les macrophages M2, dits anti-inflammatoires, peuvent être induits par des cytokines de type Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 et peuvent sécréter des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et TGF β . Ils peuvent également induire le remodelage des tissus par des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Liu *et al.* 2014). Trois sous-types de macrophages M2 ont été identifiés (M2a, M2b et M2c) en fonction des signaux inducteurs. Les interleukines IL-4 et l'IL-13 conduisent à l'activation des M2a. Les complexes immuns, les TLR et les agonistes des récepteurs de l'IL-1 permettent l'activation des M2b. L'IL-10 induit préférentiellement un phénotype M2c. Récemment, un phénotype M2d a été proposé. Il est induit par la reconnaissance de l'IL-6 et de l'adénosine, dont le rôle reste encore à déterminer (Wang *et al.* 2010, Ferrante *et al.* 2013). Les macrophages ont un rôle essentiel dans l'inflammation, la formation de néovaisseaux et le développement de sténose des substituts vasculaires.

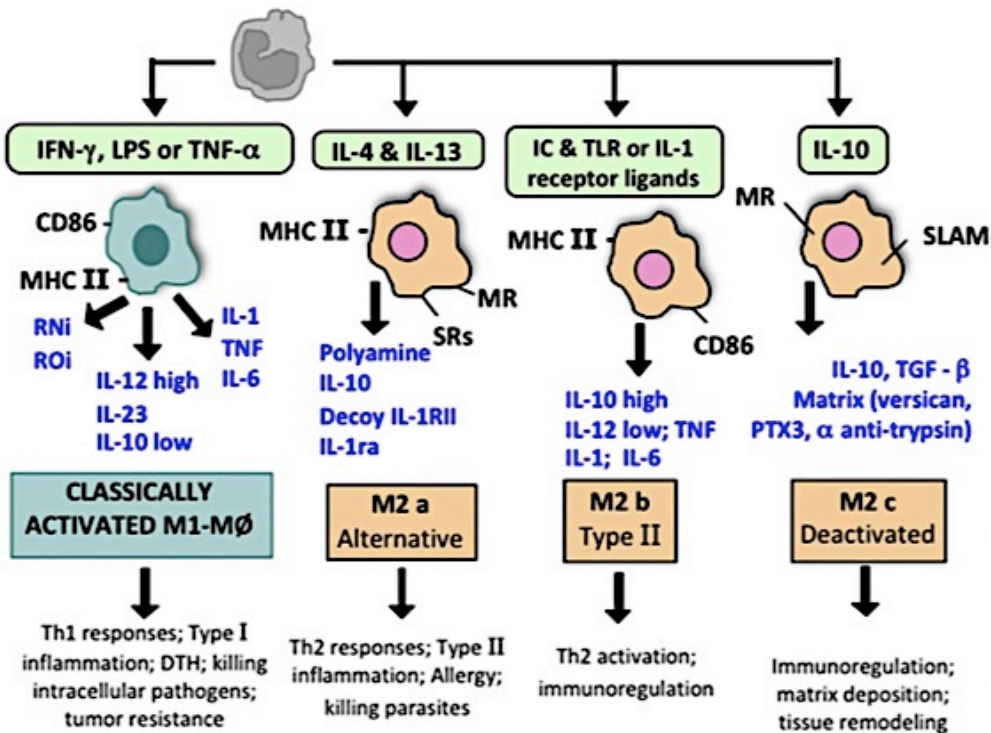


Figure 51 : Polarisation macrophagique au cours de l'inflammation

(Bryers *et al.* 2012)

L'étude du profil macrophagique au contact des biomatériaux est donc un axe de recherche très développé en ingénierie vasculaire (Wang *et al.* 2014, Sanchez-Palencia *et al.* 2015, Shafiq *et al.* 2016). Le phénotype macrophagique peut être considéré comme un déterminant biologique du remodelage de la matrice (Badylak *et al.* 2008). Bien que morphologiquement indiscernables, les différents phénotypes macrophagiques peuvent être identifiés selon leurs marqueurs de surface cellulaire, leurs cytokines et leurs profils d'expression génique.

Récemment, Klopfleisch a proposé une liste des principaux marqueurs utilisés chez la souris pour identifier les différents phénotypes macrophagiques, après revue de la littérature (*Figure 52*) (Klopfleisch 2016).

Cell type	Expressed markers/effector molecules
Monocyte	CD11b⁺, CD115⁺, F4/80⁺, MHC II⁺, CSF-1R⁺
Monocytes (inflammatory, migrating)	Ly6C⁺, CCR2^{hi}, CX3CR1^{Lo}, CD62L⁻, CD43⁺, Cd11c⁻
Monocytes (intravascular patrolling)	Ly6C⁻, CX3CR1^{hi}, CD62L⁺, CCR2^{Lo}, CD43⁻, TLR7⁺, CD11c⁺
Macrophage (all subtypes)	CD68, F4/80, CD64, MHCII
M1	CD80⁺, CD86⁺, CCR7, SOCS3, pSTAT1, pSTAT5, INOS, IL-1RI, TLR2, TLR4, IRF-5, IL-12^{hi}, IL-23^{hi}, TNF-α, IL-1β, IL-6, CCL (2,3, 4, 5, 8, 9, 10, 11), CXCL(9, 10, 11)
M2 (all subtypes)	IL-10^{hi}, CD163, SOCS1/2, CD200R?, Stabilin-1, CD301, Dectin-1,
M2a	Arg1, CD206, CD163, TGM2, Fizz1, Ym1/2, pSTAT6, SR, IL1R
M2b	Polyamine, CCL(17, 22, 24), TGF-β, CD86, MHCII
M2c	IL-1, IL-6, CCL1, TNF-α, MERTK, pSTAT3, CD206, CD163, TGF-β^{hi}
M2d	VEGF-A, IL-10, IL-12, TNF-α, TGF-β
Anti-fibrotic macrophages	Arg1⁺, (also Arg1⁻), CD206, CD280^{hi}, FIZZ1, MERTK, PPARγ, CD74, CXCR2, CXCR4, MFGE8
Foreign body giant cells (FBGC)	MMP(3, 8, 9, 12,13, 14), CTSK, CD11c, CD44, CD86, CD98, CD206, E-cadherin, DC-STAMP, DC-SIGN, HLA-DR, B7-H1, ROS, MMP9

Figure 52 : Principaux marqueurs utilisés chez la souris pour identifier le phénotype macrophagique

(Klopfleisch 2016)

2.2.2.1.4 Phase 4 – Formation du granulome à corps étranger

Les macrophages adhérents à la surface du biomatériau fusionnent pour former des cellules géantes aboutissant à la formation d'un granulome à corps étranger, particulièrement sous l'influence de l'IL-4 et l'IL-13 (Anderson *et al.* 2008) (**Figure 53**) (Klopfleisch and Jung 2017).

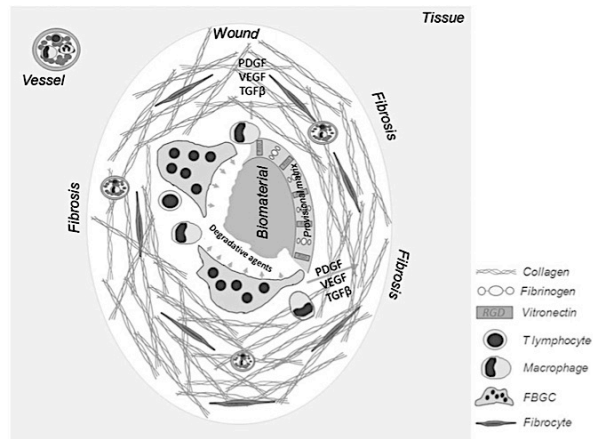


Figure 53 : Formation d'un granulome à corps étranger à la surface du biomatériau

(Klopfleisch and Jung 2017)

Une capsule fibreuse est formée suite à la sécrétion de différents facteurs de croissance favorisant la fibrose et l'angiogenèse tels que le PDGF, le VEGF et le TGFβ (Klopfleisch and Jung 2017). Ces derniers sont sécrétés par des macrophages M2, des cellules immunitaires, les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les thrombocytes et les adipocytes. Ces facteurs attirent et activent également les fibroblastes, qui produisent du collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire, contribuant à la formation d'un tissu de granulation. Des enzymes protéolytiques telles que MMPs sécrétées par des macrophages et/ou les cellules endothéliales sont également impliquées dans le remodelage de la MEC.

In fine, ces phénomènes aboutissent à la formation d'une capsule fibreuse périphérique. Ce tissu, principalement constituée de collagène et appauvri en cellules, peut entraîner une altération mécanique ou une rupture de l'interaction du biomatériau avec le tissu environnant (Klopfleisch and Jung 2017).

2.2.2.2 *Influence du biomatériau sur l'inflammation*

2.2.2.2.1 *Influence des propriétés physico-chimiques du biomatériau*

Le devenir des monocytes et des macrophages peut être fortement affecté par les propriétés physico-chimiques des biomatériaux. Le biomatériau peut également être modifié, par fonctionnalisation de sa surface et en lui permettant de libérer des molécules bioactives. Ces stratégies sont particulièrement développées en ingénierie vasculaire, pour améliorer l'hémocompatibilité des substituts et assurer un meilleur contrôle de l'inflammation (*cf. partie 2.2.3 Stratégies pour améliorer l'hémocompatibilité et contrôler l'inflammation*) (Figure 54) (Ogle et al. 2016)

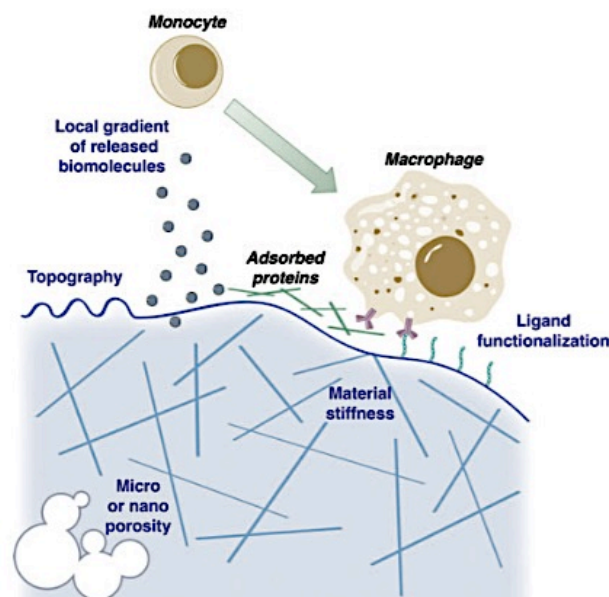


Figure 54 : Propriétés des matériaux influençant l'inflammation

(Ogle et al. 2016)

Les propriétés physico-chimiques, telles que la chimie du biomatériau, la mouillabilité (hydrophobicité/hydrophilie), la charge de surface, la géométrie, la topographie et la rigidité, ont une influence importante sur l'inflammation en modulant notamment l'activation de la cascade du complément, l'adsorption des protéines, l'adhésion des cellules et leur capacité de phagocytose (Figure 55) (Klopfleisch and Jung 2017).

TABLE I. Examples of Biomaterial Features with Influence on Protein Adsorption and Complement Activation	
Biomaterial Feature	Influence on FBR
Poly(ethylene glycol) (PEG)/chain density ↑	Protein adsorption ↓
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PHEMA	Protein adsorption ↓
Oligoethylene glycol	Protein adsorption ↓
Poly-(carboxybetaine acrylamide) (poly(CBAA))	Protein adsorption ↓
Poly(acrylamide)	Protein adsorption ↓
Peptoids	Protein adsorption ↓
Poly(carboxybetaine methacrylate) (PCBMA)	Protein adsorption ↓
Carboxybetaine-containing polymer brushes	Protein adsorption ↓
Hydrophobic surfaces including —CH ₃ groups	Albumin/Fibrinogen binding ↑, conformational changes in fibrinogen ↑
Negatively charged carboxyl/sulfate groups, sialic acid, heparin	Alternative pathway of complement activation ↑
Hydrophobic surfaces	Complement activation ↑
Nucleophiles like hydroxyl/amino groups, polyacrylonitrile	Alternative pathway of complement activation ↑
Surface roughness	Protein adsorption ↑
Wettability (hydrophobia vs. hydrophilia)	Protein adsorption ↓↑
Surfaces with extreme wettability	Protein adsorption ↓
Surface charge	Protein adsorption ↓↑

TABLE II. Biomaterial Features with Influence on Cell Adhesion and Quantity of Inflammation	
Biomaterial Feature	Influence on FBR
Hydrophilic, anionic/nonionic (polyacrylamide/polyacrylic acid)	Macrophage adhesion ↓
Hydrophobic/hydrophilic, cationic surfaces	Macrophage adhesion ↑
Nickel	Inflammation ↑
Wear (debris) rate, corroding metals, magnesium	Inflammation ↑
Amino (—NH ₂) and hydroxyl (—OH groups)	Inflammation ↑
—OH > —NH ₂ = —COOH > —CH ₃ surfaces	Infiltration and cell adhesion ↑
Uniform 30–40 μm pores	Macrophage infiltration ↑ Portion of M2 macrophages ↑
50 μm nanodots	Cell adhesion and density at maximum
Silica particle size < 1000 μm	Inflammation ↑
Smaller PLGA microspheres	Macrophage influx ↑
Triangular > pentagon > circular shaped polymers	Inflammation ↑
Mismatch of stiffness of tissue and biomaterial	Inflammation ↑

TABLE III. Biomaterial Features with Influence on Macrophage Fusion and General FBR	
Biomaterial Feature	Influence on FBR
RGD-, vitronectin, chitosan-adsorbed surfaces	Macrophage fusion (IL-4-mediated) ↑
Hydrophilic, polyacrylamide (nonionic)/hydrophilic, polyacrylic acid (anionic)	Macrophage fusion ↓
Carboxylated/unmodified polystyrene	Macrophage fusion (IL-4-mediated) ↓
Larger (~30 μm) PLGA microspheres	Macrophage fusion ↑
Smooth, flat implants	FBR ↑
Larger spheres (1.5 mm, diverse materials)	FBR ↓

TABLE IV. Biomaterial Features with Influence on Vascularization, Fibrosis, and Encapsulation	
Biomaterial Feature	Influence on FBR
Polyurethane > Polyurethane with silicone and polyethylene oxide	Encapsulation ↑
Amino (—NH ₂) and hydroxyl (—OH groups on hydrophilic surfaces)	Fibrosis ↑
—COOH groups on hydrophobic surfaces	Fibrosis ↑
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PHEMA	Encapsulation ↓
Poly-(carboxybetaine acrylamide) (poly(CBAA))	Encapsulation ↑
Gelatin hydrogels containing lysine diisocyanate ethyl ester	Encapsulation ↓
Surface cover of carboxymethylcellulose, hyaluronic acid, antiadhesive barrier solution, oxidized regenerated cellulose	Encapsulation delayed
Porosity/roughness of the surface ↑	Fibrosis ↓
4,4 μm intranodal distance in porous material	Encapsulation ↓
Uniform 30–40 μm pores	Encapsulation ↓
5 μm pores in polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes	Vascularization ↑
Polypropylene fibers < 6 μm	Encapsulation ↓
Acute angles, rectangular > pentagonal > circular, increased height (perpendicular to skin)	Encapsulation ↑
2000 μm (thick) > 300 μm (thin) polyurethane	Encapsulation ↑
Spheres > 1.5 mm in diameter	Fibrosis ↓

Figure 55 : Influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux sur l'inflammation

D'après (Klopfleisch and Jung 2017)

La composition chimique du matériau influe sur l'inflammation et notamment en agissant sur la charge et la mouillabilité (Klopfleisch and Jung 2017). Les surfaces hydrophiles peuvent autoriser la création d'une couche d'eau stable en surface et représenter une potentielle barrière à l'adsorption des protéines de surface. De plus, les surfaces hydrophobes et cationiques semblent favoriser l'adhésion des macrophages. Les surfaces hydrophiles ou anioniques peuvent engendrer l'apoptose des macrophages et l'inhibition de la fusion des macrophages *in vivo* (Brodbeck *et al.* 2002). Les groupes amines et hydroxyles sur des surfaces hydrophiles et les groupes carboxyles sur des surfaces hydrophobes pourraient induire une augmentation de l'épaisseur de la capsule (Tang *et al.* 1998, Barbosa *et al.* 2006, Kamath *et al.* 2008). Le nickel, le magnésium et les métaux corrodés stimuleraient une inflammation plus intense avec un nombre plus élevé de macrophages infiltrants et de lymphocytes (Klopfleisch and Jung 2017).

La géométrie du biomatériau peut influencer l'adhésion et les capacités de phagocytose des cellules (Ogle *et al.* 2016). Les matériaux sphériques pourraient induire une encapsulation beaucoup moins fibreuse que les matériaux cylindrique ou les matériaux contenant des angles brusques (Veisoh *et al.* 2015). La topographie des matériaux peut influencer l'adhésion, l'étalement, l'activation, la migration et la polarisation des macrophages (Ogle *et al.* 2016). Les surfaces lisses et plates induisent considérablement plus de formation de granulome à corps étranger que les surfaces rugueuses (Klopfleisch and Jung 2017).

L'orientation topographique semble également importante, car les nanofibres à orientation aléatoire réduisent l'encapsulation fibreuse *in vivo* par rapport aux nanofibres alignées (Cao *et al.* 2010). Généralement, les biomatériaux poreux sont plus facilement vascularisés et peuvent présenter une encapsulation fibreuse inférieure à celle de leurs homologues non poreux. Les biomatériaux ayant des tailles de pores d'environ 30 à 40 μm sont associés à un nombre important de macrophages infiltrés (principalement des macrophages M2) et à une plus grande vascularisation (Klopfleisch and Jung 2017).

Comme de nombreux types cellulaires, les macrophages sont influencés par la rigidité du substrat (Ogle *et al.* 2016). Blakney *et al.* ont montré que les hydrogels en polyéthylène glycol avec des modules élastiques plus faibles (module de 130 kPa) empêchaient l'étalement des macrophages et la formation de fibres de stress d'actine et prévenait l'expression des gènes pro-inflammatoires et l'encapsulation fibreuse *in vivo*. Pour des hydrogels en polyéthylène glycol avec des modules élastiques plus élevés (jusqu'à 840 kPa) et donc plus rigides, les macrophages étaient activés avec une production importante d'IL-1 β et d'IL-6, favorisant la formation de capsules plus épaisses (Blakney *et al.* 2012). La rigidité du biomatériau est également importante pour ne pas engendrer des perturbations dans le flux et contrôler les contraintes de cisaillement (Klopfleisch and Jung 2017).

2.2.2.2 Influence de l'endothélium et des contraintes de cisaillement

La cellule endothéliale a un rôle fondamental dans la balance hémostatique (*cf. partie 2.2.1.1 Exploration de l'hémostase*), mais également dans l'inflammation (*Figure 56*) (Ward *et al.* 2017). Ainsi, l'obtention d'un endothélium fonctionnel constitue un double enjeu : il permet une régulation de l'hémostase mais également une meilleure intégration du biomatériau.

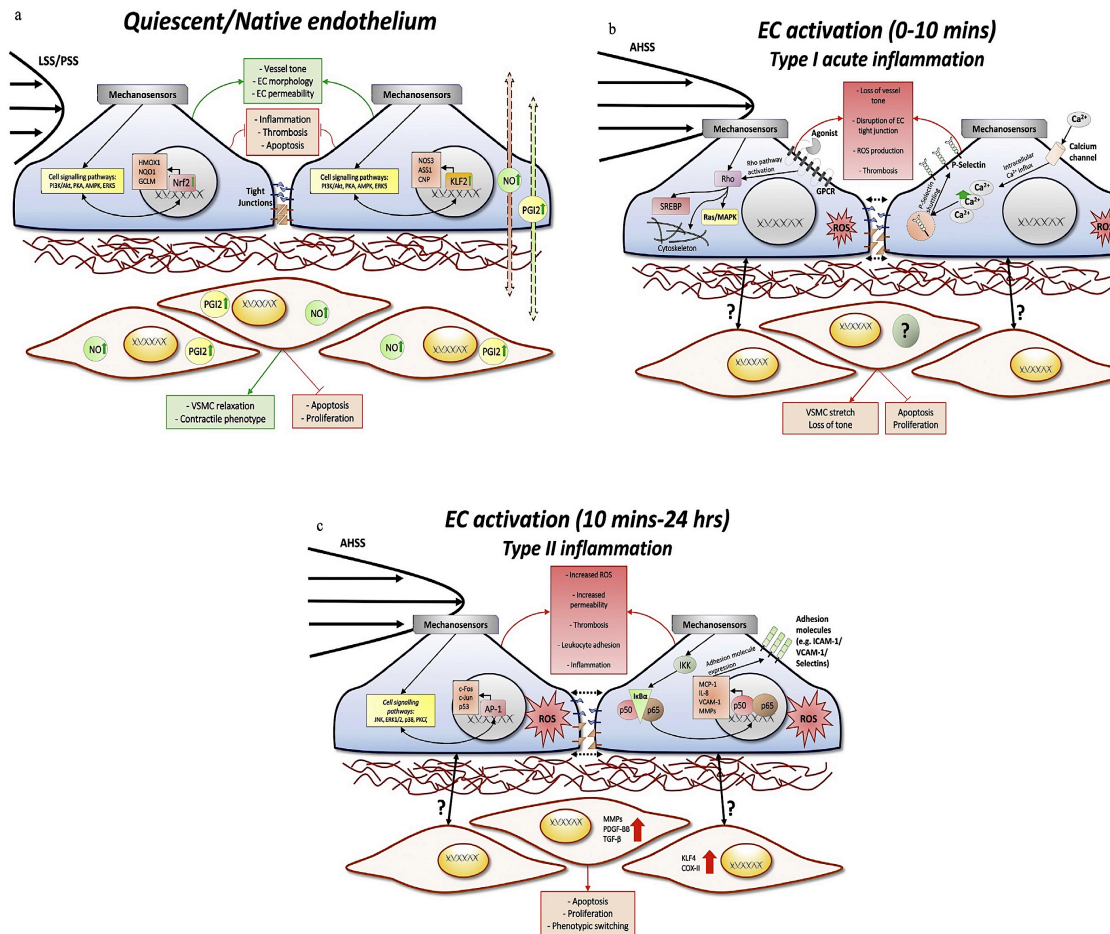


Figure 56 : Régulation de l'inflammation par la cellule endothéliale

(Ward *et al.* 2017)

La biodisponibilité du NO et de la PGI2 est fondamentale pour le maintien du tonus vasculaire, pour la régulation de la quiescence de la CE et pour la prolifération, migration et contraction des CMLs (*Figure 56a*) (Ward *et al.* 2017).

Lorsque le flux est modifié, la CE passe d'un état quiescent à un état activé, produisant des effets importants sur la paroi vasculaire. Cette activation entraîne une perte du tonus vasculaire avec contraction des CMLS, une rupture des jonctions serrées liant les cellules endothéliales entre elles et la production accrue de ROS. Ces actions contribuent à la mise en place d'une inflammation de type I, dite aiguë (*Figure 56b*) (Ward *et al.* 2017).

La mise en place d'une réponse inflammatoire plus prolongée, de type II, entraîne l'activation de voies pro-inflammatoires, avec une hausse des ROS intracellulaire et l'expression de molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines permettant l'adhésion des leucocytes. Ces phénomènes affectent les capacités de prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que leur phénotype (*Figure 56c*) (Ward *et al.* 2017).

2.2.3 Stratégies pour améliorer l'hémocompatibilité et contrôler l'inflammation

Pour améliorer l'hémocompatibilité et la perméabilité à long terme des substituts vasculaires, diverses approches sont envisagées, que nous allons développer (*Figure 57*) (Ren *et al.* 2015). L'une des stratégies est de modifier les surfaces des biomatériaux avec des molécules dites « anti-adhésives », afin d'inhiber l'adsorption des cellules et des protéines, la formation de thrombine et de fibrine et l'activation plaquettaire (*Figure 57A*). Des molécules biologiquement actives peuvent également être adsorbées à la surface du biomatériau pour favoriser leur endothélialisation (*Figure 57B*). Cependant, la simple adsorption de ces molécules anti-adhésives ou biologiquement actives, pose le problème de leur dispersion une fois qu'elles sont soumises aux contraintes de cisaillement. Le greffage covalent de ces molécules peut alors éviter ce délaminage. Enfin, la manipulation génétique peut aussi être utilisée pour améliorer l'endothélialisation (*Figure 57C*).

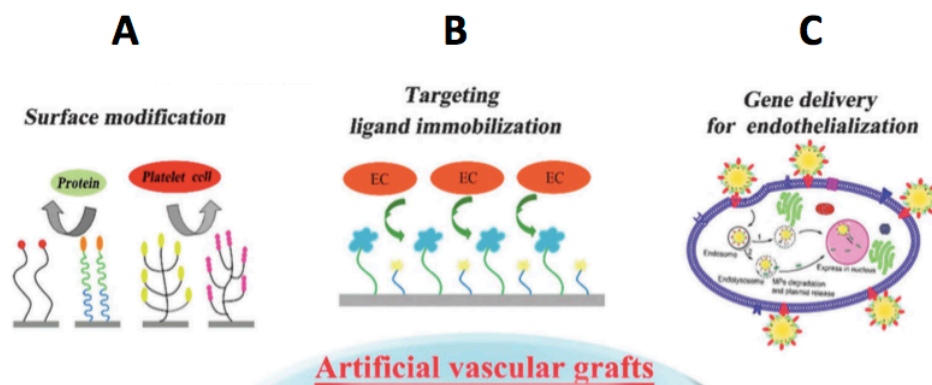


Figure 57 : Modifications de surface et endothélialisation des biomatériaux en ingénierie vasculaire

(Ren *et al.* 2015)

L'électrospinning est une technique couramment utilisée pour contrôler l'état de surface et favoriser l'intégration de molécules fonctionnelles. Elle permet de fabriquer à l'aide d'un champ électrique des membranes dont l'épaisseur et le diamètre des fibres sont contrôlés (Ercolani *et al.* 2015). Brièvement, une solution de polymère est placée dans une seringue munie d'une fine aiguille métallique, reliée au pôle positif d'un générateur à haute tension. Le débit de la solution dans la seringue est contrôlé par une pompe péristaltique. La cible réceptrice est recouverte d'une feuille métallique, reliée au pôle négatif du générateur. Lorsque l'intensité du champ électrique dépasse la tension de surface de la solution de polymère à l'extrémité de la seringue, une goutte est arrachée et forme un filament qui vient se déposer sous la forme d'une fibre sur le collecteur.

2.2.3.1 Modification de surface pour améliorer l'hémocompatibilité

L'hémocompatibilité des biomatériaux dépend principalement de leurs caractéristiques de surface physiques et chimiques. Un avantage est que les propriétés mécaniques intrinsèques des biomatériaux sont généralement conservées après la mise en place du processus de modification de surface (Qi *et al.* 2013). Il existe deux approches dont le but est de limiter la réaction à corps étranger : créer des surfaces inhibant les liaisons non spécifiques avec les protéines de surface (« stratégies anti-adhésives ») ou développer des surfaces favorisant l'interaction avec certaines cellules cibles telles que des cellules du système vasculaire et immunitaire (Meyers and Grinstaff 2012).

Les substituts vasculaires synthétiques peuvent être modifiés en surface en utilisant des méthodes biologiques, chimiques ou physiques. La modification de la surface peut être effectuée par greffage de rayons de monomères, modification chimique, immobilisation de molécules biologiques et silanisation (Adipurnama *et al.* 2016). Plusieurs types de revêtement peuvent être utilisés pour modifier la surface des biomatériaux et améliorer leur hémocompatibilité. Jordan *et al.* distinguent 3 grands types de revêtements : ceux inhibant l'adsorption des cellules et des protéines (polyéthylène glycol, albumine, carbone, phosphorylcholine, élastine) ceux inhibant la formation de thrombine et de fibrine (héparine, inhibiteur de la thrombine, thrombomoduline) et ceux inhibant l'activation plaquettaire (molécules « donneuses de NO », drogues antiplaquettaires) (Jordan and Chaikof 2007).

Les techniques de modification de surface ont considérablement évolué au fil des années, passant ainsi de surfaces bioinertes à des surfaces bioactives et actuellement, à des surfaces biomimétiques. Les surfaces bioinertes sont obtenues notamment par des revêtements organiques ou inorganiques de leur surface. Les surfaces bioactives sont obtenues par des revêtements contenant des anticoagulants ou certaines drogues impliquées dans la coagulation et par cellularisation de la surface luminale. Les surfaces bioinertes et bioactives sont basées sur la régulation des propriétés physiques, chimiques ou biologiques. Cependant, ces techniques ne permettent pas actuellement de recréer une surface idéale avec des propriétés anticoagulantes, une promotion de l'endothélialisation et une

inhibition de la prolifération des CMLs. Ainsi, des surfaces biomimétiques sont de plus en plus développées. Elles prennent en compte le microenvironnement de la cellule endothéliale et favorise l'endothélialisation *in situ* du substitut par les cellules de l'hôte (*Figure 58*) (Qi *et al.* 2013, Adipurnama *et al.* 2016).

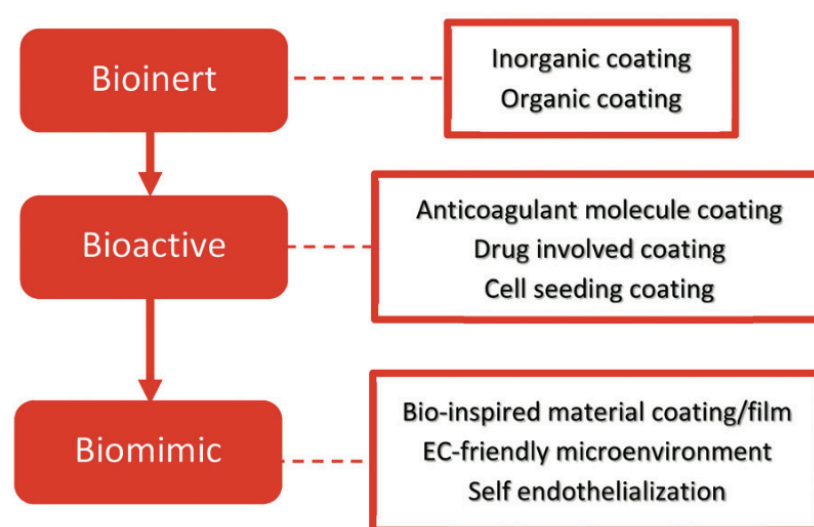


Figure 58 : Stratégies pour modifier l'état de surface des matériaux

(Adipurnama *et al.* 2016)

2.2.3.1.1 Les revêtements inhibant l'adsorption des cellules et des protéines

Le polyéthylène glycol (PEG) et le polyéthylène oxyde (PEO). Le PEG est un matériau hautement hydrophile. Il se lie aux molécules d'eau et forme une couche d'hydratation superficielle, qui inhibe efficacement l'adsorption des protéines plasmatiques et la plupart des composants du sang tels que le fibrinogène et les lysozymes. Actuellement, le PEG est certifié par la Food Drug Administration comme additif pour différents biomatériaux. En tant que macromolécule bioinerte, le PEG est également reconnu comme non immunogène. Ainsi, le PEG est souvent utilisé pour améliorer l'hémocompatibilité des biomatériaux (Ren *et al.* 2015). Le PEO est considéré comme le polymère avec l'un des plus faibles niveaux d'adsorption cellulaire et protéique de tout polymère connu. Cette propriété est liée à la présence d'un oxyde d'éther hydrophile dans son unité répétitive structurale. Le PEO est donc utilisé comme revêtement pour améliorer l'hémocompatibilité des substituts vasculaires. Han *et al.* ont montré que l'association de PEO à des prothèses en polyuréthane semblait diminuer l'adhésion plaquettaire ainsi que la formation de thrombus après 39 jours d'implantation chez le chien (Han *et al.* 2006). Bien que les revêtements à base de PEG ou de PEO puissent améliorer l'hémocompatibilité en limitant l'adsorption non spécifiques de protéines de surface, le PEG et le PEO

peuvent également être auto-oxydés rapidement, en particulier en présence d'oxygène et d'ions de métaux de transition, qui existent généralement dans les milieux biologiques (Ren *et al.* 2015).

L'albumine. L'albumine sérique est une protéine plasmatique ayant des fonctions très spécifiques, telles que le maintien de la pression osmotique dans le sang. Il est démontré que l'immobilisation d'albumine à la surface de biomatériaux peut masquer les sites d'activation du complément et réduire la thrombose et le taux d'hémolyse des biomatériaux (Ren *et al.* 2015). Pan *et al.* ont notamment utilisé l'albumine comme revêtement de surface du titane pour la réalisation de stents non thrombotiques et ont mis en évidence une meilleure hémocompatibilité des stents recouverts d'albumine (Pan *et al.* 2014).

Le carbone. En raison de son excellente biocompatibilité et de ses capacités à éviter la thrombose, le carbone est utilisé comme revêtement de nombreux dispositifs cardiovasculaires pour diverses applications médicales. Un tel revêtement peut être obtenu par dépôt de vapeurs chimiques de carbone pyrolytique dit graphitique à la surface des biomatériaux. Des prothèses en PTFE imprégnés de carbone ont ainsi été développées et commercialisées, comme la prothèse Carboflo® (Bard Peripheral Vascular). Cependant, une étude multicentrique prospective randomisée n'a pas pu démontrer la supériorité de ces prothèses Carboflo® par rapport aux prothèses en ePTFE standard, notamment en terme de perméabilité (Kapfer *et al.* 2006).

Les polymères zwitterioniques. Les polymères zwitterioniques sont des polymères hydrophiles et non fluides. Ils disposent de fractions cationiques et anioniques sur la même chaîne latérale tout en maintenant la neutralité globale de la charge. Ils génèrent la création d'une couche d'eau structurée et étroitement liée, réduisant considérablement l'adsorption des protéines et l'adhésion plaquettaire et permettant un meilleur contrôle de la cascade de coagulation et de l'inflammation. Les polymères zwitterioniques incluent notamment la phosphocholine, la sulfobetaine et la carboxylbetaine (Ren *et al.* 2015). Ainsi, plusieurs auteurs utilisent les polymères zwitterioniques pour le développement de matrices en ingénierie vasculaire (Lin *et al.* 2014, Ye *et al.* 2014)

L'élastine. L'élastine est une protéine structurelle de la paroi vasculaire. Ito *et al.* ont démontré *in vitro* que le revêtement d'alpha élastine dérivée des tissus vivants sur des prothèses en PET pouvaient inhiber la migration des cellules musculaires lisses sans altérer la formation de la monocouche endothéliale (Ito *et al.* 1998). De plus, Jordan *et al.* ont élaboré des prothèses en ePTFE recouvertes de polymères protéiques recombinants mimant l'élastine, montrant ainsi une réduction de la thrombogénicité du matériau dans un modèle de circuit vasculaire *ex-vivo* chez le primate (Jordan *et al.* 2007).

2.2.3.1.2 Les revêtements inhibant la formation de thrombine et de fibrine

L'héparine. L'héparine est un anticoagulant, qui a la structure d'un polysaccharide linéaire contenant des groupes sulfoniques, carboxyliques et sulfanilamide, pouvant être utilisé comme revêtement de surface pour inhiber l'adsorption des cellules et des protéines (Ren *et al.* 2015). Des prothèses en ePTFE et fonctionnalisées à l'héparine ont été développées et commercialisées, comme la prothèse Propaten® (W. L. Gore & Associates) Une étude clinique prospective randomisée a mis en évidence une réduction significative de 50% du risque d'échec d'un pontage fémoro-poplité avec l'utilisation de prothèses Propaten® en comparaison à des prothèses en ePTFE standard (Lindholt *et al.* 2011). Récemment, des études cliniques ont également montré la fiabilité du Propaten® pour des pontages fémoro-poplités (Samson *et al.* 2016) et de l'artère tibiale (Kaisar *et al.* 2017) Il persiste un risque théorique de thrombopénie induite à l'héparine. Cependant, peu de cas sont rapportés (Wheatcroft *et al.* 2011) et des études montrent que ce risque n'est pas avéré (Samson *et al.* 2016) ou lié seulement à la prise d'héparine en systémique et non à l'héparine mobilisée à la surface de la prothèse (Kasirajan 2012).

Les inhibiteurs directs de la thrombine. Certains inhibiteurs directs de la thrombine, tels que l'hirudine recombinante et l'argatroban, ne sont pas des constituant naturels des cellules endothéliales. L'hirudine est un peptide de 65 acides aminés, inhibiteur direct de la thrombine, indépendant de l'antithrombine III et des cofacteurs et qui n'est pas inactivé par PF4. L'argatroban est un dérivé synthétique de la L-arginine, inhibiteur direct de la thrombine qui se lie de façon réversible à la thrombine. L'argatroban exerce son effet anticoagulant indépendamment de l'antithrombine et inhibe la formation de fibrine, l'activation des facteurs de coagulation V, VIII et XIII, l'activation de la protéine C et l'agrégation plaquettaire. L'hirudine recombinante et l'Argatroban peuvent être utilisés pour fonctionnaliser des surfaces prothétiques vasculaires (Jordan and Chaikof 2007). Récemment, Wang *et al.* ont élaboré des substituts issus de l'ingénierie vasculaire en utilisant des fibres de soie modifiées par l'hirudine et ont montré une meilleure hémocompatibilité des surfaces contenant de l'hirudine. De plus, plus la concentration d'hirudine était élevée, plus la prolifération des cellules musculaires lisses était faible (Wang *et al.* 2017).

La thrombomoduline. Comme décrit précédemment, la TM a un rôle fondamental dans la cascade de la coagulation. Elle bloque la coagulation en liant la thrombine et en stimulant l'activation de la protéine C, qui inactive les facteurs de coagulation VIIIa et Va (*cf. partie 2.2.1.1.2 Exploration d la coagulation*). Plusieurs chercheurs ont donc immobilisé la TM sur des polymères. Le but était de créer des surfaces limitant la génération locale de thrombine par production de protéine C activée, plutôt que d'inactiver la thrombine, déjà produite. Ainsi, Tseng *et al.* ont immobilisé de la TM et de l'héparine sur des membranes mimétiques et ont mis en évidence une inhibition significative de l'activité de la thrombine en utilisant un circuit de flux continu (Tseng *et al.* 2006).

2.2.3.1.3 *Les revêtements inhibant l'activation plaquettaire*

Les molécules « donneuses de NO ». Comme décrit précédemment, le NO joue un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire, la prévention de l'agrégation plaquettaire et l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses. Ainsi, des stratégies sont développées pour permettre la fixation de molécules relarguant du NO à la surface du biomatériau. Le diazeniumdiolate et le nitrosothiol sont connus pour être des molécules dites « donneuses de NO » et peuvent être liées au biomatériau par liaison covalente ou non covalente afin d'améliorer l'hémocompatibilité des substituts (Varu *et al.* 2009). Anis, Fleiser *et al.* ont élaboré des prothèses en polyuréthane revêtues de diazeniumdiolate, par adsorption de ce dernier. Les résultats obtenus ont mis en évidence une meilleure hémocompatibilité pour les prothèses en polyuréthane revêtues de diazeniumdiolate en comparaison aux prothèses en polyuréthane. En effet, après 21 jours d'implantation chez la brebis, la surface des prothèses en polyuréthane revêtues de diazeniumdiolate ne montraient ni thrombus, ni plaquettes adhérentes, ni infiltration de cellules inflammatoires (Fleiser *et al.* 2004).

Les agents antiplaquettaires. Différents antiplaquettaires peuvent être utilisés et mobilisés à la surface des substituts vasculaires tels que dipyridamole et l'iloméidine (Jordan and Chaikof 2007). L'iloméidine, est un analogue de synthèse de la prostaglandine 2, inhibant l'agrégation plaquettaire et favorisant la vasodilatation. L'iloméidine (Iloprost®) a notamment été utilisé en association avec l'hirudine et le PEG pour modifier l'état de surface de prothèses en ePTFE pour des pontages fémoro-poplités chez le cochon. Les résultats obtenus après 6 semaines d'implantation ont montré que les prothèses en ePTFE revêtues du complexe hirudine-PEG-dipyridamole permettaient une diminution significative de l'hyperplasie myointimale en comparaison à des prothèses en ePTFE standards (Heise *et al.* 2006). Le dipyridamole inhibe la capture de l'adénosine dans les plaquettes, les cellules endothéliales et les hématies. Selon Adenhoff *et al.*, le dipyridamole, associé à des prothèses en polyuréthanes permettait la réduction de l'adhésion plaquettaire *in vitro* ainsi qu'une amélioration de la perméabilité prothétique chez la chèvre (Aldenhoff and Koole 2003).

2.2.3.2 Modification de surface pour favoriser l'endothélialisation

L'hémocompatibilité des substituts vasculaires synthétiques peut être améliorée en utilisant des revêtements permettant d'obtenir des surfaces hautement hydrophiles. Cependant, de telles surfaces empêchent l'adhésion des CEs ainsi que l'endothélialisation du substitut. Or, la ré-endothélialisation des substituts vasculaires synthétiques *in situ* jouent un rôle clé pour prévenir la formation de thrombus et éviter la resténose de ces surfaces. L'endothélialisation (non spontanée chez l'Homme) est donc la stratégie la plus prometteuse pour fabriquer des matériaux non thrombogènes. Les cellules endothéliales peuvent être ensemencées sur le substitut synthétique avant

implantation (endothélialisation *in vitro*) ou recrutées in situ (endothélialisation *in situ*) (Adipurnama *et al.* 2016).

Actuellement, de nombreuses stratégies sont développées pour modifier l'état de surface des substituts synthétiques et favoriser l'adhésion *in vitro* des CEs. De nombreux peptides d'adhésion ont été développés pour favoriser l'adhésion des cellules endothéliales. Par rapport aux protéines, les peptides ont des structures simples et une grande stabilité. Ils peuvent être greffés ou immobilisés de manière covalente sur des surfaces synthétiques par réaction physique ou chimique (Ren *et al.* 2015).

2.2.3.2.1 Endothélialisation *in vitro*

Le peptide RGD et les peptides dérivés du RGD. En 1984, Erkki Ruoslahti *et al.* ont découvert, au sein de la fibronectine, une séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD), élément essentiel dans la reconnaissance des cellules via l'intégrine (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). De part leur petite structure de trois acides aminés, ce site de reconnaissance peut aisément être reproduit ou mimé par des peptides de synthèse. Les peptides RGD linéaires et cycliques peuvent améliorer l'adhésion et la prolifération de la CE. Les séquences linéaires RGD, GRGDSP, GRGDNP et RGDSPASSKP se lient préférentiellement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, tandis que les peptides RGD cycliques, incluant GPenGRGDSPCA et cyclo (RGDf (NMe) V), se lient préférentiellement à $\alpha v\beta 3$. Par rapport à RGD linéaire, les peptides RGD cycliques sont habituellement stables *in vivo* en présence d'enzymes (Bellis 2011). Cependant, les substituts vasculaires fonctionnalisés par des peptides RGD conduisent également à l'adhésion des plaquettes. En effet, le peptide RGD a la capacité de reconnaître l'intégrine $\alpha II\beta III$. Ainsi, des stratégies doivent être développées pour éviter cette adhésion plaquettaire. La limitation de la prolifération des CMLs est également un facteur important à prendre en compte en ingénierie vasculaire. Or les peptides RGD et ses peptides dérivés peuvent également améliorer l'adhésion des CMLs. Ainsi, des recherches sont en cours pour élaborer des RGD se liant à des intégrines spécifiques des cellules endothéliales (Ren *et al.* 2015).

Le peptide CAG. Kanie *et al.* ont mis en évidence des tripeptides sélectifs de la CE et des tripeptides sélectifs des CMLs (Kanie *et al.* 2012). Parmi ces tripeptides sélectifs de la CE, le tripeptide Cys-Ala-Gly (CAG) possède une affinité élevée pour les EC et une affinité pour les CMLs inférieure au peptide RGD (Ren *et al.* 2015). Kanie *et al.* ont montré que l'association du motif CAG à des fibres obtenues par électrospinning améliorait *in vitro* l'adhésion des CEs avec un taux presque double par rapport aux CMLs. En outre, les CEs étaient étalées en recouvrant une surface importante, alors que les CMLs semblaient rétrécies et arrondies (Kanie *et al.* 2012).

Le peptide REDV. Le térapeptide, Arg-Glu-Asp-Val (REDV), est un peptide dérivé de la fibronectine qui peut se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, présente abondamment sur les CEs et de façon peu

importante sur les CMLs (Ren *et al.* 2015). Récemment, Wang *et al.* ont étudié *in vitro* la migration cellulaire, l'adhésion et la prolifération de CEs issues de la veine ombilicale humaine et *in vivo* la formation de vaisseaux sanguins sur des matrices en alginate modifiées par des peptides REDV, RGD et YIGSR. Le peptide REDV était le peptide le plus performant pour augmenter la prolifération des CEs et favoriser l'angiogenèse *in vivo* (Wang *et al.* 2015).

Le peptide YIGSR. Le pentapeptide Tyr-Lle-Gly-Ser-Arg (YIGSR), dérivé de la laminine, peut se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Il assure l'adhésion et la migration de nombreuses cellules, comme les EC, les fibroblastes et les CMLs (Ren *et al.* 2014). Le peptide YIGSR a notamment été greffé sur des surfaces en polyuréthane. La présence du peptide YIGSR améliorait l'adhésion, l'étalement, la prolifération, la migration et la production de matrice extracellulaire des cellules endothéliales, sans favoriser l'adhésion plaquettaire (Jun and West 2004). En plus des séquences peptidiques citées précédemment, de nombreux peptides impliqués dans l'adhésion cellulaire sont étudiés, notamment la séquence Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg (SVVYGLR). Cette séquence peut être reconnue par les intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ (Ren *et al.* 2014). Hamada *et al.* ont montré que le peptide synthétique SVVYGLR n'avait pas d'effet sur la prolifération des cellules endothéliales, mais favorisait l'adhésion et la migration des cellules endothéliales (Hamada *et al.* 2003).

2.2.3.2.2 Endothélialisation *in situ*

Une autre approche consiste à favoriser l'endothélialisation *in situ* par recrutement des cellules de l'hôte. Ainsi, les matériaux sont élaborés de façon à promouvoir l'attachement *in situ* des CEs mais également des EPCs, qui ont le potentiel de se différencier en ECs fonctionnelles matures (*cf. partie 1.3.3.3 Les progéniteurs endothéliaux*).

Comme décrit précédemment, les propriétés physiques et chimiques de la surface du matériau régulent indirectement le comportement des cellules. Les différences d'hydrophilie peuvent notamment provoquer des variations quantitatives et qualitatives dans les protéines adsorbées.

En plus des modifications de surface, le greffage de molécules actives est une stratégie utilisée pour améliorer le recrutement *in situ* de CEs et d'EPCs. Plusieurs molécules spécifiques et non spécifiques ont été étudiées pour induire la capture et la fixation des cellules et dont certaines sont prometteuses : l'anticorps anti-CD34, les aptamères d'acide nucléique le VEGF (Ren *et al.* 2014). Le VEGF est la cytokine la plus utilisée dans le domaine de l'ingénierie vasculaire. Cependant, certains chercheurs suggèrent que le VEGF soluble pourrait être internalisé et ensuite dégradé après liaison à la cellule, réduisant ainsi son activité et son efficacité. De plus, le VEGF agirait localement et donc influencerait moins la mobilisation des EPCs que l'anticorps anti-CD34 (Melchiorri *et al.* 2015). En outre, les cytokines ont une faible demi-vie dans la circulation, entraînant rapidement une perte de son

efficacité. Il est rapporté que la thérapie génique peut améliorer l'expression continue de protéines (Ren *et al.* 2014).

2.2.3.3 Modification génétique pour favoriser l'endothélialisation

La manipulation génétique est une stratégie alternative et favorable, car la transfection des cellules endothéliales peut permettre la régénération rapide d'une monocouche endothéliale à la surface luminale des substituts vasculaires. Le transfert de gènes dans les CE nécessite l'utilisation de vecteurs non viraux, présentant moins de risques pour les patients. Actuellement, les vecteurs non viraux utilisés sont : les liposomes, les polyéthylèneimines, les dendrimères cationiques, les polysaccharides cationiques et les polymères modifiés par PEG ou polymères zwitterioniques.

Les modifications génétiques s'intéressent principalement à des facteurs de croissance comme le FGF et le VEGF. Le FGF peut favoriser la mitose des fibroblastes, la migration de la CE et la prolifération des SMC et agit comme un stimulant de la vasculogénèse (Lavu *et al.* 2011). Le VEGF est également impliqué dans les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse en agissant notamment sur la mitose de la CE. La fonction biologique des VEGF est régulée par son récepteur membranaire spécifique (VEGFR) (Nesselmann *et al.* 2010).

Des gènes cibles sont également concernés, tel que le gène ZNF580. Il contient 172 acides aminés et joue un rôle important dans la prolifération et la migration des EC. (Luo *et al.* 2011, DangLi *et al.* 2012). Ainsi, Shi *et al.* ont transfectés des CE avec le gène ZNF580 (Shi *et al.* 2014).

Une stratégie consiste également à produire des matrices biomimétiques incorporant des plasmides pour améliorer la prolifération des CE. Ces matrices peuvent être obtenues par électrospinning et ont généralement une grande structure poreuse interconnectée, idéale pour la libération contrôlée de molécules bioactives, de facteurs de croissance et de gènes (Gustafsson *et al.* 2012).

<p>En conclusion, l'ingénierie vasculaire tend à produire des substituts vasculaires fonctionnels. Leur élaboration nécessite l'obtention d'une balance entre propriétés mécaniques et propriétés biologiques. Dans ce contexte, les hydrogels de chitosane peuvent constituer une matrice de choix en ingénierie vasculaire. En effet, leurs propriétés biologiques sont déjà reconnues et les propriétés mécaniques peuvent être généralement modulées.</p>
--

3 HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE ET INGENIERIE VASCULAIRE

3.1 Généralités sur le chitosane

3.1.1 Définition et structure du chitosane

Le chitosane est un copolysaccharide constitué d'unités de répétition D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés par des liaisons β -(1 \rightarrow 4), où le glucosamine est l'unité répétée prédominante (*Figure 59*). Le chitosane possède une structure proche de celle de l'acide hyaluronique. Il est ainsi apparenté à la famille des glycosaminoglycane, polysaccharides présents dans la MEC des tissus conjonctifs des mammifères.

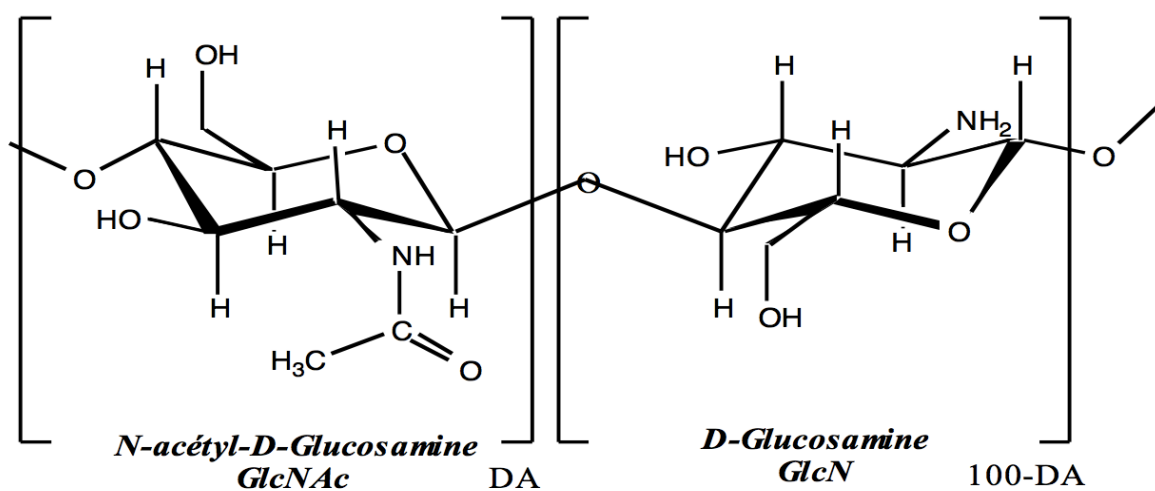


Figure 59 : Représentation de la structure chimique de chitosane

3.1.2 Production de chitosane

Le chitosane est présent dans la nature en faible quantité. Il est produit industriellement à partir de la chitine, un des polysaccharides les plus répandus dans la biosphère (Croisier and Jérôme 2013). La chitine et le chitosane possèdent la même structure chimique, riche en fonctions hydroxyles, leur conférant un caractère hydrophile. Le chitosane peut être considéré comme la forme N-désacétylée de la chitine même si la N-désacétylation est rarement complète (Ravi Kumar 2000).

Il n'existe pas de nomenclature officielle permettant de différencier la chitine du chitosane. Cependant, le chitosane et la chitine peuvent se différencier par le degré d'acétylation (DA). Le DA correspond au pourcentage d'unités acétylées (*nGlcNAc*) par rapport au nombre d'unités totales (*nGlcNAc+nGlcN*). La distinction entre chitine et chitosane repose surtout sur leur comportement en solution acide. En effet, il est admis que la frontière chitine/chitosane se situe autour de la valeur de

DA à 70% (Sorlier *et al.* 2002). En dessous de ce DA, il s'agit de chitosane. Le chitosane est soluble en milieu aqueux acide dilué, contrairement à la chitine qui est insoluble dans ce type de solvant.

3.1.2.1.1 Purification de la chitine

La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant, après la cellulose. Il se retrouve couramment chez les invertébrés, comme dans les coquillages de crustacés ou les cuticules d'insectes et aussi dans des enveloppes de champignons, des parois cellulaires d'algues vertes et des levures. À l'échelle industrielle, les deux principales sources de chitosane sont les crustacés et les champignons (Croisier and Jérôme 2013). La source est un critère fondamental, car les propriétés physico-chimiques du chitosane peuvent différer selon la source choisie (champignons ou crustacés) (Teng *et al.* 2001).

La chitine, est généralement associée à des protéines, des pigments et une phase minérale composée de carbonates de calcium et de phosphate de calcium. L'élimination de ces composés est une étape fondamentale pour obtenir de la chitine purifiée avant la N-désacétylation. Ceci implique le recours à des traitements complexes de purification. Le procédé, le plus couramment appliqué, est basé sur un procédé chimique acido-basique en trois étapes : déprotéinisation, déminéralisation et décoloration (*Figure 60*) (Muxika *et al.* 2017).

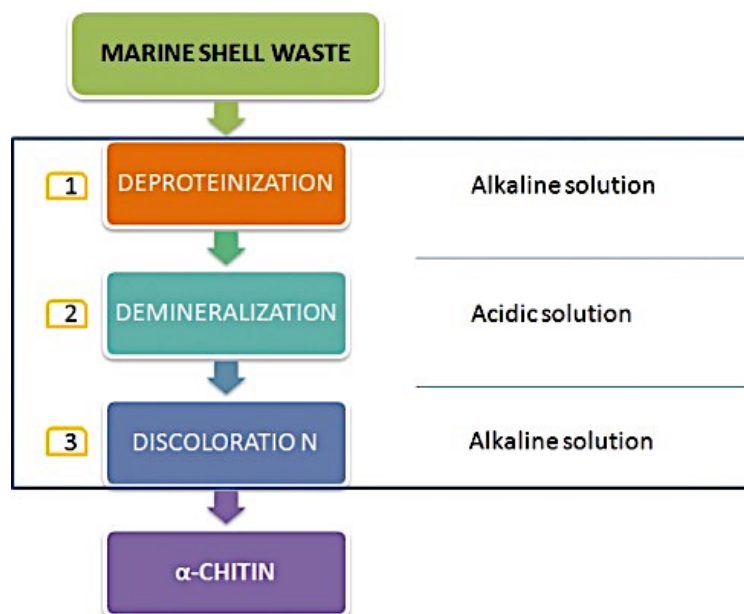


Figure 60 : Purification de la chitine

(Muxika *et al.* 2017)

La déprotéinisation est obtenue avec une solution alcaline et la déminéralisation en milieu acide, le plus souvent avec de l'acide chlorhydrique. La décoloration est réalisée en présence d'agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite de sodium ou le permanganate de potassium qui permet l'élimination des pigments résiduels, comme les caroténoïdes.

3.1.2.1.2 Obtention du chitosane par N- désacétylation de la chitine

Bien que la chitine soit abondante dans la nature et ait des caractéristiques fonctionnelles exceptionnelles (bioactivité, biodégradabilité, forte résistance mécanique), son utilisation reste limitée en raison de sa faible solubilité (Muxika *et al.* 2017).

La désacétylation de la chitine peut être obtenue par traitement enzymatique, par l'intermédiaire de chitine-désacétylases (Zhao *et al.* 2010). Cependant, le traitement chimique est préféré en raison de son coût inférieur et de sa pertinence pour la production de masse (Younes and Rinaudo 2015). La désacétylation chimique implique le traitement de la chitine avec des hydroxydes à des températures élevées, généralement supérieures à 80°C (Fai *et al.* 2011). Pour les traitements qui utilisent des concentrations élevées de NaOH (50-60%) et des températures élevées (130-150°C), la désacétylation se produit très rapidement (environ 2 heures). Néanmoins, dans des conditions plus drastiques, le poids moléculaire du chitosane diminue. Ainsi, pour atteindre une désacétylation totale, les réactions doivent être réalisées en conditions contrôlées afin d'obtenir un équilibre entre le processus de désacétylation et les propriétés finales du chitosane.

La désacétylation aboutit à la suppression de groupes acétyle (CH₃-CO) libérant les groupes amines et confère au chitosane un caractère cationique (*Figure 61*) (Muxika *et al.* 2017).

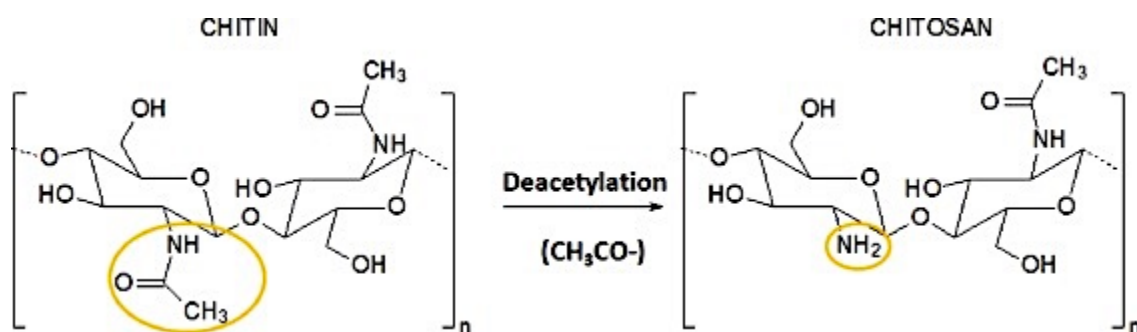


Figure 61 : Désacétylation de la chitine

(Muxika *et al.* 2017)

3.2 Propriétés du chitosane

3.2.1 Propriétés physico-chimiques du chitosane

3.2.1.1 Degré d'acétylation (DA)

Après désacétylation de la chitine, le chitosane peut être réacétylé. Le DA de la chaîne polymère doit rester inférieur à 70% en utilisant un procédé d'acétylation en milieu homogène (solution de polymère). L'acétylation du chitosane est réalisée, en milieu hydroalcoolique, à température ambiante et en conditions homogènes. La réaction se fait en présence d'un réactif acétylant (donneur de groupe acétylé), tel que l'anhydride acétique et en présence d'alcool (co-solvant), empêchant l'acétylation des fonctions hydroxyles. Le méthanol et le 1,2propanediol sont les co-solvants les plus couramment utilisés.

3.2.1.2 Masse moléculaire (MM)

La masse moléculaire du chitosane peut varier, notamment selon la source utilisée et la procédure de préparation. En effet, la chaîne polymère peut être dégradée notamment au cours des traitements de purification et d'acétylation, diminuant ainsi la masse moléculaire. Selon la littérature, le poids moléculaire peut varier de 300 à plus de 1000 kD (Kim *et al.* 2008). La masse moléculaire du chitosane peut être déterminée par plusieurs techniques, après mise en solution du polymère : viscosimétrie capillaire ou dynamique à l'aide de l'équation de Mark-Houwink-Sakurada ; diffusion statique de la lumière via la construction d'un diagramme de Zimm et enfin chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière. Cette dernière technique est la plus couramment utilisée. Il est important de déterminer la masse moléculaire du chitosane car elle influence de nombreux paramètres physico-chimiques. Plus le poids moléculaire est important, plus les membranes de chitosane ont tendance à être visqueuses. En raison de sa masse moléculaire élevée et de sa structure linéaire non ramifiée, le chitosane est un agent de forte viscosité dans les milieux acides et se comporte généralement comme un matériau pseudo-plastique (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015). Le poids moléculaire est également en lien avec l'affinité et la perméabilité aux protéines sériques. Lorsque le poids moléculaire est plus important, l'affinité aux protéines sériques augmente tandis que la perméabilité diminue (Chen *et al.* 2002). De plus, les poids moléculaires élevés, sont généralement associés à des taux de résorption du chitosane plus importants (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015).

3.2.1.3 Méthodes de caractérisation du chitosane

La technique de caractérisation du chitosane la plus précise est la RMN ^1H en phase liquide. L'analyse RMN du chitosane se fait à partir d'une faible quantité d'échantillon lyophilisé, dissout dans une solution de $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$, à 70°C afin de favoriser la solubilisation. La détermination du DA est réalisée suivant la méthode proposée par *Hirai et al.* (Hirai A. 1991) et consiste en la comparaison de l'intensité de résonance magnétique des protons H des résidus GlcNAc (2 ppm) avec celle des protons H2 à H6 des résidus GlcN et GlcNAc (3 – 4,2 ppm). Le DA est alors calculé selon la formule suivante : $\text{DA} (\%) = 100 \cdot \frac{I_{\text{H3}}}{I_{\text{H2-H6}}}$ où I_{H3} et $I_{\text{H2-H6}}$ sont les intensités intégrées. La spectroscopie RMN permet donc la caractérisation rapide, précise et reproductible du chitosane faisant d'elle la technique la plus couramment utilisée. Toutefois, elle n'est applicable que pour des DA auxquels le chitosane est soluble, soit inférieur à 60% (Lavertu *et al.* 2003). La caractérisation du chitosane insoluble peut être alors réalisée par RMN ^{13}C , qui constitue une alternative.

3.2.2 Propriétés mécaniques du chitosane

La porosité est un critère important en ingénierie tissulaire. Plusieurs méthodes sont utilisées pour préparer des matrices de chitosane poreuses comme la séparation de phase thermiquement induite. Plus la température est basse, plus la teneur en eau est grande, plus la taille des pores est faible. La structure poreuse peut être stabilisée en ajoutant du glutaraldéhyde, du polyéthylène glycol, de l'héparine, ou du collagène (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015). Concernant la perméabilité à l'eau, les membranes de chitosane peuvent absorber et conserver un volume d'eau donné dans leur réseau tridimensionnel. Cette capacité est fortement influencé par la masse moléculaire (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015). Les membranes de chitosane sont généralement considérés comme très rigides et fragiles et donc possédant une faible résistance mécanique. Afin d'optimiser la résistance et l'élasticité, des agents de réticulation peuvent être utilisés, tels que le formaldéhyde, des époxydes réagissant avec du polyéthylène glycol, des dialdéhydes et de l'amidon (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015).

3.2.3 Propriétés biologiques du chitosane

3.2.3.1 Biocompatibilité

Actuellement, les tests cliniques réalisés n'ont signalé aucune réaction inflammatoire ou allergique après implantation, injection, application topique ou ingestion de chitosane dans le corps humain (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015). La DL50 (dose létale médiane) du chitosane a été évaluée dans différentes conditions. Chez le rat, la DL50 était de 1500 mg/kg pour la voie orale et de

3000 mg/kg pour la voie intrapéritonéale. Chez la souris, la DL50 était supérieure à 10 000 mg/kg pour la voie sous-cutanée, de 5200 mg/kg pour la voie intrapéritonéale et supérieure à 16 000 mg/kg par voie orale, dernière valeur équivalente à celle du saccharose (Baldrick 2010). La biocompatibilité du chitosane est probablement liée au fait que le chitosane est constitué de GlcN et GlcNac, composants naturels des tissus de mammifères. Cependant, le caractère inflammatoire du chitosane est fortement lié au DA. En effet, Barbosa *et al.* ont montré que des matrices de chitosane à fort DA (DA=15%) induisait une réponse inflammatoire plus importante que des matrices de chitosane à plus faible DA (DA=4%) (Barbosa *et al.* 2010).

De nombreuses études ont également démontré la cytocompatibilité du chitosane, notamment vis à vis des kératinocytes, des chondrocytes, des ostéoblastes, des hépatocytes et des cellules de Schwann. Cependant, le DA peut être un caractère critique dans la cytocompatibilité. En effet, Rami *et al.* ont démontré que la cytocompatibilité d'hydrogels de chitosane vis à vis de CEs et de cellules souches mésenchymateuses était fortement influencée par le DA. Pour une même concentration en chitosane et pour un même procédé de gélification, la cytocompatibilité était améliorée pour des DA faibles (DA=5%), comparativement à des DA forts (DA=35%) (Rami *et al.* 2014). En modulant les propriétés physico-chimiques, les réponses biologiques peuvent être adaptées et ainsi obtenir un matériau bioactif.

Le chitosane et ses oligomères sont également considérés comme des substances non immunogènes et hypoallergéniques. Le chitosane stimulent l'activité des macrophages en augmentant l'oxyde nitrique, le TNF- α , l'IL-1, ainsi que le TGF- β et le PDGF. Cependant, comme il n'y a pas de protéines et de lipides dans la structure, l'hôte ne développe pas des anticorps spécifiques contre le chitosane, à moins qu'il ne soit associée à d'autres substances telles que l'albumine (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015).

3.2.3.2 Biodégradabilité

La biodégradabilité est une propriété fondamentale en ingénierie tissulaire, notamment dans pour des applications vasculaires. Le chitosane n'est pas seulement un polymère portant des groupes amines, mais également un polysaccharide contenant des liaisons glycosidiques hydrolysables. Ainsi, le chitosane peut être dégradé *in vivo* par des chitinases. Actuellement, huit chitinases humaines ont été identifiées, trois d'entre elles possédant une activité enzymatique sur le chitosane (Funkhouser and Aronson 2007). La biodégradation du chitosane conduit à la formation d'oligosaccharides non toxiques de longueur variable. Ces oligosaccharides peuvent être incorporés dans les voies métaboliques ou encore être excrétés (Rodriguez-Vázquez M. *et al.* 2015).

Le taux de dégradation du chitosane est lié, notamment, au DA et à la MM. Lila *et al.* ont montré que des hydrogels de chitosane avec un DA important (DA=35%) étaient résorbés plus rapidement après implantation sous cutanée chez le rat que des hydrogels de chitosane avec un DA faible (DA=5%) (Rami *et al.* 2014).

3.2.3.3 Propriétés antibactériennes

Le chitosane inhibe la croissance de nombreux types de champignons, de levures et de bactéries, parmi lesquelles *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*. La propriété antibactérienne du chitosane repose sur son caractère polycationique. En solution, ses résidus GlcN (-NH₂) sont protonnés (-NH₃⁺). Les charges positives du chitosane peuvent ainsi se lier à la membrane des bactéries chargées négativement. Ces interactions entraînent la diminution de la stabilité osmotique, la destruction de la membrane et éventuellement la perte des éléments intra-bactériens.

Différents paramètres influencent le caractère antibactérien du chitosane, tels que le pH ou encore la MM ou le DA (Tayel *et al.* 2010). En effet, la diminution du pH augmente l'activité antibactérienne du chitosane du fait de la protonation des amines (Devlieghere *et al.* 2004). Le chitosane de faible MM traverse plus facilement la membrane des bactéries dont il inhibe la synthèse des ARNm (Qi *et al.* 2005). Le DA influence également l'activité antibactérienne du chitosane. En effet, le chitosane de faible MM et faible DA sont plus bactéricides que ceux de haute MM et fort DA (Tayel *et al.* 2010).

3.2.4 *Applications médicales du chitosane*

Le chitosane offre plusieurs avantages telles que la biocompatibilité et la biodégradabilité contrôlée pour des applications biomédicales. Le chitosane est notamment utilisé comme agent antimicrobien, anticoagulant sanguin, immunoadjuvant ou encore en tant que pansements. Il peut également servir pour l'administration contrôlée de médicaments ou comme matrice en ingénierie des tissus et notamment en ingénierie vasculaire (*cf. partie 3.3.2 Hydrogels de chitosane et ingénierie vasculaire*) (Muxika *et al.* 2017)

3.3 Hydrogels de chitosane et ingénierie vasculaire

3.3.1 Production d'hydrogels de chitosane

3.3.1.1 Définition d'un hydrogel

Pour des applications médicales, le chitosane peut être utilisés sous différentes formes physiques : lyophilisats, fibres ou encore hydrogels (Boucard *et al.* 2005).

Par définition, les gels sont composés d'une phase solide, représentant généralement moins de 10% du volume total du gel et une phase liquide. Dans les hydrogels, la phase liquide correspond à de l'eau, parfois associée à des adjuvants. La phase solide assure la cohérence du gel (Croisier and Jérôme 2013). Les hydrogels sont des biomatériaux intéressants car leur haute teneur en eau les rend compatibles avec la majorité des tissus vivants. De plus, les hydrogels sont relativement flexibles, minimisant les dommages causés au tissu environnant pendant et après l'implantation chez le patient (Kean and Thanou 2011). Les propriétés mécaniques des hydrogels ont tendance à imiter celles des tissus mous humains, permettant aux hydrogels d'assurer à la fois les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques du tissu à réparer. Ils sont donc couramment utilisés comme échafaudages en ingénierie tissulaire.

3.3.1.2 Hydrogels de chitosane

Trois principaux types d'hydrogels de chitosane, dont la gélification est réversible ou irréversible, sont actuellement développés : les hydrogels physiques (liaisons non covalentes) (*Figure 62a*), les hydrogels de chitosane associés à des ions métalliques (*Figure 62b*) et les hydrogels chimiques (liaisons covalentes) (*Figure 62c*) (Croisier and Jérôme 2013).

L'élaboration des hydrogels chimiques nécessite l'emploi d'agents réticulants entraînant la formation de liaisons covalentes entre les chaînes polymères rendant l'hydrogel ni thermoréversible, ni solvoréversible. Les hydrogels de chitosane associés à des ions métalliques sont obtenus par formation de complexes avec des ions métalliques comme le platinium, le palladium et le molybdène. Cependant, ces complexes restent peu utilisés pour des applications médicales (Croisier and Jérôme 2013). Les hydrogels physiques disposent de liaisons de faible énergie, leur procurant un caractère réversible en fonction du contexte physico-chimique.

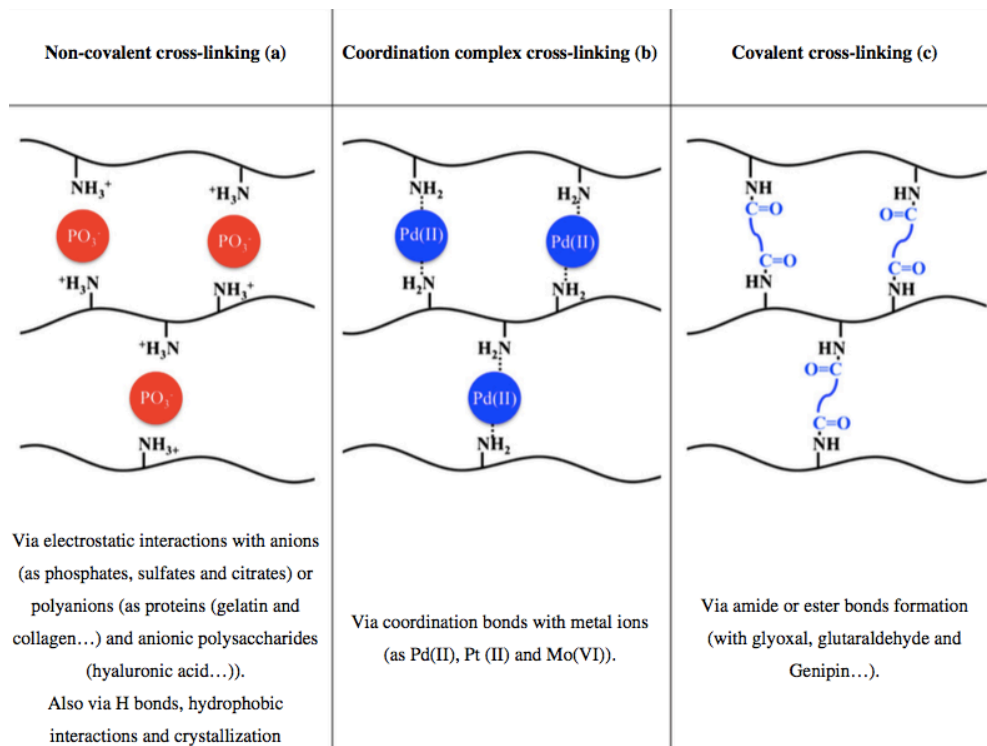


Figure 62 : Hydrogels physiques (a), chimiques (b) ou associés à des ions métalliques (c)

(Croisier and Jérôme 2013)

3.3.1.2.1 Hydrogels physiques de chitosane

La formation d'hydrogels physiques est basée sur ses interactions réversibles qui peuvent se produire entre les chaînes polymères. Ces interactions peuvent dépendre de divers paramètres tels que le pH, la concentration et la température (Croisier and Jérôme 2013). Les hydrogels physiques de chitosane peuvent être formés selon trois voies : la formation de complexes ioniques, de complexes électrolytiques et de complexes hydrophobes.

Pour les complexes ioniques, le mode de réticulation met en jeu des ions NH_3^+ qui interagissent avec des anions ou des fonctions anioniques telles que le sulfate, le citrate, ou des polyphosphates. Des hydrogels de chitosane thermosensibles peuvent être obtenus en mélangeant du chitosane avec des sels de polyols, comme le sel de disodium au phosphate de glycérol (Chenite *et al.* 2000).

La formation des complexes électrolytiques est basée sur l'interaction entre la chaîne polymère de chitosane et des molécules chargées négativement, des polyanions naturels et synthétiques. Différents polyanions naturels sont utilisés dans la littérature tels que des protéines (gélatine, collagène, kératine, albumine et fibroïne), des polysaccharides anioniques (acide

hyaluronique, alginate, pectine, héparine, xanthane, sulfate de dextrane, sulfate de chondroïtine, fucoïdane) et des glycosaminoglycanes Des polyanions synthétiques, tels que le polyacide acrylique peuvent également être utilisé pour produire des hydrogels de chitosane (de Oliveira *et al.* 2008).

Montembault *et al.* ont également décrit des gels exclusivement constitués de chitosane et d'eau et basé sur la création de complexes hydrophobes. Le chitosane est solubilisé dans une solution à pH acide. Après évaporation, la solution est neutralisée par des vapeurs d'ammoniac (Montembault *et al.* 2005, Montembault *et al.* 2005).

3.3.1.2.2 *Hydrogels chimiques de chitosane*

La formation des hydrogels chimique se produit par liaison covalente entre les chaînes polymères. Les hydrogels de chitosane chimiques peuvent être obtenus en utilisant des agents de réticulation, tels que le glyoxal, le glutaraldéhyde, qui réagissent rapidement avec les groupes amines des unités de D-glucosamine du chitosane et, dans une moindre mesure, avec les groupes hydroxyle de chitosane. Le tripolyphosphate, l'éthylène glycol, l'éther diglycidyle et le diisocyanate peuvent également être utilisé comme agents de réticulation (Croisier and Jérôme 2013). Cependant, ces agents de réticulation peuvent engendrer une toxicité des hydrogels formés, préoccupation majeure compte tenu de la future application des hydrogels en tant que biomatériaux (Leung 2001).

La génipine est largement utilisée comme agent de réticulation alternatif. Ce réticulant se dégrade plus lentement que les autres réticulants (comme le glutaraldéhyde) et les études actuelles ne semblent montrer aucune toxicité (Muzzarelli *et al.* 2015, Muzzarelli *et al.* 2016).

Les hydrogels obtenus sont plus stables que les hydrogels physiques car la gélification est irréversible. Cependant, cette approche nécessite la modification chimique de la structure primaire du chitosane, qui peut altérer ses propriétés initiales, en particulier si des groupes amines sont impliqués dans la réaction. En outre, la réaction impliquée peut être une source de contamination par des réactifs résiduels toxiques (Croisier and Jérôme 2013).

3.3.2 *Hydrogels de chitosane en ingénierie vasculaire*

L'ingénierie tissulaire implique la conception de matrice, notamment à base de polymère, pour la modulation de la croissance et de la différenciation des cellules. Les matrices doivent répondre à un cahier des charges précis en terme de propriétés biologiques et mécaniques (*cf. partie 2. Cahier des charges des substituts vasculaires*).

Les structures à base de chitosane sont reconnues comme des matrices de choix en ingénierie tissulaire, en raison de leur similitude structurale avec les glycosaminoglycanes de la MEC, des propriétés morphologiques et mécaniques similaires à celles du collagène et de la possibilité de contrôler la taille des pores. Les matrices à base de chitosane sont donc couramment utilisées en ingénierie tissulaire, notamment de la peau, de l'os, du cartilage, des implants dentaires et également dans le domaine neuronal et vasculaire (Ahsan *et al.* 2017).

Les matrices à base de chitosane sont également utilisées en ingénierie vasculaire, notamment en raison de leurs propriétés biologiques. Cependant, le chitosane ne semble pas présenter les résistances mécaniques suffisantes pour composer seul un substitut vasculaire (Khait and Birla 2012). Ainsi, dans la littérature, le chitosane est souvent associé à une matrice qui assure le rôle de support mécanique. Le chitosane permet principalement d'améliorer les propriétés biologiques des produits d'ingénierie vasculaire. Il peut s'agir de polymères biologiques telle que la cellulose (Azevedo *et al.* 2013) ou de polymères synthétiques (Yao *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2014, Fukunishi *et al.* 2016). Fukunishi *et al.* ont élaboré des matrices à base de polycaprolactone et de chitosane. Le substitut obtenu présentait des propriétés mécaniques du substitut comparables à celle de la carotide et favorisait l'infiltration cellulaire avec formation de néo-tissus sans calcification et sans anévrisme (Fukunishi *et al.* 2016). Des matrices, à base de polycaprolactone et de chitosane, ont été également fonctionnalisées de l'héparine, améliorant l'endothélialisation *in situ*, empêchant la survenue de resténose (Yao *et al.* 2014). Des matrices à base de collagène humain, de chitosane et d'acide polylactique ont été produites par électrospinning pour l'ingénierie vasculaire. Les substituts vasculaires obtenus présentaient une structure plus biomimétique que l'acide polylactique et une meilleure hémocompatibilité (Zhu *et al.* 2014). Peu d'études rapportent l'utilisation de matrices composées exclusivement de chitosane en ingénierie vasculaire (Kong *et al.* 2012).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Le chitosane était une matrice de choix en raison de ses nombreuses propriétés biologiques qui répondaient au cahier des charges des biomatériaux utilisables pour l'ingénierie vasculaire. Dans le cadre de travaux antérieurs, nous avons démontré l'impact des modifications physico-chimiques d'hydrogels physiques sur leurs propriétés biologiques et ainsi déterminé la composition physico-chimique optimale (Rami *et al.* 2014). Ainsi, nous avons produit deux types d'hydrogels physiques de chitosane Ch5 (masse molaire de 500 000 g/mol, concentration en chitosane de 5%, DA de 5%, obtenue par voie hydroalcoolique) et Ch10 (masse molaire de 500 000 g/mol, concentration en chitosane de 10%, DA de 5%, obtenue par voie aqueuse), sous forme planaire ou tubulaire, selon les expérimentations à réaliser (*Figure 63*).

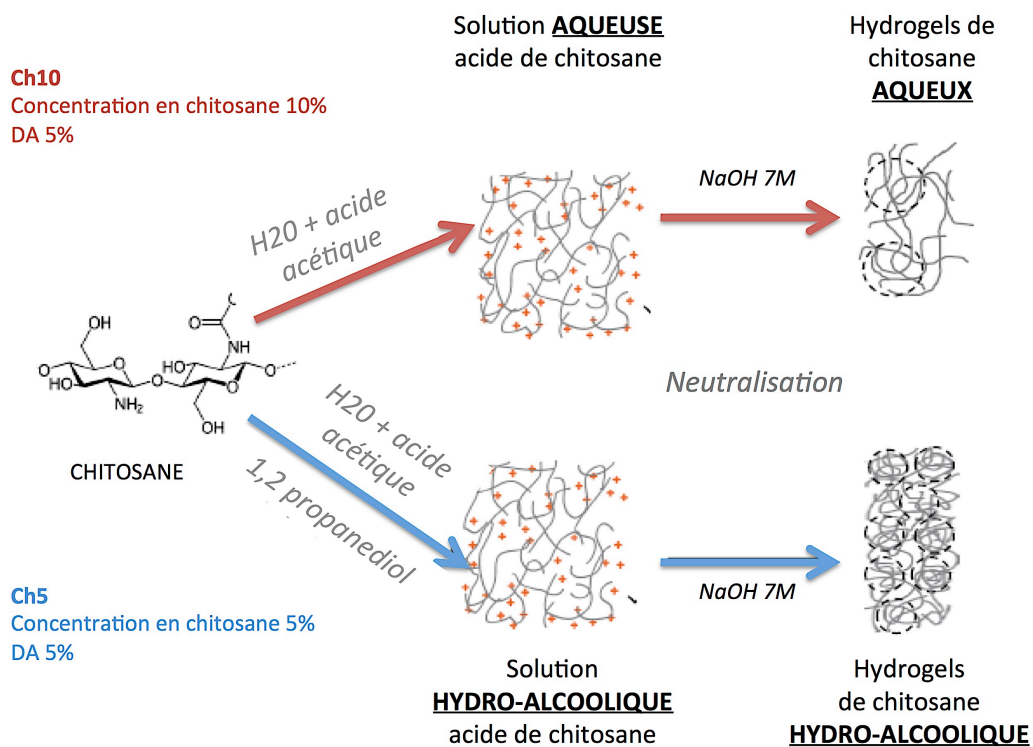


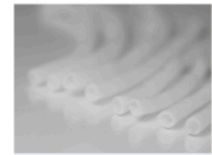
Figure 63 : Production d'hydrogels physiques de chitosane Ch5 et Ch10

L'objectif général de ce travail était d'obtenir une validation pré-clinique des hydrogels de chitosane comme matrice d'ingénierie vasculaire, en déterminant les propriétés mécaniques (**Article 1**), les propriétés biologiques (**Article 2**) et l'intégration tissulaire (interaction avec les cellules endothéliales et inflammation) (**Projet d'article 3**). Ces 3 paramètres étaient interdépendants et leur validation était fondamentale avant réalisation de pontage chez le gros animal pour de longues périodes. En parallèle de ce travail, nous voulions développer un outil pour suivre plus facilement et de façon plus fiable les cellules implantées dans le matériau (**Article 4**) (*Figure 64*).

**ELABORATION D'UN PRODUIT D'INGÉNIERIE VASCULAIRE
À BASE D'HYDROGEL DE CHITOSANE**



	Concentration	DA	Neutralisation	Gélication
Ch5	5	5	NaOH 7M	H ₂ O / Alcool
Ch10	10	5	NaOH 7M	H ₂ O



OBJECTIFS

**VALIDATION PRE-CLINIQUE D'UN PRODUIT D'INGÉNIERIE VASCULAIRE
À BASE D'HYDROGEL DE CHITOSANE**

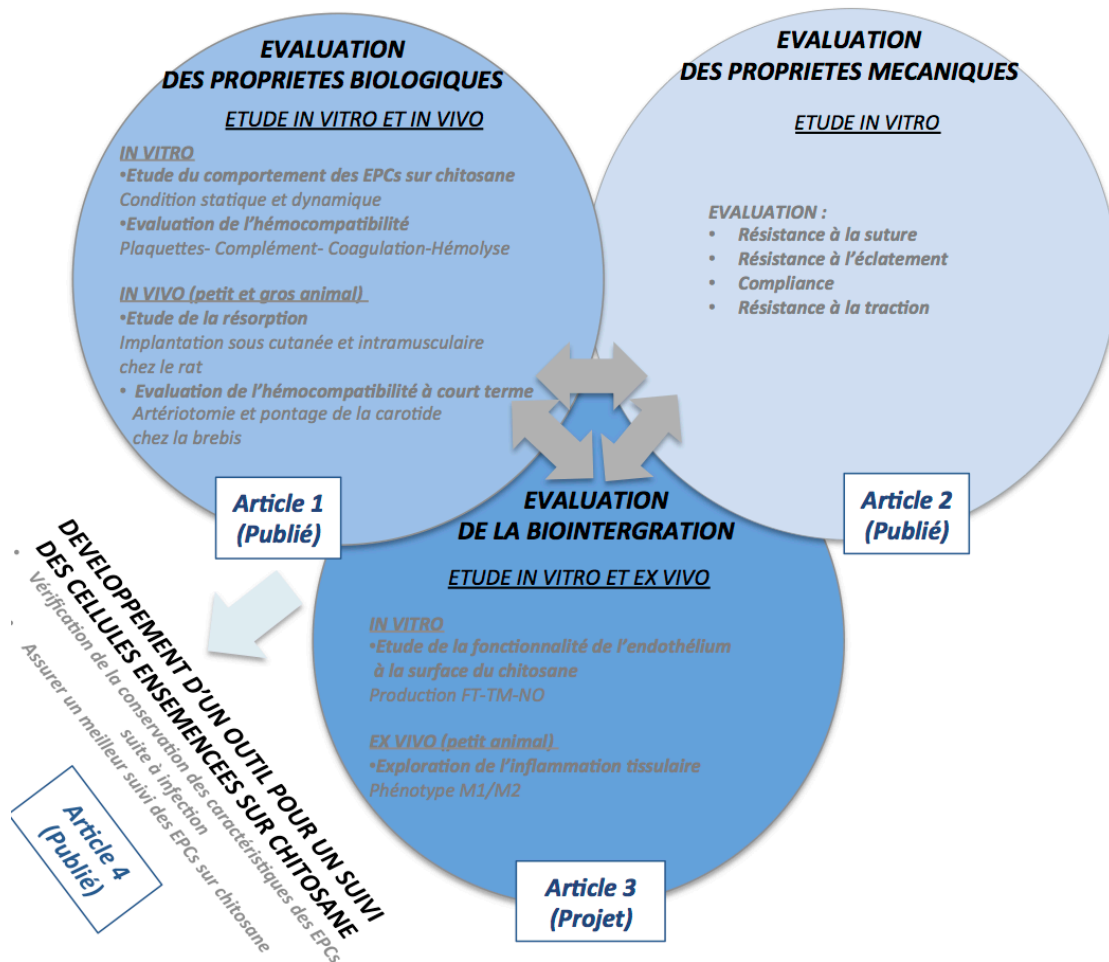


Figure 64 : Objectifs interconnectés du travail de thèse

Tout d'abord, l'évaluation des propriétés mécaniques des hydrogels de chitosane a été menée en se basant sur la norme internationale ISO 7198 : 1998, qui définit les tests mécaniques d'évaluation

OBJECTIFS

des prothèses vasculaires ainsi que les méthodes d'évaluation des propriétés mécaniques des substituts vasculaires avant leur implantation. Pour cela, des tubes d'hydrogels de chitosane, Ch5 et Ch10 ont été produits. Puis, les résistances à la suture et à l'éclatement et la compliance, caractéristiques mécaniques essentielles en clinique pour le chirurgien, ont été mesurées. Les résistances à la traction longitudinale et circonférentielle ont également été mesurées afin de pouvoir assurer une caractérisation du biomatériau. L'objectif était de s'assurer que les hydrogels produits disposaient de propriétés mécaniques suffisantes pour permettre leur implantation. L'impact de la variation des concentrations de chitosane sur les valeurs des propriétés mécaniques était également étudié.

Ensuite, l'évaluation des propriétés biologiques a été réalisée au travers de plusieurs expériences de complexité croissante, allant de l'évaluation *in vitro* de la biocompatibilité et de l'hémocompatibilité, selon la norme ISO-10993, à des études *in vivo* chez des petits et gros animaux (rat et brebis). Des EPCs ont été isolés à partir de sang de cordon ombilical puis caractérisés. Ensuite, nous avons évalué *in vitro* la biocompatibilité des hydrogels de chitosane produits en étudiant : (i) la capacité des EPCs à coloniser le matériau et (ii) l'hémocompatibilité au travers de différents tests. Pour ce faire, différents tests *in vitro* ont été réalisés : l'étude de l'activation plaquettaire, le dosage du C3a, du SC5b9 et la mesure du CH50, la mesure du temps de céphaline activée et le calcul de l'index hémolytique. Enfin, nous avons étudié *in vivo* la biocompatibilité des hydrogels de chitosane produits en réalisant des expériences chez le rat et la brebis. Nous avons étudié la capacité de résorption des matériaux produits chez le rat ainsi que leur hémocompatibilité après implantation suite à une artériotomie ou à un pontage carotidien chez la brebis.

Enfin, nous avons étudié l'interaction des hydrogels de chitosane, Ch5, *in vitro* avec les cellules endothéliales et *in vivo* avec le tissu environnant afin de s'assurer de l'intégration de ces biomatériaux. Après avoir obtenu *in vitro* une cellularisation des hydrogels de chitosane produits, nous avons étudié la fonctionnalité de cet endothélium, impératif majeur en ingénierie vasculaire. Pour ce faire, nous avons étudié la production de facteur tissulaire et de thrombomoduline, facteurs clés dans la balance hémostatique ainsi que la formation de NO, acteur fondamental dans l'homéostasie vasculaire. Nous avons également implanté des pastilles de chitosane, Ch5, en sous cutané chez le rat et étudié le profil macrophagique au contact et à distance du matériau après 10 jours, 30 jours et 60 jours afin d'étudier le profil inflammatoire du matériau.

En parallèle de ce travail, nous voulions développer un outil pour suivre plus facilement et de façon plus fiable les cellules implantées dans le matériau (**Article 4**). Nous avons choisi comme outil de suivi l'infection par le vecteur lentiviral contenant le gène de la protéine Tomato. L'objectif du travail était de s'assurer de la fiabilité de l'infection en étudiant : le taux d'infection, les caractéristiques phénotypiques des EPCs après infection ainsi que leur comportement sous flux, leur viabilité et leur capacité à cellulariser des matériaux ou leur comportement en cocultures.

RESULTATS

1 EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE

1.1 Introduction

Le pontage ou le remplacement vasculaire de petit calibre présentent actuellement des limites. Idéalement, les chirurgiens utilisent, comme substitut, des vaisseaux biologiques, ou à défaut des substituts synthétiques, tels que le Dacron ou le ePTFE. Cependant, ils sont à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques, notamment en raison de leurs propriétés mécaniques insuffisantes et de la non endothélialisation de leur surface luminale. Ainsi, l'ingénierie vasculaire a toute sa place pour produire de nouveaux substituts vasculaires, plus adaptés à leur site d'implantation. Dans ce contexte, le chitosane est proposé, compte tenu de ses propriétés biologiques intéressantes. De plus, il est déjà couramment utilisé pour de nombreuses applications médicales (immunoadjuvants, pansements, *etc.*), pouvant faciliter une éventuelle utilisation clinique. Il présente également l'avantage de pouvoir être utilisé sous différentes formes (lyophilisats, fibres et hydrogels).

Dans ce cadre, il est impératif que le substitut obtenu réponde à un cahier des charges strict. Le biomatériau utilisé doit induire une réponse appropriée de l'hôte, afin d'obtenir une intégration optimale du biomatériau. Cependant, la biocompatibilité idéale est difficile à atteindre et les substituts vasculaires tendent généralement vers un compromis cliniquement acceptable. Du fait de leur contact avec le sang, l'étude rigoureuse de l'hémocompatibilité des substituts vasculaires doit être entreprise, au travers d'études réalisés *in vitro* et *in vivo*.

L'objectif général de l'article 1 était de produire des hydrogels physiques de chitosane et d'évaluer leurs propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Tout d'abord, nous avons produits des hydrogels de chitosane sous forme planaire et tubulaire. Nous avons choisi d'utiliser des hydrogels physiques de chitosane. Ainsi, les hydrogels produits ne contenaient aucun agent de réticulation, pouvant être potentiellement toxique pour les cellules. De plus, le chitosane utilisé était hautement purifié et avec une masse molaire de 500 000 g/mol. Initialement, nous avons produit des hydrogels physiques de chitosane avec une concentration en chitosane de 5%, un DA de 5%, obtenus par voie hydroalcoolique. Nous avons également produit des hydrogels avec une concentration en chitosane de 10%, un DA de 5% et obtenus par voie aqueuse. La composition physico-chimique a été choisie suite aux résultats obtenus dans le cadre de travaux antérieurs (Rami *et al.* 2014). En effet, les conditions physicochimiques de préparation du chitosane avaient été modulées dans le but de produire des hydrogels de chitosane avec des propriétés mécaniques et biologiques adaptées à l'ingénierie vasculaire. Nous avons démontré que les hydrogels physiques fortement acétylés (DA > 20%) étaient moins rigides, se dégradèrent rapidement et ne permettaient pas une adhésion des cellules endothéliales, contrairement à des hydrogels physiques

faiblement acétylés DA (5%) qui ont été caractérisés comme des hydrogels élastiques et permettant une meilleure adhésion cellulaire. Plusieurs expériences de complexité croissante ont été menées, allant de l'évaluation *in vitro* de la biocompatibilité et plus particulièrement de l'hémocompatibilité à des études *in vivo* chez le petit (rat) et gros (mouton) animal.

Dans le cadre des études *in vitro*

- *Pour évaluer la biocompatibilité des hydrogels vis à vis des cellules endothéliales*, nous avons évalué la capacité d'EPCs (utilisé comme modèle de cellules endothéliales) à adhérer sur les hydrogels de chitosane produits, aussi bien sous forme planaire que tubulaire. Sur des hydrogels de chitosane planaire, nous avons également étudié la prolifération des EPCs et également la vitesse de recolonisation de la couche endothéliale après réalisation d'une blessure. Après avoir obtenu des hydrogels plans cellularisés, nous nous sommes également assurés de la conservation de la couche endothéliale après exposition à des contraintes de cisaillement de type artériel.

- *Pour évaluer l'hémocompatibilité des hydrogels*, différents tests normés ont été réalisés aussi bien sur des hydrogels cellularisés que non cellularisés.

Dans le cadre des études *in vivo*

-*Chez le petit animal (rat)*, des hydrogels plans non cellularisés ont été implantés jusqu'à 60 jours et des techniques d'imagerie par résonance magnétique ont été utilisées pour déterminer la résorption des hydrogels et s'assurer de l'absence d'inflammation chronique néfaste au voisinage du biomatériau implanté.

- *Chez le gros animal (brebis)*, des hydrogels non cellularisés (respectivement plans et tubulaires) ont été utilisés suite à la réalisation d'artériotomie et pour des pontages carotidiens afin de vérifier l'hémocompatibilité à court terme *in vivo* des biomatériaux produits.

**1.2 Article : Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft
- *in vitro* and *in vivo* evaluation*****Biomedical Materials******October 2017, Volume 12, Issue 6*****Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: *in vitro* and *in vivo* evaluation**

A. Aussel, N.B. Thébaud, X. Bérard, V. Brizzi, S. Delmond, R. Bareille, R. Siadous, C. James, J. Ripoche, M. Durand, A. Montembault, B. Burdin, D. Letourneur, N. L'Heureux, L. David, L. Bordenave

Abstract

Aims. Vascular grafts made of synthetic polymers perform poorly in small-diameter applications (cardiac and peripheral bypass). Chitosan is a biocompatible natural polymer that can provide a novel biological scaffold for tissue engineering development. The goal of this study was to demonstrate the biocompatibility of a novel chitosan preparation *in vitro* and *in vivo*, and to assess its potential as a scaffold for vascular applications. **Methods and Results.** A series of experiments of increasing complexity, ranging from *in vitro* biocompatibility and hemocompatibility tests to *in vivo* studies in small and large animals (rat and sheep), was performed to provide a comprehensive analysis of chitosan hydrogels' biological properties. *In vitro* studies established that: *i*) chitosan supported human endothelial progenitor cells adhesion, proliferation and resistance to physiological shear stress; *ii*) chitosan did not activate platelets, the complement system, or the intrinsic coagulation pathway. *In vivo* results showed: *iii*) no resorption of chitosan and no chronic inflammation at 60 days in a rat heterotopic implantation model (magnetic resonance imaging and histology); *iv*) no flow obstruction (Doppler ultrasound) and no thrombus formation (histology and scanning electron microscopy) at 2 hours after a carotid arteriotomy repair with chitosan patches in sheep. Finally, 2 chitosan tubes were implanted as carotid interposition grafts for 3 days in sheep showing that chitosan was strong enough to be sutured, to withstand arterial pressure, and no flow obstruction was observed through this short period. **Conclusion.** Chitosan-based hydrogels displayed promising *in vitro* biocompatibility and hemocompatibility properties as well as *in vivo* short-term performance.

Key words: chitosan, hemocompatibility, *in vitro*, *in vivo*, vascular graft development

1.3 Conclusions

En conclusion, l'article 1 tend à montrer l'intérêt du chitosane comme matrice en ingénierie vasculaire. Les résultats *in vitro* et *in vivo* démontrent la biocompatibilité des hydrogels physiques de chitosane produits dans cette étude et leur intérêt pour des applications vasculaires. Certes, dans le passé, le chitosane a souvent été critiqué, car considéré comme inflammatoire. Mais, les conditions physico-chimiques de préparation et les procédés de purification sont des éléments clés, connus pour influencer fortement la biocompatibilité des matériaux et plus particulièrement l'inflammation. Ainsi, l'utilisation d'hydrogels physiques de chitosane (sans agent de réticulation), hautement purifiés et de faible DA (5%) pourrait expliquer les résultats obtenus.

In vitro, nous avons démontré que les EPCs pouvaient adhérer, proliférer et recoloniser une blessure endothéliale à la surface des hydrogels de chitosane produits. Sous des contraintes de cisaillement physiologiques, les EPCs restaient adhérents au chitosane et conservaient leur phénotype. De plus, les hydrogels de chitosane non cellularisés n'activaient ni les plaquettes humaines, ni la voie de coagulation intrinsèque ou l'un des composants du système du complément *in vitro*. De plus, ces matériaux n'induisent pas d'hémolyse. De façon relativement surprenante, aucune différence significative n'a été observée entre les matériaux cellularisés et non cellularisés. *In vivo*, chez le rat, les hydrogels de chitosane ne présentaient aucun signe de dégradation après 60 jours d'implantation en sous cutanée ou en intramusculaire. L'implantation de pastilles de chitosane, chez la brebis, suite à la réalisation d'artériotomie a permis d'évaluer à court terme l'hémocompatibilité des hydrogels de chitosane produits. Après avoir évalué la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*, des tubes d'hydrogels physiques de chitosane ont été utilisés comme substitut vasculaire, pour la réalisation de pontage carotidien chez la brebis. Ces premiers essais, utilisés comme « preuve de concept », réalisés uniquement à court terme, ont suggéré des propriétés biologiques et mécaniques relativement satisfaisantes.

Cependant, la courte durée de l'implantation (3 jours) et le petit nombre d'animaux (n=2), nécessite la réalisation d'études à plus long terme pour évaluer la perméabilité à long terme des hydrogels de chitosane car la resténose secondaire à l'hyperplasie intimale, conditionnée par la migration, la prolifération, le changement de phénotype des CMLs et leur activité sécrétoire au sein de l'intima, survient généralement après 3 mois.

Dans la littérature, les délais d'implantation et les modèles animaux sont très variés. Récemment, Liu *et al.* ont recensé les différentes études concernant l'implantation *in vivo* chez le gros animal de substituts issus de l'ingénierie vasculaire (Liu *et al.* 2017). Ils ont distingué les études réalisées avec des matrices décellularisées et des polymères biodégradables synthétiques ou naturels. Dans le cadre des pontages carotidiens avec des matrices décellularisées, différents modèles animaux ont été utilisés, tels que le cochon, la brebis et le chien. Le délai maximum d'implantation (12 mois) a

été obtenu chez le chien, en utilisant la sous muqueuse intestinale comme matrice (Lantz *et al.* 1990). Pour les pontages carotidiens avec des matrices biodégradables synthétiques, le cochon, la brebis et le chien ont également été utilisés comme modèles animaux. Le délai maximum d'implantation (12 mois) a été obtenu chez le chien, en utilisant des matrices de PGA ou de PGA/PLA (Yokota *et al.* 2008, Dahl *et al.* 2011). Enfin, pour les pontages carotidiens avec des matrices biodégradables naturelles, seuls le cochon et la brebis ont été utilisés comme modèles d'étude. Le délai maximum d'implantation (6 mois) a été obtenu chez la brebis, en utilisant des matrices de fibrine.

Concernant les études *in vivo* chez le gros animal, il est clairement établi que le modèle idéal n'existe pas. Cependant, dans le cadre de cette étude nous avons choisi la brebis comme modèle d'étude, car elle présente de nombreux avantages. Les mécanismes de physiologie cardiovasculaire et de thrombogénicité sont relativement semblables chez la brebis et l'humain. De plus, ce modèle convient pour tester des tailles de greffe cliniquement pertinentes (diamètres 4 à 6 mm). Les études à long terme sont possibles. La brebis dispose d'un long cou facilitant le pontage et assurant un suivi plus facile, par des techniques non invasives, telles que l'imagerie par EchoDoppler. Cependant, l'inconvénient majeur reste la tendance à l'hypercoagulabilité (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

2 EVALUATION DES PROPRIETES MECANIQUES DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE

2.1 Introduction

Dans le cadre de l'élaboration d'un produit issu de l'ingénierie vasculaire, le substitut obtenu doit certes disposer de propriétés biologiques adéquates, comme décrites dans l'article 1, mais également de propriétés mécaniques suffisantes. Actuellement, aucune norme ne définit les valeurs mécaniques à atteindre pour justifier la transition des produits d'ingénierie vasculaire vers l'utilisation humaine. Néanmoins, la norme ISO 7198: 1998 donne les principes généraux des essais mécaniques appropriés pour caractériser les prothèses vasculaires.

L'objectif général de l'article 2 était de produire des hydrogels physiques de chitosane sous forme tubulaire, d'évaluer leurs propriétés mécaniques et s'assurer que ces dernières étaient compatibles avec des applications vasculaires.

Tout d'abord, nous avons produits des hydrogels de chitosane sous forme tubulaire. Suite à la réalisation de l'article 1, nous avons produit deux types d'hydrogels : Ch5 et Ch10. Ch5 correspondait à des hydrogels avec une concentration en chitosane de 5%, un DA de 5%, obtenus par voie hydroalcoolique et Ch10 à des hydrogels avec une concentration en chitosane de 10%, un DA de 5% et obtenus par voie aqueuse.

Nous avons caractérisé ces hydrogels en terme de propriétés mécaniques. En se basant sur la norme ISO 7198: 1998, nous avons choisi d'étudier les paramètres mécaniques les plus pertinents pour la clinique ainsi que des paramètres permettant de définir les propriétés mécaniques intrinsèques des matériaux. Plus précisément, nous avons déterminé la résistance à l'éclatement et la résistance à la suture, paramètres répondant aux préoccupations immédiates du chirurgien. Nous avons également étudié la compliance des hydrogels de chitosane, la non adéquation de compliance entre le vaisseau et le substitut étant connue pour être impliquée dans l'échec des substituts à long terme au site de l'anastomose. Enfin, nous avons déterminé les résistances à la traction longitudinale et circumférentielle afin de déterminer la rigidité du matériau et de s'assurer de l'anisotropie des hydrogels. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux fournis par une revue récente de la littérature, qu'il s'agisse de substituts naturels ou synthétiques (Pashneh-Tala *et al.* 2015).

2.2 Article : *In Vitro* Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development

Journal of Cardiovascular Translational Research

December 2017, Volume 10, Issue 5–6, pp 480–488

***In Vitro* Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development**

A. Aussel*, A. Montebault*, S. Malaise, M.P. Foulc, W. Faure, R. Aid, M. Chaouat, T. Delair, D. Letourneur, L. David, L. Bordenave

*** Equally co-first authors**

Abstract

Vascular grafts made of synthetic polymers perform poorly in cardiac and peripheral bypass applications. In these applications, chitosan-based materials can be produced and shaped to provide a novel scaffold for vascular tissue engineering. The goal of this study was to evaluate *in vitro* the mechanical properties of a novel chitosan formulation to assess its potential for this scaffold. Two chitosan-based hydrogel tubes were produced by modulating chitosan concentration. Based on the standard ISO 7198:1998, the hydrogels tubes were characterized *in vitro* in terms of suture retention strength, tensile strength, compliance and burst pressure. By increasing chitosan concentration, suture retention value increased to reach 1.1 N, average burst strength and elastic moduli also increased significantly. The compliance seemed to exhibit a low value for chitosan tubes of high concentration. By modulating chitosan concentration, we produced scaffolds with suitable mechanical properties to be implanted *in vivo* and withstand physiological blood pressures.

Key words: chitosan, hydrogels, mechanical properties, *in vitro*, vascular graft development

2.3 Conclusion

En conclusion, l'article 2 tend à démontrer que les hydrogels physiques de chitosane produits disposent de propriétés mécaniques relativement appropriées pour des applications comme le pontage de vaisseaux de petit calibre. Certes, les hydrogels physiques de polysaccharides présentent généralement de faibles propriétés mécaniques et sont d'ailleurs souvent utilisés en association avec d'autres polymères pour améliorer les insuffisances mécaniques. Cependant, comme les propriétés biologiques, les propriétés mécaniques des hydrogels de chitosane sont étroitement liés à leurs conditions physico-chimiques.

Les premiers paramètres étudiés étaient la résistance à la suture et à l'éclatement, paramètres clés pour le chirurgien. En effet, l'obtention de valeurs suffisamment grandes était un pré-requis pour l'implantation des hydrogels de chitosane, dans le cadre de pontages vasculaires. Nous avons démontré qu'en modulant la concentration en chitosane, plus exactement en l'augmentant en passant de 5% à 10%, la résistance à la suturabilité et à l'éclatement augmentaient significativement. Les valeurs obtenues étaient inférieures à celles obtenus avec des greffes veineuses ou artérielles. Néanmoins, ces valeurs étaient compatibles avec une implantation *in vivo*, premier pré-requis indispensable pour le chirurgien et les sutures réalisées résistaient au passage du flux sanguin, comme démontré *in vivo* dans l'article 1 (pontage carotidien chez la brebis). Dans le cadre des paramètres ayant une importance fondamentale pour l'utilisation clinique, nous avons également mesuré la compliance des différents hydrogels produits. Contrairement aux deux paramètres précédents, l'augmentation de la concentration en chitosane diminuait la compliance. Cependant, les valeurs obtenues restaient supérieures à celles des substituts vasculaires synthétiques utilisés actuellement en clinique (ePTFE). Enfin, l'étude des paramètres intrinsèques tels que la résistance longitudinale a montré un caractère viscoélastique des hydrogels physiques de chitosane produits. De plus, l'étude de la traction circonférentielle a mis en évidence une différence significative entre la courbe de traction dans la direction axiale (longitudinale) et celle dans la direction circonférentielle, relevant une anisotropie des hydrogels produits.

Même si les résultats obtenus étaient relativement satisfaisants, d'autres expérimentations seront nécessaires, notamment pour évaluer les propriétés mécaniques après implantation au long court, afin d'évaluer l'impact du remodelage et plus particulièrement sur la compliance. Récemment, Koobatian *et al.* ont proposé d'évaluer, en temps réel, la compliance de substituts vasculaires après implantation chez le gros animal, grâce à l'utilisation de technique non invasive via la sonomicrométrie. Les transducteurs fabriqués à partir de matériau céramique piézo-électrique transmettent et reçoivent de l'énergie sonore, permettant la mesure des distances (Koobatian *et al.* 2015, Koobatian *et al.* 2016).

3 ETUDE DE LA BIOINTEGRATION DES HYDROGELS PHYSIQUES DE CHITOSANE POUR DES APPLICATIONS VASCULAIRES : INTERFACE CHITOSANE/ CELLULES VASCULAIRES / TISSU HÔTE

3.1 *Projet d'article: Cell and tissue response at the interface with chitosan hydrogel in vitro and ex vivo*

Cell and tissue response at the interface with chitosan hydrogels: *in vitro* and *ex vivo* exploration

A. Aussel^{1,2}, C. Boiziau¹, B. L'Azou¹, R. Bareille¹, L. Fievet¹, R. Siadous¹, S. Delmond³, M. Durand³,
A. Montembault⁴, L. David⁴, N.B Thébaud^{1,2*}, L. Bordenave^{1,3*}

***Equally co-last authors**

¹Univ. Bordeaux, INSERM U1026, Bioingénierie tissulaire, F-33000 Bordeaux, France ²CHU de Bordeaux, Pôle Odontologie et Santé Buccale, F-33000 Bordeaux, France ³CHU de Bordeaux, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France ⁴Univ. Lyon, CNRS, Ingénierie des Matériaux Polymères, IMP-UMR 5223, Villeurbanne Cedex, F-69622, France

4 MISE AU POINT D'UNE METHODE DE SUIVI DES EPCS EN INGENIERIE VASCULAIRE

4.1 Introduction

Parallèlement au projet principal de cette thèse, qui consistait à développer des hydrogels de chitosane pour l'ingénierie vasculaire et à les valider pré-cliniquement, nous avons voulu développer un outil, afin d'assurer un suivi plus facile des EPCs, au cours des différentes expérimentations réalisées dans cette thèse. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, pour assurer un suivi des cellules en ingénierie vasculaire: l'imagerie X (le scanner), l'imagerie nucléaire, l'imagerie magnétique et l'imagerie optique (par fluorescence ou bioluminescence). La technique d'imagerie idéale devrait être une non iatrogène, non toxique et non invasive dans le temps, ne pas engendrer de modification génétique ou de perturbation des cellules souches, permettre une détection cellulaire pour toute localisation anatomique, assurer le comptage cellulaire, ne pas présenter de dilution du signal au moment de la division cellulaire et enfin, assurer une mise en œuvre simple. Certes la technique idéale n'existe pas. Cependant, nous avons choisi d'utiliser de gènes rapporteurs pour permettre un suivi plus aisé des EPCs grâce à l'utilisation de la fluorescence émise par les EPCs infectés. Plus précisément, nous avons utilisé un gène rapporteur codant la protéine fluorescente Td Tomato. La protéine Td Tomato présentait plusieurs avantages : une structure équivalente à un monomère (compatible avec les fusions de protéines en N- et C-terminal), une autofluorescence réduite (maximum d'émission à 581 nm dans le rouge lointain et détection à 620 nm), une détection en profondeur des tissus sans atténuation du signal, une excellente photostabilité, une vitesse de maturation rapide.

L'utilisation d'EPCs infectés, semblait un outil particulièrement intéressant, car il permettait une réelle économie de matériau et également de cellules. En effet, l'infection des EPCs pouvait assurer un suivi de la viabilité cellulaire des EPCs au contact des hydrogels de chitosane au long court, sans avoir à sacrifier l'échantillon pour réaliser des marquages spécifiques, tels qu'un marquage à la calcéine pour visualiser les cellules vivantes ou l'éthidium pour observer les cellules mortes.

L'objectif de l'article 4 était de vérifier la conservation de caractéristiques des EPCs suite à leur infection par le gène rapporteur codant la protéine Td Tomato, afin de pouvoir utiliser les EPCs infectés de façon fiable. Ainsi, après avoir isolé des EPCs, ces derniers ont été infectés à l'aide du vecteur lentiviral pRRLsin-PGK-Tomato-WPRE contenant le gène codant la protéine Td Tomato. Nous avons alors étudié l'impact de l'infection sur de nombreux critères, tels que la morphologie des EPCs, leur phénotype et génotype cellulaire, leur comportement sous contraintes de cisaillement, la viabilité cellulaire. Nous nous sommes également assurés que les EPCs conservaient leur capacité à endothélialiser des prothèses vasculaires.

4.2 Article : Labeling and qualification of endothelial progenitor cells for tracking in tissue engineering: An *in vitro* study.

The International journal of artificial organs

April 2015, Volume 38, Issue 4, pp 224-232

Labeling and qualification of endothelial progenitor cells for tracking in tissue engineering: An *in vitro* study.

NB. Thébaud, A. Aussel, R. Siadous, J. Toutain, R. Bareille, A. Montembault, L. David, L. Bordenave

Abstract

Purpose: In order to track location and distribution of endothelial cells (ECs) within scaffolds *in vitro*, we chose lentiPGK-TdTomato transduction of human Endothelial Progenitor Cells (EPCs) isolated and differentiated from cord blood. Because transduction could have a functional impact on cell behaviour, we checked different parameters for qualification of labeled-EPCs as well as their use for potential applications in the context of vascular and bone tissue engineering. **Methods:** after isolation and expansion, EPCs were classically characterized then transduced with the lentiviral vector containing the TdTomato protein gene under the control of the Phosphoglycerate kinase (PGK) promoter. Conventional karyotyping, differentiation capacity, viability, proliferation assays were performed with labeled and unlabeled EPCs. Scaffolds and co-cultures were explored with labeled EPCs, in static or shear stress conditions. **Results** show that cell labeling did not affect cell adhesion nor induce cell death. Cell labeling did not induce more chromosomal aberrations. Phenotypical characterization was not affected. In the context of tissue engineering applications, labeled EPCs maintained their ability to line 2D or 3D scaffolds, withstand physiological arterial shear stress and form tubular networks in co-cultures with human osteoblast progenitor cells. **Conclusion:** it is possible to label human EPCs with TdTomato without affecting their behaviour by the transduction procedure. This creates an important tool for numerous applications. Our results provide a qualification of labeled EPCs in comparison with unlabeled ones for vascular and bone tissue engineering.

Key words : Endothelial progenitor cells, labeled cells, lentiviral transduction, cell tracking, tissue engineering

4.3 Conclusion

En conclusion, l'article 4 tend à démontrer que l'infection ne modifie pas les caractéristiques principales des EPCs.

En effet, suite à l'infection, les EPCs conservaient leur aspect morphologique (pavimenteux), leur phénotype (vWF+, CD 31+, VE-Cad+), leur comportement sous contraintes de cisaillement de type artériel (alignement des EPCs dans le sens du flux). De plus, l'apparition d'éventuelles anomalies chromosomiques n'était pas liée à l'infection. Enfin, suite à l'infection, les EPCs conservaient leur potentiel angiogénique et leur capacité à endothélialiser des vaisseaux. Ces deux critères étaient fondamentaux, car la finalité de l'infection était de pouvoir suivre plus facilement le devenir des EPCs dans le cadre de l'ingénierie vasculaire. L'infection des EPCs semblait être une technique particulièrement intéressante, car le pourcentage d'infection obtenu a été relativement élevé (86%) et peu de dilution du signal du signal a été observé au cours du temps.

Ainsi, nous avons pu utiliser de façon fiable des EPCs infectés, pour déterminer *in vitro* les conditions optimales d'ensemencement cellulaire sur des hydrogels de chitosane (*Figure 65*), sous forme planaire (*Figure 66A*) ou tubulaire (*Figure 66B*). L'utilisation d'EPCs infectés a permis un gain de temps important, en évitant certains protocoles de révélation et a également engendré une économie de matières premières en terme de cellules et de matrices.

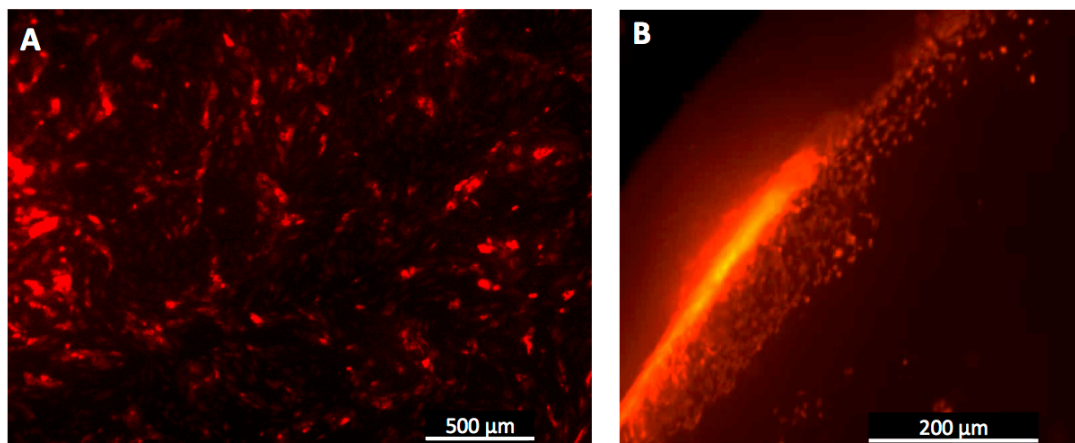


Figure 65 : Hydrogels physiques de chitosane sous forme planaire (A) et tubulaire (B) cellularisés 3 jours après ensemencement d'EPCs infectés

L'utilisation d'EPCs infectés pourrait avoir également un intérêt, dans le suivi des EPCs implanté *in vivo*, car la protéine Td Tomato présente l'avantage d'avoir peu de dilution du signal en profondeur des tissus. Cependant, nous n'avons encore mené aucune étude dans ce contexte.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, dans le cadre de ce travail, nous avons développé des hydrogels physiques de chitosane, pour l'ingénierie vasculaire, avec 2 formulations et différents modes de mise en œuvre (tubes et plans). Nous en avons réalisé la validation pré-clinique pour des applications vasculaires en analysant : leurs propriétés biologiques, leurs propriétés mécaniques et leur biointégration. Les principaux résultats sont recensés sur la *Figure 67*.

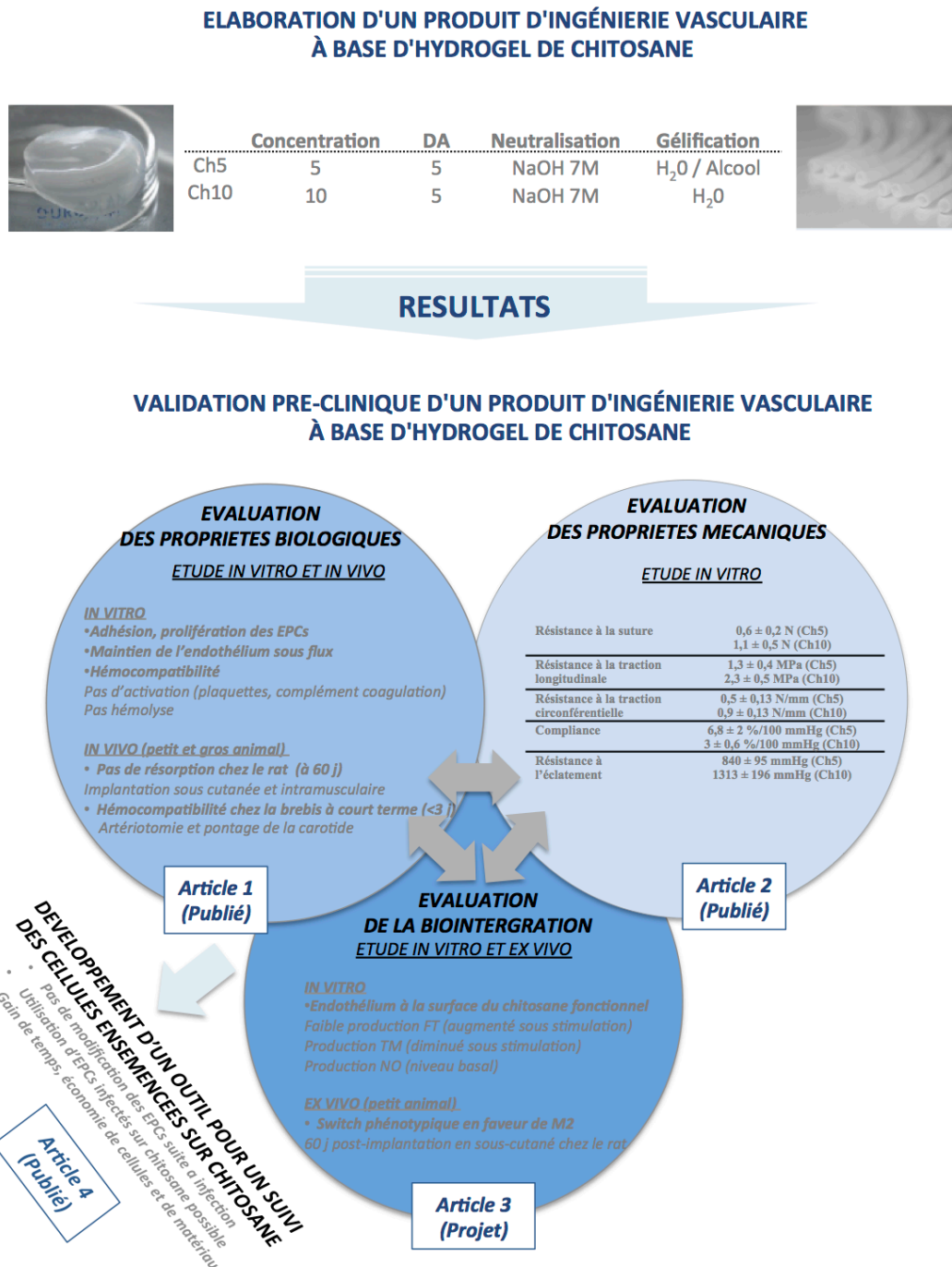


Figure 66 : Résultats interconnectés du travail de thèse

En synthétisant ces résultats, nous pouvons conclure que les hydrogels de chitosane produits et testés sont des matrices de choix pour l'ingénierie vasculaire, de par leurs propriétés biologiques, mécaniques et leur capacité de biointégration. Le faible DA, la purification, la neutralité de la charge de surface sont des critères qui peuvent expliquer les propriétés des hydrogels produits. La porosité des hydrogels pourrait également être un élément important pour expliquer leur comportement biologique. Cependant, il n'est actuellement pas possible de la déterminer de façon précise.

Concernant les perspectives de cette thèse, il est fondamental d'étudier l'hémocompatibilité des substituts produits à long terme chez le gros animal. En effet, la courte durée de l'implantation (3 jours) et le petit nombre d'animaux ($n=2$), nécessite la réalisation d'études à plus long terme pour évaluer la perméabilité à long terme des hydrogels de chitosane et cela d'autant plus que la resténose secondaire à l'hyperplasie intimale survient généralement après 3 mois post-opératoires. Ce projet est soutenu par la Fondation de l'Avenir et ce travail se décomposera en 5 tâches : la synthèse de tubes d'hydrogels physiques de chitosane, l'implantation animale (3 mois et 6 mois), les analyses histologiques et immunohistologiques après explantation, les analyses microscopiques après explantation et l'analyses des organes. La synthèse de tubes d'hydrogels physiques de chitosane sera basée sur notre connaissance acquise de la préparation de matériaux en chitosane, consistera à préparer des tubes de chitosane selon la formulation choisie, Ch10%. Pour l'implantation animale, l'acte chirurgical effectué sera un pontage au niveau de la carotide du mouton. Pour vérifier la perméabilité de la carotide, des examens d'imagerie d'échoDoppler seront réalisés à 2 jours, 7 jours, 28 jours et 60 jours. Des bilans sanguins (Numération Formule Sanguine, bilans de coagulation, activation plaquettaire, etc.) seront également pratiqués au mêmes temps. Les animaux seront sacrifiés à 3 mois ($n=3$) ou 6 mois ($n=3$). Les analyses histologiques et immunohistologiques seront réalisées après sacrifice des animaux. Nous effectuerons différentes colorations (HES, trichrome de Masson) et des réactions d'immunohistochimie pour identifier la présence de cellules en prolifération (Ki67), de cellules endothéliales (CD31), de fibroblastes (vimentine), de macrophages (CD68, phénotype M1 et/ou M2) et de matrice extra-cellulaire (laminine, collagènes de type I, III ou IV, glycosaminoglycanes). Nous serons également attentifs à l'épaisseur de la couche fibreuse externe (rapport fibreuse/matériau), à l'apparition de néovaisseaux dans l'épaisseur du matériau (marqueurs de la biointégration) et d'autre part à la conservation de la lumière du vaisseau au niveau de la face luminale. Des analyses microscopiques seront également réalisées pour observer les différents éléments figurés du sang, l'absence ou présence d'une adhésion plaquettaire et l'épaisseur de fibrine éventuelle, au niveau de la surface luminale des tubes. Enfin, certains organes seront prélevés, tels que le cœur, le poumon, les reins et le cerveau afin d'évaluer l'éventuelle toxicité systémique des hydrogels de chitosane ou des produits de dégradation.

Lors d'expériences complémentaires, nous pourrions également implanter des hydrogels de chitosane cellularisés et plus particulièrement en utilisant des cellules de grade clinique. Tout d'abord,

nous avons démontré qu'il était possible de cellulariser *in vitro* des tubes de chitosane avec des EPCs ou des EPCs infectés (TdTomato). Nous avons également produit des cellules endothéliales issues d'EPCs (infectés ou non) de grade clinique. Ces cellules répondaient aux normes de bonnes pratiques de production (ou "GMP" pour Good Manufacturing Practices) et de conservation, condition *sine qua non* pour que ces cellules soient agréées par les autorités de santé et que des essais cliniques puissent être menés chez l'Homme. La difficulté était de mettre au point un milieu de culture, inoffensif pour l'Homme et permettant d'orienter la différenciation cellulaire avec une garantie de stabilité après l'implantation. Nous pourrions ainsi évaluer l'impact de l'endothélialisation sur l'hémocompatibilité à long terme des hydrogels de chitosane. De plus, en utilisant des EPCs infectés, nous pourrions suivre le devenir de ces cellules. Hypothétiquement, elles pourraient être résistantes au flux et rester adhérentes au matériau ou être détruites mais en favorisant le recrutement local de cellules endothéliales ou de progéniteurs endothéliaux circulants, notamment par la libération de VEGF.

Au terme de ces études complémentaires, nous disposerons d'un ensemble de données complémentaires permettant la validation pré-clinique des hydrogels de chitosane pour l'ingénierie vasculaire.

**COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUES**

1 COMMUNICATIONS ORALES

1.1 Communications orales internationales

- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application: *in vitro* and *in vivo* hemocompatibility evaluation** Aussel A, Bérard X, Cornet S, Brizzi V, Durand M, Montembault A, David L, Aid R, Letourneur D, Bordenave L
European Society on Biomaterials (ESB) - Cracovie, Août 2015

1.2 Communications orales nationales

- 2015 **Caractérisation de progéniteurs endothéliaux en vue de leur suivi en ingénierie vasculaire** Aussel A, Thébaud NB, Siadous R, Toutain J, Bareille R, Montembault A, David L, Bordenave L
Recherche en Imagerie et Technologies pour la Santé - Dourdan, Mars 2015
- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application** Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L
Lauréate
Forum des jeunes chercheurs en odontologie - Lille, Septembre 2015
- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application: cyto- and hemocompatibility evaluation** Aussel A, Berard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Aid R, Letourneur D, Bordenave L
BIOMAT – Ile d’oléron, Octobre 2015
- 2016 **Chitosan based hydrogels for vascular applications** Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L
Association Dentaire Française - Paris, Novembre 2016

2 COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

2.1 Communications par affiche internationales

- 2014 **Characterization of labelled progenitor derived endothelial cell for tissue engineering application** Aussel A, Bareille R, Siadous R, Bordenave L, Thébaud NB
Association Dental American - San Antonio, Octobre 2014
- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application** Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L
TERMIS - Boston, Septembre 2015

- 2016 **Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Siadous R, Bareille R, Brizzi V, Montembault A, Aid R, Letourneur D, David L, Bordenave L. Elaboration of a cellularizable chitosan based hydrogel and pre-requisites for implantation**
World Biomaterials Congress - Montréal, Mai 2016

2.2 Communications par affiche nationales

- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L**
Journée scientifique de l'école doctorale - Bordeaux, Avril 2015
- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L**
Prix
Poster *FR TecSan - Bordeaux, Juin 2015*
- 2015 **Chitosan based hydrogels for vascular application Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Bordenave L**
Prix
Poster *Congrès de la Société Francophone de Biomatériaux Dentaires - Paris, Juillet 2015*
- 2016 **Elaboration of a cellularizable chitosan based hydrogel and pre-requisites for implantation Aussel A, Bérard X, Thébaud NB, Siadous R, Bareille R, Brizzi V, Montembault A, Aid R, Letourneur D, David L Bordenave L**
Journée scientifique de l'école doctorale - Bordeaux, Avril 2016
- 2016 **Elaboration hydrogels physiques de chitosane cellularisables et pré-requis pour l'implantation Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Bareille R, Siadous R, Brizzi V, Montembault A, David L, Aid R, Letourneur D, L'Heureux N, Bordenave L.**
Prix
Poster *1^{ères} Journées des Sciences Odontologiques - Bordeaux, Juin 2016*

BIBLIOGRAPHIE

Achneck, H. E., R. M. Jamiolkowski, A. E. Jantzen, J. M. Haseltine, W. O. Lane, J. K. Huang, L. J. Galinat, M. J. Serpe, F. H. Lin, M. Li, A. Parikh, L. Ma, T. Chen, B. Sileshi, C. A. Milano, C. S. Wallace, T. V. Stabler, J. D. Allen, G. A. Truskey and J. H. Lawson (2011). "The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells: EPC-seeded antithrombotic Ti implants." Biomaterials **32**(1): 10-18.

Adipurnama, I., M. C. Yang, T. Ciach and B. Butruk-Raszeja (2016). "Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review." Biomater Sci **5**(1): 22-37.

Ahsan, S. M., M. Thomas, K. K. Reddy, S. G. Sooraparaju, A. Asthana and I. Bhatnagar (2017). "Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering." International Journal of Biological Macromolecules.

Aicher, A., A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Mobilizing endothelial progenitor cells." Hypertension **45**(3): 321-325.

Aldenhoff, Y. B. and L. H. Koole (2003). "Platelet adhesion studies on dipyridamole coated polyurethane surfaces." Eur Cell Mater **5**: 61-67; discussion 67.

Alexandre, N., E. Costa, S. Coimbra, A. Silva, A. Lopes, M. Rodrigues, M. Santos, A. C. Mauricio, J. D. Santos and A. L. Luis (2015). "In vitro and in vivo evaluation of blood coagulation activation of polyvinyl alcohol hydrogel plus dextran-based vascular grafts." J Biomed Mater Res A **103**(4): 1366-1379.

Ammollo, C. T., F. Semeraro, J. Xu, N. L. Esmon and C. T. Esmon (2011). "Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation." J Thromb Haemost **9**(9): 1795-1803.

Anderson, J. M. and A. K. McNally (2011). "Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions." Semin Immunopathol **33**(3): 221-233.

Anderson, J. M., A. Rodriguez and D. T. Chang (2008). "Foreign body reaction to biomaterials." Semin Immunol **20**(2): 86-100.

Aper, T., A. Schmidt, M. Duchrow and H. P. Bruch (2007). "Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample." Eur J Vasc Endovasc Surg **33**(1): 33-39.

Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzensbichler, G. Schatteman and J. M. Isner (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.

Athanasiou, T., S. Saso, C. Rao, J. Vecht, J. Grapsa, J. Dunning, M. Lemma and R. Casula (2011). "Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty years of competition--which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis." Eur J Cardiothorac Surg **40**(1): 208-220.

Atluri, P. and Y. J. Woo (2008). "Pro-angiogenic cytokines as cardiovascular therapeutics: assessing the potential." BioDrugs **22**(4): 209-222.

Avci-Adali, M., G. Ziemer and H. P. Wendel (2010). "Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization--a review of current strategies." Biotechnol Adv **28**(1): 119-129.

Azevedo, E. P., R. Retarekar, M. L. Raghavan and V. Kumar (2013). "Mechanical properties of cellulose: chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **24**(3): 239-252.

- Badylak, S. F., J. E. Valentin, A. K. Ravindra, G. P. McCabe and A. M. Stewart-Akers (2008). "Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling." Tissue Eng Part A **14**(11): 1835-1842.
- Bajpai, V. K. and S. T. Andreadis (2012). "Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration." Tissue Eng. Part B Rev. **18**: 405-425.
- Baldrick, P. (2010). "The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient." Regulatory Toxicology and Pharmacology **56**(3): 290-299.
- Barbosa, J. N., I. F. Amaral, A. P. Aguas and M. A. Barbosa (2010). "Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds." J Biomed Mater Res A **93**(1): 20-28.
- Barbosa, J. N., P. Madureira, M. A. Barbosa and A. P. Aguas (2006). "The influence of functional groups of self-assembled monolayers on fibrous capsule formation and cell recruitment." J Biomed Mater Res A **76**(4): 737-743.
- Bellis, S. L. (2011). "Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials." Biomaterials **32**(18): 4205-4210.
- Berglund, J. D., R. M. Nerem and A. Sambanis (2005). "Viscoelastic Testing Methodologies for Tissue Engineered Blood Vessels." Journal of Biomechanical Engineering **127**(7): 1176-1184.
- Berton, G. and C. A. Lowell (1999). "Integrin signalling in neutrophils and macrophages." Cell Signal **11**(9): 621-635.
- Birchall, M. and G. Hamilton (2012). "Tissue-engineered vascular replacements for children." Lancet **380**: 197-198.
- Blakney, A. K., M. D. Swartzlander and S. J. Bryant (2012). "The effects of substrate stiffness on the in vitro activation of macrophages and in vivo host response to poly(ethylene glycol)-based hydrogels." J Biomed Mater Res A **100**(6): 1375-1386.
- Boucard, N., C. Viton and A. Domard (2005). "New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium." Biomacromolecules **6**(6): 3227-3237.
- Boudot, C., A. Boccoz, K. Duregger and A. Kuhnla (2016). "A novel blood incubation system for the in-vitro assessment of interactions between platelets and biomaterial surfaces under dynamic flow conditions: The Hemocoater." J Biomed Mater Res A **104**(10): 2430-2440.
- Brockman, K. S., J. N. Kizhakkedathu and J. P. Santerre (2017). "Hemocompatibility studies on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane (D-PHI)." Acta Biomater **48**: 368-377.
- Brodbeck, W. G., J. Patel, G. Voskerician, E. Christenson, M. S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N. P. Ziats and J. M. Anderson (2002). "Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10287-10292.
- Brown, M. E., E. Rondon, D. Rajesh, A. Mack, R. Lewis, X. Feng, L. J. Zitur, R. D. Learish and E. F. Nuwaysir (2010). "Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes." PLoS One **5**(6): e11373.
- Bryers, J. D., C. M. Giachelli and B. D. Ratner (2012). "Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts." Biotechnol Bioeng **109**(8): 1898-1911.
- Butenas, S., B. A. Bouchard, K. E. Brummel-Ziedins, B. Parhami-Seren and K. G. Mann (2005). "Tissue factor activity in whole blood." Blood **105**(7): 2764-2770.

Buttafoco, L., P. Engbers-Buijtenhuijs, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, I. Vermes and J. Feijen (2006). "Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor." Biomaterials **27**(11): 2380-2389.

Cao, H., K. McHugh, S. Y. Chew and J. M. Anderson (2010). "The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction." J Biomed Mater Res A **93**(3): 1151-1159.

Caracciolo, P. C., M. I. Rial-Hermida, F. Montini-Ballarín, G. A. Abraham, A. Concheiro and C. Alvarez-Lorenzo (2017). "Surface-modified bioresorbable electrospun scaffolds for improving hemocompatibility of vascular grafts." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **75**: 1115-1127.

Catto, V., Far, xe, Silvia, G. Freddi and M. C. Tanzi (2014). "Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration." ISRN Vascular Medicine **2014**: 27.

Chakfe, N., F. Dieval, F. Thaveau, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand and J. G. Kretz (2004). "[Vascular graft prosthesis]." Ann Chir **129**(5): 301-309.

Chandler, A. B. (1958). "In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus." Lab Invest **7**(2): 110-114.

Chaouat, M., C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet and D. Letourneur (2006). "The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats." Biomaterials **27**(32): 5546-5553.

Chen, J. H., R. F. Laiw, S. F. Jiang and Y. D. Lee (1999). "Microporous segmented polyetherurethane vascular graft: I. Dependency of graft morphology and mechanical properties on compositions and fabrication conditions." J Biomed Mater Res **48**(3): 235-245.

Chen, X. G., L. Zheng, Z. Wang, C. Y. Lee and H. J. Park (2002). "Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes." J Agric Food Chem **50**(21): 5915-5918.

Chenite, A., C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette and A. Selmani (2000). "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ." Biomaterials **21**(21): 2155-2161.

Chlupac, J., E. Filova and L. Bacakova (2009). "Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery." Physiol Res **58 Suppl 2**: S119-139.

Cito, S., M. D. Mazzeo and L. Badimon (2013). "A review of macroscopic thrombus modeling methods." Thromb Res **131**(2): 116-124.

Couet, F., N. Rajan and D. Mantovani (2007). "Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering." Macromol Biosci **7**(5): 701-718.

Crapo, P. M., T. W. Gilbert and S. F. Badylak (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials **32**(12): 3233-3243.

Croisier, F. and C. Jérôme (2013). "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering." European Polymer Journal **49**(4): 780-792.

Cui, D., H. Li, M. Wan, Y. Peng, X. Xu, X. Zhou and L. Zheng (2017). "The Origin and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Teeth: from Odontogenic to Non-odontogenic." Curr Stem Cell Res Ther.

- Cui, X., X. Zhang, X. Guan, H. Li, X. Li, H. Lu and M. Cheng (2012). "Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins." Biochem Biophys Res Commun **425**(2): 419-425.
- Dahl, S. L., A. P. Kypson, J. H. Lawson, J. L. Blum, J. T. Strader, Y. Li, R. J. Manson, W. E. Tente, L. DiBernardo, M. T. Hensley, R. Carter, T. P. Williams, H. L. Prichard, M. S. Dey, K. G. Begelman and L. E. Niklason (2011). "Readily available tissue-engineered vascular grafts." Sci Transl Med **3**(68): 68ra69.
- Dai, T., Y. Hu and H. Zheng (2017). "Hypoxia increases expression of CXC chemokine receptor 4 via activation of PI3K/Akt leading to enhanced migration of endothelial progenitor cells." Eur Rev Med Pharmacol Sci **21**(8): 1820-1827.
- DangLi, R., W. HeKong, L. JiQin, Z. MingHua and Z. WenCheng (2012). "ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H₂O₂/NF-kappaB signaling pathway in vascular endothelial inflammation." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 183-191.
- de Mel, A., G. Jell, M. M. Stevens and A. M. Seifalian (2008). "Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review." Biomacromolecules **9**(11): 2969-2979.
- de Oliveira, H. C., J. L. Fonseca and M. R. Pereira (2008). "Chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes: preparation, characterization and permeability studies." J Biomater Sci Polym Ed **19**(2): 143-160.
- de Torre, I. G., F. Wolf, M. Santos, L. Rongen, M. Alonso, S. Jockenhoevel, J. C. Rodriguez-Cabello and P. Mela (2015). "Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases." Acta Biomater **12**: 146-155.
- Dernbach, E., C. Urbich, R. P. Brandes, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004). "Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood **104**(12): 3591-3597.
- Devlieghere, F., K. Francois, K. M. Vereecken, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe and J. Debevere (2004). "Effect of chemicals on the microbial evolution in foods." J Food Prot **67**(9): 1977-1990.
- Dey, J., H. Xu, K. T. Nguyen and J. Yang (2010). "Crosslinked urethane doped polyester biphasic scaffolds: Potential for in vivo vascular tissue engineering." J Biomed Mater Res A **95**(2): 361-370.
- Dieval, F., N. Chakfe, S. C. Bizonne, J. F. Le Magnen, M. Beaufigeau, D. Mathieu, G. Riepe, J. G. Kretz and B. Durand (2001). "Les tests mécaniques d'évaluation des prothèses vasculaires." ITBM-RBM **22**(2): 70-87.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Dordoni, E., A. Meoli, W. Wu, G. Dubini, F. Migliavacca, G. Pennati and L. Petrini (2014). "Fatigue behaviour of Nitinol peripheral stents: the role of plaque shape studied with computational structural analyses." Med Eng Phys **36**(7): 842-849.
- Dubey, G. and K. Mequanint (2011). "Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications." Acta Biomater **7**(3): 1114-1125.

- Ercolani, E., C. Del Gaudio and A. Bianco (2015). "Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach." J Tissue Eng Regen Med **9**(8): 861-888.
- Eriksson, C. and H. Nygren (2001). "Polymorphonuclear leukocytes in coagulating whole blood recognize hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces by different adhesion receptors and show different patterns of receptor expression." J Lab Clin Med **137**(4): 296-302.
- Fai, A. E., T. C. Stamford, T. M. Stamford-Arnaud, P. D. Santa-Cruz, M. C. da Silva, G. M. Campos-Takaki and T. L. Stamford (2011). "Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate." Molecules **16**(8): 7143-7154.
- Farkas, I., L. Baranyi, Y. Ishikawa, N. Okada, C. Bohata, D. Budai, A. Fukuda, M. Imai and H. Okada (2002). "CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9." J Physiol **539**(Pt 2): 537-545.
- Fent, J., P. Bihari, M. Vippola, E. Sarlin and S. Lakatos (2015). "In vitro platelet activation, aggregation and platelet-granulocyte complex formation induced by surface modified single-walled carbon nanotubes." Toxicol In Vitro **29**(5): 1132-1139.
- Ferrante, C. J., G. Pinhal-Enfield, G. Elson, B. N. Cronstein, G. Hasko, S. Outram and S. J. Leibovich (2013). "The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling." Inflammation **36**(4): 921-931.
- Ferreira, V. P., M. K. Pangburn and C. Cortes (2010). "Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate." Mol Immunol **47**(13): 2187-2197.
- Fisher, S. A., H. Zhang, C. Doree, A. Mathur and E. Martin-Rendon (2015). "Stem cell treatment for acute myocardial infarction." Cochrane Database Syst Rev(9): CD006536.
- Fleming, I. (2010). "Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS." Pflugers Arch **459**(6): 793-806.
- Fleser, P. S., V. K. Nuthakki, L. E. Malinzak, R. E. Callahan, M. L. Seymour, M. M. Reynolds, S. I. Merz, M. E. Meyerhoff, P. J. Bendick, G. B. Zelenock and C. J. Shanley (2004). "Nitric oxide-releasing biopolymers inhibit thrombus formation in a sheep model of arteriovenous bridge grafts." J Vasc Surg **40**(4): 803-811.
- Forsythe, R. O., D. E. Newby and J. M. Robson (2016). "Monitoring the biological activity of abdominal aortic aneurysms Beyond Ultrasound." Heart **102**(11): 817-824.
- Fukunishi, T., C. A. Best, T. Sugiura, T. Shoji, T. Yi, B. Udelsman, D. Ohst, C. S. Ong, H. Zhang, T. Shinoka, C. K. Breuer, J. Johnson and N. Hibino (2016). "Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model." PLoS One **11**(7): e0158555.
- Funkhouser, J. D. and N. N. Aronson, Jr. (2007). "Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family." BMC Evol Biol **7**: 96.
- Gokcinar-Yagci, B., D. Uckan-Cetinkaya and B. Celebi-Saltik (2015). "Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering." Stem Cell Rev **11**(4): 549-559.
- Gong, Z. D. and L. E. Niklason (2008). "Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs)." FASEB J. **22**: 1635-1648.
- Gorbet, M. B. and M. V. Sefton (2004). "Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes." Biomaterials **25**(26): 5681-5703.

- Gore, A., Z. Li, H. L. Fung, J. E. Young, S. Agarwal, J. Antosiewicz-Bourget, I. Canto, A. Giorgetti, M. A. Israel, E. Kiskinis, J. H. Lee, Y. H. Loh, P. D. Manos, N. Montserrat, A. D. Panopoulos, S. Ruiz, M. L. Wilbert, J. Yu, E. F. Kirkness, J. C. Izpisua Belmonte, D. J. Rossi, J. A. Thomson, K. Eggan, G. Q. Daley, L. S. Goldstein and K. Zhang (2011). "Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells." *Nature* **471**(7336): 63-67.
- Gresele, P., E. Falcinelli and S. Momi (2008). "Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy." *Trends Pharmacol Sci* **29**(7): 352-360.
- Griese, D. P., A. Ehsan, L. G. Melo, D. Kong, L. Zhang, M. J. Mann, R. E. Pratt, R. C. Mulligan and V. J. Dzau (2003). "Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy." *Circulation* **108**(21): 2710-2715.
- Gustafsson, Y., J. Haag, P. Jungebluth, V. Lundin, M. L. Lim, S. Baiguera, F. Ajalloueiian, C. Del Gaudio, A. Bianco, G. Moll, S. Sjoqvist, G. Lemon, A. I. Teixeira and P. Macchiarini (2012). "Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds." *Biomaterials* **33**(32): 8094-8103.
- Haisch, A., A. Loch, J. David, A. Pruss, R. Hansen and M. Sittlinger (2000). "Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering." *Med Biol Eng Comput* **38**(6): 686-689.
- Hamada, Y., K. Nokihara, M. Okazaki, W. Fujitani, T. Matsumoto, M. Matsuo, Y. Umakoshi, J. Takahashi and N. Matsuura (2003). "Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR." *Biochem Biophys Res Commun* **310**(1): 153-157.
- Han, D. K., K. Park, K. D. Park, K. D. Ahn and Y. H. Kim (2006). "In vivo biocompatibility of sulfonated PEO-grafted polyurethanes for polymer heart valve and vascular graft." *Artif Organs* **30**(12): 955-959.
- Hanjaya-Putra, D. and S. Gerecht (2009). "Vascular engineering using human embryonic stem cells." *Biotechnol Prog* **25**(1): 2-9.
- Harskamp, R. E., R. D. Lopes, C. E. Baisden, R. J. de Winter and J. H. Alexander (2013). "Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions." *Ann Surg* **257**(5): 824-833.
- He, H., T. Shirota, H. Yasui and T. Matsuda (2003). "Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential." *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**(2): 455-464.
- He, W., A. Nieponice, L. Soletti, Y. Hong, B. Gharaibeh, M. Crisan, A. Usas, B. Peault, J. Huard, W. R. Wagner and D. A. Vorp (2010). "Pericyte-based human tissue engineered vascular grafts." *Biomaterials* **31**(32): 8235-8244.
- Heise, M., G. Schmidmaier, I. Husmann, C. Heidenhain, J. Schmidt, P. Neuhaus and U. Settmacher (2006). "PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **32**(4): 418-424.
- Hibino, N., D. R. Duncan, A. Nalbandian, T. Yi, Y. Qyang, T. Shinoka and C. K. Breuer (2012). "Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts." *J Thorac Cardiovasc Surg* **143**(3): 696-703.
- Higgins, S. P., A. K. Solan and L. E. Niklason (2003). "Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation." *J. Biomed. Mater. Res. A* **67**: 295-302.

- Holzappel, G. A. (2008). Collagen in Arterial Walls: Biomechanical Aspects. Collagen: Structure and Mechanics. P. Fratzl. Boston, MA, Springer US: 285-324.
- Holzappel, G. A., G. Sommer, C. T. Gasser and P. Regitnig (2005). "Determination of layer-specific mechanical properties of human coronary arteries with nonatherosclerotic intimal thickening and related constitutive modeling." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(5): H2048-2058.
- Hoshi, R. A., R. Van Lith, M. C. Jen, J. B. Allen, K. A. Lapidos and G. Ameer (2013). "The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts." Biomaterials **34**(1): 30-41.
- Hosseinzadegan, H. and D. K. Tafti (2017). "Modeling thrombus formation and growth." Biotechnol Bioeng **114**(10): 2154-2172.
- Hristov, M. and C. Weber (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance." J Cell Mol Med **8**(4): 498-508.
- Huang, H., X. Zhao, L. Chen, C. Xu, X. Yao, Y. Lu, L. Dai and M. Zhang (2006). "Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture." Biochem Biophys Res Commun **351**(2): 321-327.
- Ito, S., S. Ishimaru and S. E. Wilson (1998). "Application of cocultured alpha-elastin to arterial prostheses for inhibition of anastomotic intimal hyperplasia." Asaio j **44**(5): M501-505.
- Ito, T., Y. Kakihana and I. Maruyama (2016). "Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases." Expert Opin Ther Targets **20**(2): 151-158.
- Jackson, S. P. (2011). "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly." Nat Med **17**(11): 1423-1436.
- Jakab, K., C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic and G. Forgacs (2010). "Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells." Biofabrication **2**(2): 022001.
- James, B. A. and R. A. Sire (2010). "Fatigue-life assessment and validation techniques for metallic vascular implants." Biomaterials **31**(2): 181-186.
- James, D., H. S. Nam, M. Seandel, D. Nolan, T. Janovitz, M. Tomishima, L. Studer, G. Lee, D. Lyden, R. Benezra, N. Zaninovic, Z. Rosenwaks, S. Y. Rabbany and S. Rafii (2010). "Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent." Nat Biotechnol **28**(2): 161-166.
- Jenney, C. R. and J. M. Anderson (2000). "Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior." J Biomed Mater Res **49**(4): 435-447.
- Jordan, S. W. and E. L. Chaikof (2007). "Novel thromboresistant materials." J Vasc Surg **45 Suppl A**: A104-115.
- Jordan, S. W., C. A. Haller, R. E. Sallach, R. P. Apkarian, S. R. Hanson and E. L. Chaikof (2007). "The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt." Biomaterials **28**(6): 1191-1197.
- Jun, H. W. and J. West (2004). "Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization." J Biomater Sci Polym Ed **15**(1): 73-94.

- Kaisar, J., A. Chen, M. Cheung, E. Kfoury, C. F. Bechara and P. H. Lin (2017). "Comparison of propaten heparin-bonded vascular graft with distal anastomotic patch versus autogenous saphenous vein graft in tibial artery bypass." 1708538117717141.
- Kajbafzadeh, A. M., R. Khorramirouz, S. M. Kameli, J. Hashemi and A. Bagheri (2017). "Decellularization of Human Internal Mammary Artery: Biomechanical Properties and Histopathological Evaluation." *Biores Open Access* **6**(1): 74-84.
- Kamath, S., D. Bhattacharyya, C. Padukudru, R. B. Timmons and L. Tang (2008). "Surface chemistry influences implant-mediated host tissue responses." *J Biomed Mater Res A* **86**(3): 617-626.
- Kanie, K., Y. Narita, Y. Zhao, F. Kuwabara, M. Satake, S. Honda, H. Kaneko, T. Yoshioka, M. Okochi, H. Honda and R. Kato (2012). "Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells." *Biotechnol Bioeng* **109**(7): 1808-1816.
- Kapfer, X., W. Meichelboeck and F. M. Groegler (2006). "Comparison of carbon-impregnated and standard ePTFE prostheses in extra-anatomical anterior tibial artery bypass: a prospective randomized multicenter study." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **32**(2): 155-168.
- Kasirajan, K. (2012). "Outcomes after heparin-induced thrombocytopenia in patients with Propaten vascular grafts." *Ann Vasc Surg* **26**(6): 802-808.
- Kealey, C. P., S. A. Whelan, Y. J. Chun, C. H. Soojung, A. W. Tulloch, K. P. Mohanchandra, D. Di Carlo, D. S. Levi, G. P. Carman and D. A. Rigberg (2010). "In vitro hemocompatibility of thin film nitinol in stenotic flow conditions." *Biomaterials* **31**(34): 8864-8871.
- Kean, T. and M. Thanou (2011). Chitin and chitosan - Sources, production and medical applications.
- Kelm, J. M., V. Lorber, J. G. Snedeker, D. Schmidt, A. Broggini-Tenzer, M. Weisstanner, B. Odermatt, A. Mol, G. Zund and S. P. Hoerstrup (2010). "A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks." *J Biotechnol* **148**(1): 46-55.
- Khait, L. and R. K. Birla (2012). "Bypassing the patient: comparison of biocompatible models for the future of vascular tissue engineering." *Cell Transplant* **21**(1): 269-283.
- Kim, I. Y., S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim and C. S. Cho (2008). "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications." *Biotechnol Adv* **26**(1): 1-21.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg and G. Q. Daley (2010). "Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells." *Nature* **467**(7313): 285-290.
- Klopfleisch, R. (2016). "Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers." *Acta Biomater* **43**: 3-13.
- Klopfleisch, R. and F. Jung (2017). "The pathology of the foreign body reaction against biomaterials." *J Biomed Mater Res A* **105**(3): 927-940.
- Kong, X., B. Han, H. Li, Y. Liang, K. Shao and W. Liu (2012). "New biodegradable small-diameter artificial vascular prosthesis: a feasibility study." *J Biomed Mater Res A* **100**(6): 1494-1504.
- Konig, G., T. N. McAllister, N. Dusserre, S. A. Garrido, C. Iyican, A. Marini, A. Fiorillo, H. Avila, W. Wystrychowski, K. Zagalski, M. Maruszewski, A. L. Jones, L. Cierpka, L. M. de la

- Fuente and N. L'Heureux (2009). "Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery." *Biomaterials* **30**(8): 1542-1550.
- Koobatian, M. T., C. Koenigsknecht, S. Row, S. Andreadis and D. Swartz (2015). "Surgical technique for the implantation of tissue engineered vascular grafts and subsequent in vivo monitoring." *J Vis Exp*(98): e52354.
- Koobatian, M. T., S. Row, R. J. Smith, Jr., C. Koenigsknecht, S. T. Andreadis and D. D. Swartz (2016). "Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model." *Biomaterials* **76**: 344-358.
- Kreuger, J. and M. Phillipson (2016). "Targeting vascular and leukocyte communication in angiogenesis, inflammation and fibrosis." *Nat Rev Drug Discov* **15**(2): 125-142.
- Kusaka, T., M. Nakayama, K. Nakamura, M. Ishimiya, E. Furusawa and K. Ogasawara (2014). "Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses." *PLoS One* **9**(3): e92634.
- Kwee, B. J. and D. J. Mooney (2015). "Manipulating the intersection of angiogenesis and inflammation." *Ann Biomed Eng* **43**(3): 628-640.
- L'Heureux, N., N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T. N. Wight, N. A. Chronos, A. E. Kyles, C. R. Gregory, G. Hoyt, R. C. Robbins and T. N. McAllister (2006). "Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization." *Nat Med* **12**(3): 361-365.
- L'Heureux, N., T. N. McAllister and L. M. de la Fuente (2007). "Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization." *N Engl J Med* **357**(14): 1451-1453.
- L'Heureux, N., S. Paquet, R. Labbe, L. Germain and F. A. Auger (1998). "A completely biological tissue-engineered human blood vessel." *FASEB J* **12**(1): 47-56.
- Lam, F. W., M. A. Cruz, K. Parikh and R. E. Rumbaut (2016). "Histones stimulate von Willebrand factor release in vitro and in vivo." *Haematologica* **101**(7): e277-279.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* **260**(5110): 920-926.
- Lantz, G. C., S. F. Badylak, A. C. Coffey, L. A. Geddes and W. E. Blevins (1990). "Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog." *J Invest Surg* **3**(3): 217-227.
- Laurent, L. C., I. Ulitsky, I. Slavin, H. Tran, A. Schork, R. Morey, C. Lynch, J. V. Harness, S. Lee, M. J. Barrero, S. Ku, M. Martynova, R. Semechkin, V. Galat, J. Gottesfeld, J. C. Izpisua Belmonte, C. Murry, H. S. Keirstead, H. S. Park, U. Schmidt, A. L. Laslett, F. J. Muller, C. M. Nievergelt, R. Shamir and J. F. Loring (2011). "Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture." *Cell Stem Cell* **8**(1): 106-118.
- Lavertu, M., Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann and A. Gupta (2003). "A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan." *J Pharm Biomed Anal* **32**(6): 1149-1158.
- Lavery, K. S., C. Rhodes, A. McGraw and M. J. Eppihimer (2017). "Anti-thrombotic technologies for medical devices." *Adv Drug Deliv Rev* **112**: 2-11.
- Lavu, M., S. Gundewar and D. J. Lefer (2011). "Gene therapy for ischemic heart disease." *J Mol Cell Cardiol* **50**(5): 742-750.
- Leszczak, V. and K. C. Popat (2014). "Improved in vitro blood compatibility of polycaprolactone nanowire surfaces." *ACS Appl Mater Interfaces* **6**(18): 15913-15924.

- Leung, H. W. (2001). "Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies." Ecotoxicol Environ Saf **49**(1): 26-39.
- Li, Q., L. Mu, F. Zhang, Z. Mo, C. Jin and W. Qi (2017). "Manufacture and property research of heparin grafted electrospinning PCU artificial vascular scaffolds." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **78**: 854-861.
- Li, S., D. Sengupta and S. Chien (2014). "Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **6**(1): 61-76.
- Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-325.
- Lim, H. and S. W. Hoag (2013). "Plasticizer effects on physical-mechanical properties of solvent cast Soluplus(R) films." AAPS PharmSciTech **14**(3): 903-910.
- Lin, C. Y., Y. R. Wang, C. W. Lin, S. W. Wang, H. W. Chien, N. C. Cheng, W. B. Tsai and J. Yu (2014). "Peptide-modified zwitterionic porous hydrogels for endothelial cell and vascular engineering." Biores Open Access **3**(6): 297-310.
- Lin, S., M. Sandig and K. Mequanint (2011). "Three-dimensional topography of synthetic scaffolds induces elastin synthesis by human coronary artery smooth muscle cells." Tissue Eng Part A **17**(11-12): 1561-1571.
- Lindholt, J. S., B. Gottschalksen, N. Johannesen, D. Dueholm, H. Ravn, E. D. Christensen, B. Viddal, T. Flørenes, G. Pedersen, M. Rasmussen, M. Carstensen, N. Grøndal and H. Fasting (2011). "The Scandinavian Propaten® Trial – 1-Year Patency of PTFE Vascular Prostheses with Heparin-Bonded Luminal Surfaces Compared to Ordinary Pure PTFE Vascular Prostheses – A Randomised Clinical Controlled Multi-centre Trial." European Journal of Vascular and Endovascular Surgery **41**(5): 668-673.
- Liszewski, M. K. and J. P. Atkinson (2015). "Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations." Hum Genomics **9**: 7.
- Liu, R. H., C. S. Ong, T. Fukunishi, K. Ong and N. Hibino (2017). "Review of Vascular Graft Studies in Large Animal Models." Tissue Eng Part B Rev.
- Liu, Y., Y. Wu, D. Bian, S. Gao, S. Leeftang, H. Guo, Y. Zheng and J. Zhou (2017). "Study on the Mg-Li-Zn ternary alloy system with improved mechanical properties, good degradation performance and different responses to cells." Acta Biomater.
- Liu, Y. C., X. B. Zou, Y. F. Chai and Y. M. Yao (2014). "Macrophage polarization in inflammatory diseases." Int J Biol Sci **10**(5): 520-529.
- Love, R. J. and K. S. Jones (2013). "The recognition of biomaterials: pattern recognition of medical polymers and their adsorbed biomolecules." J Biomed Mater Res A **101**(9): 2740-2752.
- Lovett, M., G. Eng, J. A. Kluge, C. Cannizzaro, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan (2010). "Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts." Organogenesis **6**(4): 217-224.
- Luo, Y., W. Hu, R. Xu, B. Hou, L. Zhang and W. Zhang (2011). "ZNF580, a novel C2H2 zinc-finger transcription factor, interacts with the TGF-beta signal molecule Smad2." Cell Biol Int **35**(11): 1153-1157.
- Mackman, N. (2008). "Triggers, targets and treatments for thrombosis." Nature **451**(7181): 914-918.

Madhusudhan, T., B. A. Kerlin and B. Isermann (2016). "The emerging role of coagulation proteases in kidney disease." Nat Rev Nephrol **12**(2): 94-109.

Malda, J., T. J. Klein and Z. Upton (2007). "The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues." Tissue Eng **13**(9): 2153-2162.

Marelli, B., M. Achilli, A. Alessandrino, G. Freddi, M. C. Tanzi, S. Fare and D. Mantovani (2012). "Collagen-reinforced electrospun silk fibroin tubular construct as small calibre vascular graft." Macromol Biosci **12**(11): 1566-1574.

Marelli, B., A. Alessandrino, S. Fare, G. Freddi, D. Mantovani and M. C. Tanzi (2010). "Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting." Acta Biomater **6**(10): 4019-4026.

Marga, F., K. Jakab, C. Khatiwala, B. Shepherd, S. Dorfman, B. Hubbard, S. Colbert and F. Gabor (2012). "Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing." Biofabrication **4**(2): 022001.

Margariti, A., B. Winkler, E. Karamariti, A. Zampetaki, T. N. Tsai, D. Baban, J. Ragoussis, Y. Huang, J. D. Han, L. Zeng, Y. Hu and Q. Xu (2012). "Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(34): 13793-13798.

Maruyama, O., M. Nishida, T. Yamane, I. Oshima, Y. Adachi and T. Masuzawa (2006). "Hemolysis resulting from surface roughness under shear flow conditions using a rotational shear stressor." Artif Organs **30**(5): 365-370.

Masden, D. L., M. Seruya and J. P. Higgins (2012). "A systematic review of the outcomes of distal upper extremity bypass surgery with arterial and venous conduits." J Hand Surg Am **37**(11): 2362-2367.

Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." PLoS Med **3**(11): e442.

Matsumura, G., N. Isayama, S. Matsuda, K. Taki, Y. Sakamoto, Y. Ikada and K. Yamazaki (2013). "Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue engineering of pulmonary artery in a canine model." Biomaterials **34**(27): 6422-6428.

Mauri, A., S. M. Zeisberger, S. P. Hoerstrup and E. Mazza (2013). "Analysis of the uniaxial and multi-axial mechanical response of a tissue-engineered vascular graft." Tissue Eng Part A **19**(5-6): 583-592.

Medina, R. J., C. L. Barber, F. Sabatier, F. Dignat-George, J. M. Melero-Martin, K. Khosrotehrani, O. Ohneda, A. M. Randi, J. K. Y. Chan, T. Yamaguchi, V. W. M. Van Hinsbergh, M. C. Yoder and A. W. Stitt (2017). "Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature." Stem Cells Transl Med **6**(5): 1316-1320.

Melchiorri, A. J., N. Hibino, T. Yi, Y. U. Lee, T. Sugiura, S. Tara, T. Shinoka, C. Breuer and J. P. Fisher (2015). "Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts." Biomacromolecules **16**(2): 437-446.

Mercado-Pagan, A. E., D. F. Ker and Y. Yang (2014). "Hemocompatibility evaluation of small elastomeric hollow fiber membranes as vascular substitutes." J Biomater Appl **29**(4): 557-565.

Meyers, S. R. and M. W. Grinstaff (2012). "Biocompatible and bioactive surface modifications for prolonged in vivo efficacy." Chem Rev **112**(3): 1615-1632.

- Mikesch, J. H., H. Buerger, R. Simon and B. Brandt (2006). "Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies." Biochim Biophys Acta **1766**(1): 42-52.
- Montembault, A., C. Viton and A. Domard (2005). "Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium." Biomaterials **26**(8): 933-943.
- Montembault, A., C. Viton and A. Domard (2005). "Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent." Biomacromolecules **6**(2): 653-662.
- Morota, T. and S. Takamoto (2013). "Development and physical characteristics of novel zero-porosity vascular graft "triplex((R))"." Ann Vasc Dis **6**(1): 67-73.
- Motlagh, D., J. Yang, K. Y. Lui, A. R. Webb and G. A. Ameer (2006). "Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering." Biomaterials **27**(24): 4315-4324.
- Mozaffarian, D., E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, S. de Ferranti, J. P. Despres, H. J. Fullerton, V. J. Howard, M. D. Huffman, C. R. Isasi, M. C. Jimenez, S. E. Judd, B. M. Kissela, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, S. Liu, R. H. Mackey, D. J. Magid, D. K. McGuire, E. R. Mohler, 3rd, C. S. Moy, P. Muntner, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D. K. Pandey, M. J. Reeves, C. J. Rodriguez, W. Rosamond, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, D. Woo, R. W. Yeh, M. B. Turner, M. Writing Group, C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics (2016). "Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **133**(4): e38-360.
- Musey, P. I., S. M. Ibim and N. K. Talukder (2002). "Development of artificial blood vessels: seeding and proliferation characteristics of endothelial and smooth muscle cells on biodegradable membranes." Ann N Y Acad Sci **961**: 279-283.
- Muxika, A., A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero and K. de la Caba (2017). "Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications." International Journal of Biological Macromolecules.
- Muzzarelli, R. A., M. El Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili and A. Gigante (2015). "Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone." Mar Drugs **13**(12): 7314-7338.
- Muzzarelli, R. A., M. El Mehtedi, C. Bottegoni and A. Gigante (2016). "Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review." Int J Biol Macromol **93**(Pt B): 1366-1381.
- Naghavi, N., A. de Mel, O. S. Alavijeh, B. G. Cousins and A. M. Seifalian (2013). "Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications." Small **9**(1): 22-35.
- Nagiah, N., R. Johnson, R. Anderson, W. Elliott and W. Tan (2015). "Highly Compliant Vascular Grafts with Gelatin-Sheathed Coaxially Structured Nanofibers." Langmuir **31**(47): 12993-13002.
- Nesargikar, P. N., B. Spiller and R. Chavez (2012). "The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors." Eur J Microbiol Immunol (Bp) **2**(2): 103-111.
- Nesselmann, C., W. Li, N. Ma and G. Steinhoff (2010). "Stem cell-mediated neovascularization in heart repair." Ther Adv Cardiovasc Dis **4**(1): 27-42.
- Nienaber, C. A., R. E. Clough, N. Sakalihasan, T. Suzuki, R. Gibbs, F. Mussa, M. T. Jenkins, M. M. Thompson, A. Evangelista, J. S. Yeh, N. Cheshire, U. Rosendahl and J. Pepper (2016). "Aortic dissection." Nat Rev Dis Primers **2**: 16053.

- Niklason, L. E. (1999). "Functional arteries grown in vitro." *Science* **284**: 489-493.
- Nishibe, T., Y. Okuda, T. Kumada, T. Tanabe and K. Yasuda (2000). "Enhanced graft healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts by covalent bonding of fibronectin." *Surg Today* **30**(5): 426-431.
- Nobili, M., J. Sheriff, U. Morbiducci, A. Redaelli and D. Bluestein (2008). "Platelet activation due to hemodynamic shear stresses: damage accumulation model and comparison to in vitro measurements." *Asaio j* **54**(1): 64-72.
- Noris, M., F. Mescia and G. Remuzzi (2012). "STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation." *Nat Rev Nephrol* **8**(11): 622-633.
- Norotte, C., F. S. Marga, L. E. Niklason and G. Forgacs (2009). "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting." *Biomaterials* **30**(30): 5910-5917.
- Nourse, M. B., D. E. Halpin, M. Scatena, D. J. Mortisen, N. L. Tulloch, K. D. Hauch, B. Torok-Storb, B. D. Ratner, L. Pabon and C. E. Murry (2010). "VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(1): 80-89.
- Obi, S., K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Kumagaya, T. Masumura, T. Sokabe, T. Asahara and J. Ando (2009). "Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells." *J Appl Physiol* **106**(1): 203-211.
- Ogle, M. E., C. E. Segar, S. Sridhar and E. A. Botchwey (2016). "Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design." *Exp Biol Med (Maywood)* **241**(10): 1084-1097.
- Ohashi, T. and M. Sato (2005). "Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: experimental and numerical approach." *Fluid Dynamics Research* **37**(1): 40-59.
- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* **448**(7151): 313-317.
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors." *Science* **322**(5903): 949-953.
- Olausson, M., P. B. Patil, V. K. Kuna, P. Chougule, N. Hernandez, K. Methe, C. Kullberg-Lindh, H. Borg, H. Ejnell and S. Sumitran-Holgersson (2012). "Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study." *Lancet* **380**(9838): 230-237.
- Opitz, F., K. Schenke-Layland, T. U. Cohnert, B. Starcher, K. J. Halbhuber, D. P. Martin and U. A. Stock (2004). "Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo." *Cardiovasc Res* **63**(4): 719-730.
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser and C. Werner (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." *Stem Cells* **22**(3): 377-384.
- Pan, C. J., Y. H. Hou, B. B. Zhang and L. C. Zhang (2014). "Fabrication of anticoagulation layer on titanium surface by sequential immobilization of poly (ethylene glycol) and albumin." *Biomed Mater Eng* **24**(1): 781-787.
- Park, I. H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." *Nature* **451**(7175): 141-146.

Pashneh-Tala, S., S. MacNeil and F. Claeysens (2015). "The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future." Tissue Eng Part B Rev.

Patel, A. and E. Honore (2010). "Polycystins and renovascular mechanosensory transduction." Nat Rev Nephrol **6**(9): 530-538.

Paul, D. M., S. P. Vilas and J. M. Kumar (2011). "A flow-cytometry assisted segregation of responding and non-responding population of endothelial cells for enhanced detection of intracellular nitric oxide production." Nitric Oxide **25**(1): 31-40.

Peck, M., D. Gebhart, N. Dusserre, T. N. McAllister and N. L'Heureux (2012). "The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art." Cells Tissues Organs **195**: 144-158.

Pelton, A. R., V. Schroeder, M. R. Mitchell, X. Y. Gong, M. Barney and S. W. Robertson (2008). "Fatigue and durability of Nitinol stents." J Mech Behav Biomed Mater **1**(2): 153-164.

Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." Nature **309**(5963): 30-33.

Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud and L. Casteilla (2004). "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." Circulation **109**(5): 656-663.

Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." Nat Rev Immunol **7**(10): 803-815.

Qi, L., Z. Xu, X. Jiang, Y. Li and M. Wang (2005). "Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles." Bioorg Med Chem Lett **15**(5): 1397-1399.

Qi, P., M. F. Maitz and N. Huang (2013). "Surface modification of cardiovascular materials and implants." Surface and Coatings Technology **233**(Supplement C): 80-90.

Quint, C., M. Arief, A. Muto, A. Dardik and L. E. Niklason (2012). "Allogeneic human tissue-engineered blood vessel." J. Vasc. Surg. **55**: 790-798.

Quint, C., Y. Kondo, R. J. Manson, J. H. Lawson, A. Dardik and L. E. Niklason (2011). "Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): 9214-9219.

Rami, L., S. Malaise, S. Delmond, J. C. Fricain, R. Siadous, S. Schlaubitz, E. Laurichesse, J. Amedee, A. Montembault, L. David and L. Bordenave (2014). "Physicochemical modulation of chitosan-based hydrogels induces different biological responses: interest for tissue engineering." J Biomed Mater Res A **102**(10): 3666-3676.

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). "A review of chitin and chitosan applications." Reactive and Functional Polymers **46**(1): 1-27.

Remy, M., M. Durand, P. Menu, J. C. Voegel, J. F. Ponsot, X. Berard, M. F. Harmand and L. Bordenave (2013). "Interspecies differences with in vitro and in vivo models of vascular tissue engineering." Biomaterials **34**(38): 9842-9852.

Ren, T., S. Yu, Z. Mao, S. E. Moya, L. Han and C. Gao (2014). "Complementary density gradient of Poly(hydroxyethyl methacrylate) and YIGSR selectively guides migration of endotheliocytes." Biomacromolecules **15**(6): 2256-2264.

- Ren, X., Y. Feng, J. Guo, H. Wang, Q. Li, J. Yang, X. Hao, J. Lv, N. Ma and W. Li (2015). "Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications." Chem Soc Rev **44**(15): 5680-5742.
- Rodriguez-Vázquez M., Vega-Ruiz B., Ramos-Zúñiga R., Saldaña-Koppel D.A. and Quiñones-Olvera L.F. (2015). "Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine." BioMed Research International **2015**: 15.
- Roh, J. D., G. N. Nelson, M. P. Brennan, T. L. Mirensky, T. Yi, T. F. Hazlett, G. Tellides, A. J. Sinusas, J. S. Pober, W. M. Saltzman, T. R. Kyriakides and C. K. Breuer (2008). "Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model." Biomaterials **29**(10): 1454-1463.
- Rosellini, E., G. Vozzi, N. Barbani, P. Giusti and C. Cristallini (2010). "Three-dimensional microfabricated scaffolds with cardiac extracellular matrix-like architecture." Int. J. Artif. Organs **33**: 885-894.
- Rossi, V., S. Cseh, I. Bally, N. M. Thielens, J. C. Jensenius and G. J. Arlaud (2001). "Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2." J Biol Chem **276**(44): 40880-40887.
- Rubens, F. D., R. S. Labow, E. Meek, A. K. Dudani and P. R. Ganz (1997). "Tissue factor expression by cells used for sodding of prosthetic vascular grafts." J Surg Res **72**(1): 22-28.
- Salacinski, H. J., S. Goldner, A. Giudiceandrea, G. Hamilton, A. M. Seifalian, A. Edwards and R. J. Carson (2001). "The mechanical behavior of vascular grafts: a review." J Biomater Appl **15**(3): 241-278.
- Samson, R. H., R. Morales, D. P. Showalter, M. R. Lepore, Jr. and D. G. Nair (2016). "Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison." J Vasc Surg **64**(3): 638-647.
- Samuel, S. P., M. J. Santos-Martinez, C. Medina, N. Jain, M. W. Radomski, A. Prina-Mello and Y. Volkov (2015). "CdTe quantum dots induce activation of human platelets: implications for nanoparticle hemocompatibility." Int J Nanomedicine **10**: 2723-2734.
- Sanchez-Palencia, D. M., J. Navarro, J. C. Araque, J. B. Umana, A. F. Guerrero, L. M. Quijano, R. D. Lopez, N. F. Sandoval and J. C. Briceno (2015). "Effects of Fabrication on Early Patency and Regeneration of Small Intestinal Submucosa Vascular Grafts." Asaio j **61**(5): 596-604.
- Sarkar, S., H. J. Salacinski, G. Hamilton and A. M. Seifalian (2006). "The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency." Eur J Vasc Endovasc Surg **31**(6): 627-636.
- Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni and M. A. Cassatella (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.
- Schneider, K. H., P. Aigner, W. Holnthoner, X. Monforte, S. Nurnberger, D. Runzler, H. Redl and A. H. Teuschl (2016). "Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts." Acta Biomater **29**: 125-134.
- Sefton, M. V., C. H. Gemmell and M. B. Gorbet (2000). "What really is blood compatibility?" J Biomater Sci Polym Ed **11**(11): 1165-1182.
- Seib, F. P., M. Herklotz, K. A. Burke, M. F. Maitz, C. Werner and D. L. Kaplan (2014). "Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications." Biomaterials **35**(1): 83-91.

- Seifu, D. G., A. Purnama, K. Mequanint and D. Mantovani (2013). "Small-diameter vascular tissue engineering." Nat Rev Cardiol **10**(7): 410-421.
- Shafiq, M., Y. Jung and S. H. Kim (2016). "Covalent immobilization of stem cell inducing/recruiting factor and heparin on cell-free small-diameter vascular graft for accelerated in situ tissue regeneration." J Biomed Mater Res A **104**(6): 1352-1371.
- Shantsila, E., A. D. Blann and G. Y. Lip (2008). "Circulating endothelial cells: from bench to clinical practice." J Thromb Haemost **6**(5): 865-868.
- Shantsila, E., T. Watson, H. F. Tse and G. Y. Lip (2008). "New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties." J Am Coll Cardiol **51**(6): 669-671.
- She, M., A. P. McGuigan and M. V. Sefton (2007). "Tissue factor and thrombomodulin expression on endothelial cell-seeded collagen modules for tissue engineering." J Biomed Mater Res A **80**(2): 497-504.
- Shi, C., F. Yao, Q. Li, M. Khan, X. Ren, Y. Feng, J. Huang and W. Zhang (2014). "Regulation of the endothelialization by human vascular endothelial cells by ZNF580 gene complexed with biodegradable microparticles." Biomaterials **35**(25): 7133-7145.
- Shi, Y., H. Inoue, J. C. Wu and S. Yamanaka (2017). "Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress." Nat Rev Drug Discov **16**(2): 115-130.
- Sieveking, D. P., A. Buckle, D. S. Celermajer and M. K. Ng (2008). "Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay." J Am Coll Cardiol **51**(6): 660-668.
- Simard, T., R. G. Jung, P. Motazedian, P. Di Santo, F. D. Ramirez, J. J. Russo, A. Labinaz, A. Yousef, B. Anantharam, A. Pourdjabbar and B. Hibbert (2017). "Progenitor Cells for Arterial Repair: Incremental Advancements towards Therapeutic Reality." Stem Cells Int **2017**: 8270498.
- Simon-Yarza, T., I. Bataille and D. Letourneur (2017). "Cardiovascular Bio-Engineering: Current State of the Art." J Cardiovasc Transl Res **10**(2): 180-193.
- Skeoch, S. and I. N. Bruce (2015). "Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation?" Nat Rev Rheumatol **11**(7): 390-400.
- Smadja, D. M., I. Bieche, S. Susen, L. Mauge, I. Laurendeau, C. d'Audigier, F. Grelac, J. Emmerich, M. Aiach and P. Gaussem (2009). "Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells." J Cell Mol Med **13**(8B): 2534-2546.
- Smadja, D. M. and P. Gaussem (2009). "[Characterization of endothelial progenitor cells and putative strategies to improve their expansion]." J Soc Biol **203**(2): 197-207.
- Smadja, D. M., L. Mauge, S. Susen, I. Bieche and P. Gaussem (2009). "Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro: a rebuttal." J Thromb Haemost **7**(3): 504-506; author reply 506-508.
- Soletti, L., Y. Hong, J. Guan, J. J. Stankus, M. S. El-Kurdi, W. R. Wagner and D. A. Vorp (2010). "A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts." Acta Biomater **6**(1): 110-122.
- Sone, M., H. Itoh, K. Yamahara, J. K. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, A. Nonoguchi, Y. Suzuki, T. H. Chao, N. Sawada, Y. Fukunaga, K. Miyashita, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, N. Tamura, Y. Kondo, S. Nito, H. Suemori, N. Nakatsuji, S. Nishikawa and K. Nakao (2007). "Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular

cell components and their potential for vascular regeneration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(10): 2127-2134.

Sorlier, P., C. Viton and A. Domard (2002). "Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging." Biomacromolecules **3**(6): 1336-1342.

Stang, K., S. Krajewski, B. Neumann, J. Kurz, M. Post, S. Stoppelkamp, S. Fennrich, M. Avci-Adali, D. Armbruster, C. Schlensak, I. A. Burgener, H. P. Wendel and T. Walker (2014). "Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **42**: 422-428.

Stoclet, J. C., K. Laflamme, F. A. Auger and L. Germain (2004). "[Human blood vessels created with tissue engineering]." Med Sci (Paris) **20**(6-7): 675-678.

Strobel, H. A., E. L. Calamari, A. Beliveau, A. Jain and M. W. Rolle (2017). "Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone and gelatin composite cuffs for tissue engineered blood vessels." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.

Sweeney, C. A., P. E. McHugh, J. P. McGarry and S. B. Leen (2012). "Micromechanical methodology for fatigue in cardiovascular stents." International Journal of Fatigue **44**(Supplement C): 202-216.

Swystun, L. L. and P. C. Liaw (2016). "The role of leukocytes in thrombosis." Blood **128**(6): 753-762.

Syedain, Z. H., L. A. Meier, J. W. Bjork, A. Lee and R. T. Tranquillo (2011). "Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring." Biomaterials **32**(3): 714-722.

Tai, N. R., H. J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton and A. M. Seifalian (2000). "Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction." British Journal of Surgery **87**(11): 1516-1524.

Tajaddini, A., D. L. Kilpatrick, P. Schoenhagen, E. M. Tuzcu, M. Lieber and D. G. Vince (2005). "Impact of age and hyperglycemia on the mechanical behavior of intact human coronary arteries: an ex vivo intravascular ultrasound study." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H250-255.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Takeuchi, M., T. Kuratani, S. Miyagawa, Y. Shirakawa, K. Shimamura, K. Kin, T. Yoshida, Y. Arai, T. Hoashi, N. Teramoto, K. Hirakawa, N. Kawaguchi and Y. Sawa (2014). "Tissue-engineered stent-graft integrates with aortic wall by recruiting host tissue into graft scaffold." J Thorac Cardiovasc Surg **148**(4): 1719-1725.

Tan, Z., X. Gao, T. Liu, Y. Yang, J. Zhong, C. Tong and Y. Tan (2017). "Electrospun vein grafts with high cell infiltration for vascular tissue engineering." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **81**: 407-415.

Tang, L., Y. Wu and R. B. Timmons (1998). "Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces." J Biomed Mater Res **42**(1): 156-163.

- Tayel, A. A., S. Moussa, K. Opwis, D. Knittel, E. Schollmeyer and A. Nickisch-Hartfiel (2010). "Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan." *Int J Biol Macromol* **47**(1): 10-14.
- Teng, W. L., E. Khor, T. K. Tan, L. Y. Lim and S. C. Tan (2001). "Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi." *Carbohydr Res* **332**(3): 305-316.
- Thébaud, N. B., R. Bareille, R. Daculsi, C. Bourget, M. Rémy, H. Kerdjoudj, P. Menu and L. Bordenave (2010). "Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor-derived endothelial cells to remain functional under shear stress in vitro." *Acta Biomaterialia* **6**(4): 1437-1445.
- Tiwari, A., H. Salacinski, A. M. Seifalian and G. Hamilton (2002). "New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes." *Cardiovasc Surg* **10**(3): 191-197.
- Trouw, L. A., M. C. Pickering and A. M. Blom (2017). "The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease." *Nat Rev Rheumatol* **13**(9): 538-547.
- Tseng, P.-Y., S. S. Rele, X.-L. Sun and E. L. Chaikof (2006). "Membrane-mimetic films containing thrombomodulin and heparin inhibit tissue factor-induced thrombin generation in a flow model." *Biomaterials* **27**(12): 2637-2650.
- Tunstall, A., R. C. Eberhart and M. D. Prager (1994). "Comparison of tissue factor and prostacyclin production by human umbilical vein endothelial cells on Dacron vascular prostheses and Dacron smooth films." *J Biomed Mater Res* **28**(10): 1233-1238.
- Van Blitterswijk, C. (2008). "Tissue Engineering." *Academic press series in biomedical engineering*.
- van Haften, E. E., C. V. C. Bouten and N. A. Kurniawan (2017). "Vascular Mechanobiology: Towards Control of In Situ Regeneration." *Cells* **6**(3).
- van Oeveren, W. (2013). "Obstacles in haemocompatibility testing." *Scientifica (Cairo)* **2013**: 392584.
- van Oeveren, W., I. F. Tielliu and J. de Hart (2012). "Comparison of modified Chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high blood flow conditions: application in thrombogenicity testing of different materials for vascular applications." *Int J Biomater* **2012**: 673163.
- Varu, V. N., N. D. Tsihlis and M. R. Kibbe (2009). "Basic science review: nitric oxide-releasing prosthetic materials." *Vasc Endovascular Surg* **43**(2): 121-131.
- Veiseh, O., J. C. Doloff, M. Ma, A. J. Vegas, H. H. Tam, A. R. Bader, J. Li, E. Langan, J. Wyckoff, W. S. Loo, S. Jhunjhunwala, A. Chiu, S. Siebert, K. Tang, J. Hollister-Lock, S. Aresta-Dasilva, M. Bochenek, J. Mendoza-Elias, Y. Wang, M. Qi, D. M. Lavin, M. Chen, N. Dholakia, R. Thakrar, I. Lacik, G. C. Weir, J. Oberholzer, D. L. Greiner, R. Langer and D. G. Anderson (2015). "Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates." *Nat Mater* **14**(6): 643-651.
- Velnar, T., G. Bunc, R. Klobucar and L. Gradisnik (2016). "Biomaterials and host versus graft response: a short review." *Bosn J Basic Med Sci* **16**(2): 82-90.
- Vinatier, C., L. Bordenave, J. Guicheux and J. Amedee (2011). "[Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering]." *Med Sci (Paris)* **27**(3): 289-296.
- Wallis, R., D. A. Mitchell, R. Schmid, W. J. Schwaeble and A. H. Keeble (2010). "Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation." *Immunobiology* **215**(1): 1-11.

- Wang, Q., H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang and Y. Wang (2010). "Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages." Cell Res **20**(6): 701-712.
- Wang, Q., F. Tu, Y. Liu, Y. Zhang, H. Li, Z. Kang, Y. Yin and J. Wang (2017). "The effect of hirudin modification of silk fibroin on cell growth and antithrombogenicity." Materials Science and Engineering: C **75**(Supplement C): 237-246.
- Wang, S., Y. Zhang, H. Wang, G. Yin and Z. Dong (2009). "Fabrication and properties of the electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold." Biomacromolecules **10**(8): 2240-2244.
- Wang, W., L. Guo, Y. Yu, Z. Chen, R. Zhou and Z. Yuan (2015). "Peptide REDV-modified polysaccharide hydrogel with endothelial cell selectivity for the promotion of angiogenesis." J Biomed Mater Res A **103**(5): 1703-1712.
- Wang, X. Y., Y. Pei, M. Xie, Z. H. Jin, Y. S. Xiao, Y. Wang, L. N. Zhang, Y. Li and W. H. Huang (2015). "An artificial blood vessel implanted three-dimensional microsystem for modeling transvascular migration of tumor cells." Lab Chip **15**(4): 1178-1187.
- Wang, Y., J. Hu, J. Jiao, Z. Liu, Z. Zhou, C. Zhao, L. J. Chang, Y. E. Chen, P. X. Ma and B. Yang (2014). "Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds." Biomaterials **35**(32): 8960-8969.
- Wang, Z., Y. Cui, J. Wang, X. Yang, Y. Wu, K. Wang, X. Gao, D. Li, Y. Li, X. L. Zheng, Y. Zhu, D. Kong and Q. Zhao (2014). "The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration." Biomaterials **35**(22): 5700-5710.
- Ward, A. O., M. Caputo, G. D. Angelini, S. J. George and M. Zakkar (2017). "Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease." Atherosclerosis.
- Watt, F. M. and R. R. Driskell (2010). "The therapeutic potential of stem cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1537): 155-163.
- Wells, L. A., H. Guo, A. Emili and M. V. Sefton (2017). "The profile of adsorbed plasma and serum proteins on methacrylic acid copolymer beads: Effect on complement activation." Biomaterials **118**: 74-83.
- Wendt, D., S. A. Riboldi, M. Cioffi and I. Martin (2009). "Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives." Adv Biochem Eng Biotechnol **112**: 1-27.
- Werner, L., V. Deutsch, I. Barshack, H. Miller, G. Keren and J. George (2005). "Transfer of endothelial progenitor cells improves myocardial performance in rats with dilated cardiomyopathy induced following experimental myocarditis." J Mol Cell Cardiol **39**(4): 691-697.
- Wheatcroft, M. D., E. Greco, L. Tse and G. Roche-Nagle (2011). "Heparin-induced thrombocytopenia in the presence of a heparin-bonded bypass graft." Vascular **19**(6): 338-341.
- Wiegner, R., S. Chakraborty and M. Huber-Lang (2016). "Complement-coagulation crosstalk on cellular and artificial surfaces." Immunobiology **221**(10): 1073-1079.
- Wijelath, E. S., S. Rahman, J. Murray, Y. Patel, G. Savidge and M. Sobel (2004). "Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells." J Vasc Surg **39**(3): 655-660.
- Wilson, C. J., R. E. Clegg, D. I. Leavesley and M. J. Percy (2005). "Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review." Tissue Eng **11**(1-2): 1-18.

- Wystrychowski, W., T. N. McAllister, K. Zagalski, N. Dusserre, L. Cierpka and N. L'Heureux (2014). "First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access." *J Vasc Surg* **60**(5): 1353-1357.
- Xie, C., J. Hu, H. Ma, J. Zhang, L. J. Chang, Y. E. Chen and P. X. Ma (2011). "Three-dimensional growth of iPS cell-derived smooth muscle cells on nanofibrous scaffolds." *Biomaterials* **32**(19): 4369-4375.
- Xu, L. C., J. W. Bauer and C. A. Siedlecki (2014). "Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces." *Colloids Surf B Biointerfaces* **124**: 49-68.
- Xue, S., H. T. Zhang, P. Zhang, J. Luo, Z. Z. Chen, X. D. Jang and R. X. Xu (2010). "Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury." *Neurosci Lett* **473**(3): 186-191.
- Yang, Z., J. Tao, J. M. Wang, C. Tu, M. G. Xu, Y. Wang and S. R. Pan (2006). "Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(2): 577-584.
- Yao, Y., J. Wang, Y. Cui, R. Xu, Z. Wang, J. Zhang, K. Wang, Y. Li, Q. Zhao and D. Kong (2014). "Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization." *Acta Biomater* **10**(6): 2739-2749.
- Ye, Q., G. Zund, S. Jockenhoevel, A. Schoeberlein, S. P. Hoerstrup, J. Grunenfelder, P. Benedikt and M. Turina (2000). "Scaffold precoating with human autologous extracellular matrix for improved cell attachment in cardiovascular tissue engineering." *Asaio j* **46**(6): 730-733.
- Ye, S. H., Y. Hong, H. Sakaguchi, V. Shankarraman, S. K. Luketich, A. D'Amore and W. R. Wagner (2014). "Nonthrombogenic, biodegradable elastomeric polyurethanes with variable sulfobetaine content." *ACS Appl Mater Interfaces* **6**(24): 22796-22806.
- Ye, Z., H. Zhan, P. Mali, S. Dowey, D. M. Williams, Y. Y. Jang, C. V. Dang, J. L. Spivak, A. R. Moliterno and L. Cheng (2009). "Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders." *Blood* **114**(27): 5473-5480.
- Yoder, M. C., L. E. Mead, D. Prater, T. R. Krier, K. N. Mroueh, F. Li, R. Krasich, C. J. Temm, J. T. Prchal and D. A. Ingram (2007). "Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals." *Blood* **109**(5): 1801-1809.
- Yokota, T., H. Ichikawa, G. Matsumiya, T. Kuratani, T. Sakaguchi, S. Iwai, Y. Shirakawa, K. Torikai, A. Saito, E. Uchimura, N. Kawaguchi, N. Matsuura and Y. Sawa (2008). "In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding." *J Thorac Cardiovasc Surg* **136**(4): 900-907.
- Younes, I. and M. Rinaudo (2015). "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications." *Mar Drugs* **13**(3): 1133-1174.
- Yow, K. H., J. Ingram, S. A. Korossis, E. Ingham and S. Homer-Vanniasinkam (2006). "Tissue engineering of vascular conduits." *Br. J. Surg.* **93**: 652-661.
- Yu, H., S. Engel, G. Janiga and D. Thevenin (2017). "A Review of Hemolysis Prediction Models for Computational Fluid Dynamics." *Artif Organs* **41**(7): 603-621.
- Zamani, M., M. Khafaji, M. Najji, M. Vossoughi, I. Alemzadeh and N. Haghhighipour (2017). "A Biomimetic Heparinized Composite Silk-Based Vascular Scaffold with sustained Antithrombogenicity." *Sci Rep* **7**(1): 4455.

- Zhang, Q. H. and M. P. She (2007). "Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases." Chin Med J (Engl) **120**(24): 2297-2303.
- Zhang, S. J., H. Zhang, Y. J. Wei, W. J. Su, Z. K. Liao, M. Hou, J. Y. Zhou and S. S. Hu (2006). "Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture." Cell Res **16**(6): 577-584.
- Zhang, W. J., W. Liu, L. Cui and Y. Cao (2007). "Tissue engineering of blood vessel." J. Cell. Mol. Med. **11**: 945-957.
- Zhang, Z., Z. Wang, S. Liu and M. Kodama (2004). "Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses." Biomaterials **25**(1): 177-187.
- Zhao, X., N. Wu and L. Huang (2010). "Endothelial progenitor cells and spleen: new insights in regeneration medicine." Cytotherapy **12**(1): 7-16.
- Zhao, Y., R. D. Park and R. A. Muzzarelli (2010). "Chitin deacetylases: properties and applications." Mar Drugs **8**(1): 24-46.
- Zhao, Y., P. M. Vanhoutte and S. W. Leung (2015). "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS." J Pharmacol Sci **129**(2): 83-94.
- Zhou, L., J. Xia, X. Qiu, P. Wang, R. Jia, Y. Chen, B. Yang and Y. Dai (2015). "In vitro evaluation of endothelial progenitor cells from adipose tissue as potential angiogenic cell sources for bladder angiogenesis." PLoS One **10**(2): e0117644.
- Zhu, C., X. Ma, L. Xian, Y. Zhou and D. Fan (2014). "Characterization of a co-electrospun scaffold of HLC/CS/PLA for vascular tissue engineering." Biomed Mater Eng **24**(6): 1999-2005.
- Zhu, G., Q. Yuan, J. Hock Yeo and M. Nakao (2015). "Thermal treatment of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) membranes for reconstruction of a valved conduit." Biomed Mater Eng **26 Suppl 1**: S55-62.
- Zhu, G. C., Y. Q. Gu, X. Geng, Z. G. Feng, S. W. Zhang, L. Ye and Z. G. Wang (2015). "Experimental study on the construction of small three-dimensional tissue engineered grafts of electrospun poly-epsilon-caprolactone." J Mater Sci Mater Med **26**(2): 112.
- Zilla, P., D. Bezuidenhout and P. Human (2007). "Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing." Biomaterials **28**(34): 5009-5027.