



HAL
open science

Un nouveau type de substitut vasculaire obtenu par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine

Agathe Gremare

► To cite this version:

Agathe Gremare. Un nouveau type de substitut vasculaire obtenu par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0060 . tel-02975171

HAL Id: tel-02975171

<https://theses.hal.science/tel-02975171>

Submitted on 22 Oct 2020

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**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPECIALITE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Agathe GREMARE

Née le 25.10.1989 à Paris (75)

**Un nouveau type de substitut vasculaire obtenu par tissage
de fils issus de la membrane amniotique humaine**

Sous la direction de : Nicolas L'HEUREUX

Soutenue le 29 juin 2020

Membres du jury :

M. FARGES, Jean-Christophe
Mme CHAUSSAIN, Catherine
Mme. DECOT, Véronique
M. HEIM, Frédéric
M. L'HEUREUX, Nicolas

PU-PH, Université de Lyon 1 - Lyon
PU-PH, Université Paris Descartes – Paris
PU-PH, Université de Lorraine – Nancy
PU, Université de Haute Alsace – Mulhouse
DR2-INSERM, Université de Bordeaux - Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Un nouveau type de substitut vasculaire obtenu par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine

En réponse à la faible performance des prothèses synthétiques pour les revascularisations de petit diamètre (≤ 6 mm), de nombreux travaux de recherche ont porté sur le développement de substituts vasculaires biologiques. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus, la production de ces greffons repose principalement sur des méthodes d'ingénierie tissulaire coûteuses. L'objectif de cette thèse était donc de produire, à moindre coût, un substitut vasculaire biologique humain de petit diamètre. Pour cela, la membrane amniotique humaine (MAH) et une méthode d'assemblage sans cellule, basée sur le tissage, ont été associées. Afin de mieux connaître ce tissu, une étude détaillée des propriétés mécaniques a, tout d'abord, permis d'identifier la MAH placentaire comme une zone mécaniquement forte ne devant pas être négligée lors de la production de nos fils. La découpe de la MAH a ensuite permis d'obtenir des fils qui ont été caractérisés, puis assemblés par tissage manuel pour produire des substituts vasculaires. *In vitro*, ces greffons présentaient des propriétés mécaniques (pression à l'éclatement, rétention à la suture, perméabilité transmurale) compatibles avec une utilisation clinique justifiant le passage à une implantation en site artériel chez l'animal.

Mots clés : Ingénierie tissulaire vasculaire, Membrane amniotique humaine, Textiles humains

A new type of vascular substitute produced by weaving yarns of human amniotic membrane

In response to the poor performance of synthetic prostheses for small-diameter revascularizations (≤ 6 mm), a great deal of research has focused on the development of biological vascular substitutes. Although promising results have been obtained, the production of these grafts mainly relied on expensive tissue engineering methods. Consequently, our objective was to inexpensively produce a small diameter human biological vascular substitute. Thus, the human amniotic membrane (HAM) and a cell-free assembly method based on weaving were associated. First, to improve our knowledge of this tissue, a detailed study of the mechanical properties demonstrated that the placental HAM is a mechanically strong area that should not be neglected during our yarn production. Then, cutting the HAM allowed the production of yarns that were characterized and assembled by hand weaving to produce vascular substitutes. *In vitro*, these grafts had mechanical properties (burst pressure, suture retention, transmural permeability) compatible with a clinical use, justifying the translation to arterial implantation in animals.

Keywords: Vascular tissue engineering, Human amniotic membrane, Human textiles

Bioingénierie Tissulaire (BioTis) Inserm U1026

Université de Bordeaux - 146 Rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux Cedex - France

*Un grand merci à mon chéri, à mes ami(e)s, à ma famille et à
ma belle-famille pour leur soutien constant
et leurs nombreux encouragements*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE.....	14
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1. Les vaisseaux sanguins.....	18
1.1 Organisation et fonctions	18
1.2 Structure de la paroi vasculaire.....	19
1.3 Propriétés mécaniques	20
2. Contextes médicaux pouvant nécessiter une substitution vasculaire.....	23
2.1 Athérosclérose.....	23
2.1.1 Définition.....	23
2.1.2 Mécanismes impliqués	23
2.1.3 Prévalence.....	25
2.2 Insuffisance rénale chronique en stade terminal et hémodialyse.....	25
3. Substituts vasculaires utilisés en clinique	28
3.1 Différents types.....	28
3.1.1 Autogreffes	28
3.1.2 Substituts vasculaires synthétiques permanents	29
3.1.2.1 Polytetrafluoroéthylène (PTFE)	30
3.1.2.2 Polyéthylène téréphtalate (PET).....	31
3.1.3 Autres substituts vasculaires.....	33
3.2 Choix en fonction de la situation clinique	36
3.3 Phénomènes d'échecs	37
3.3.1 Thrombose	37
3.3.2 Hyperplasie intimale.....	38
3.3.3 Infection.....	39
3.4 Taux de succès	39
4. Solutions proposées par l'ingénierie tissulaire.....	42
4.1 Concept d'ingénierie tissulaire	42
4.2 Cahier des charges d'un substitut vasculaire	43
4.3 Différentes approches en ingénierie tissulaire vasculaire.....	44
4.3.1 Utilisation d'un échafaudage exogène.....	44
4.3.1.1 Polymères synthétiques	44

4.3.1.2	Polymères biologiques.....	48
4.3.1.3	Substituts vasculaires hybrides.....	50
4.3.2	Utilisation d'un échafaudage endogène.....	51
4.3.2.1	Maturation en bioréacteur.....	51
4.3.2.2	Utilisation du corps comme bioréacteur.....	61
4.3.3	Synthèse des solutions proposées par l'ingénierie tissulaire.....	64
5.	Membrane amniotique humaine.....	67
5.1	Anatomie et histologie.....	67
5.2	Principales propriétés.....	68
5.2.1	Sur le plan biologique.....	69
5.2.1.1	Faible immunogénicité.....	69
5.2.1.2	Propriétés antimicrobiennes.....	69
5.2.1.3	Propriétés anti-inflammatoires.....	70
5.2.1.4	Réépithélialisation favorisée.....	70
5.2.1.5	Propriétés pro- et anti-angiogéniques.....	71
5.2.2	Sur le plan mécanique.....	71
5.3	Différentes possibilités de traitements.....	71
5.3.1	Préparation.....	72
5.3.2	Conservation.....	73
5.3.3	Stérilisation.....	73
5.4	Utilisation en clinique et en ingénierie tissulaire.....	74
6.	Tissage dans la production de substituts vasculaires.....	76
6.1	Définition et principes.....	76
6.2	Avantages de l'assemblage par tissage.....	77
6.3	Inconvénients de l'assemblage par tissage.....	77
6.4	Exemples de substituts vasculaires tissés.....	78
	OBJECTIFS	80
	RESULTATS	84
1.	Cartographie des propriétés mécaniques de la membrane amniotique humaine.....	85
1.1	Introduction.....	85
1.2	Article n°1.....	86
1.3	Conclusions.....	96
2.	Développement d'un substitut vasculaire produit par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine.....	98
2.1	Introduction.....	98

2.2	Projet d'article n°2	100
2.3	Conclusions.....	130
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		131
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES		136
1.	Publications	137
1.1	Issues du travail de thèse.....	137
1.2	Issues de travaux antérieurs	137
2.	Communications orales	138
2.1	Internationales.....	138
2.2	Nationales	138
3.	Communications affichées	138
3.1	Internationales.....	138
3.2	Nationales	139
BIBLIOGRAPHIE		140

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'appareil circulatoire [34].....	18
Figure 2 : Structure de la paroi artérielle [37].....	19
Figure 3 : Rôles du collagène et de l'élastine dans la variation du diamètre artériel en fonction de la pression sanguine [33]	21
Figure 4 : Développement de l'athérosclérose [48]	24
Figure 5 : Hémodialyse et fistule artério-veineuse [https://www.nephroxenia.com]	26
Figure 6 : Différentes possibilités de fistules artério-veineuses natives [8].....	29
Figure 7 : Substitut vasculaire en ePTFE [6]	30
Figure 8 : Substitut vasculaire en PET tricoté [6]	32
Figure 9 : Substitut vasculaire en PET tissé [6]	32
Figure 10 : Etapes de l'ingénierie tissulaire en système autologue [106].....	42
Figure 11 : Substitut vasculaire développé par Zilla <i>et al.</i> [113]	45
Figure 12 : Echafaudages de copolymère de PCL/PLA utilisés par Shin'oka <i>et al.</i> [119].....	46
Figure 13 : Substitut vasculaire développé par Liu <i>et al.</i> [22]	49
Figure 14 : Substitut vasculaire développé par Jockenhoevel <i>et al.</i> [23].....	50
Figure 15 : Substitut vasculaire développé par Niklason <i>et al.</i> [24]	52
Figure 16 : Substitut vasculaire développé par Tranquillo <i>et al.</i> [25].....	53
Figure 17 : Substitut vasculaire développé par L'Heureux <i>et al.</i> [166]	55
Figure 18 : Substitut vasculaire développé par McFetridge <i>et al.</i> [27].....	59
Figure 19 : Substitut vasculaire développé par Morita <i>et al.</i> [189].....	61
Figure 20 : Substitut vasculaire développé par Nakayama <i>et al.</i> [28]	63
Figure 21 : Situation anatomique de la membrane amniotique humaine [31]	67
Figure 22 : Histologie de la membrane amniotique humaine [32].....	68
Figure 23 : Traitements possibles pour la membrane amniotique humaine [220]	72
Figure 24 : Armures de tissage [33]	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de substituts vasculaires en ePTFE actuellement disponibles d'après [https://www.medicaexpo.fr]	31
Tableau 2 : Exemples de substituts vasculaires en PET actuellement disponibles d'après [https://www.medicaexpo.fr]	33
Tableau 3 : Allogreffes, greffes hybrides, xéno-greffes commercialement disponibles d'après [http://cryolife.com ; http://www.bioprotec.fr ; https://lemaitre.com ; https://artegraft.com] .	35
Tableau 4 : Perméabilité primaire des substituts vasculaires utilisés pour les pontages infra-poplités et pour les abords vasculaires	40
Tableau 5 : Cahier des charges d'un substitut vasculaire	43
Tableau 6 : Propriétés mécaniques des vaisseaux natifs [112]	44
Tableau 7 : Stratégies les plus avancées en ingénierie tissulaire vasculaire	65

LISTE DES ABBREVIATIONS

α -SMA : « alpha smooth muscle actin »

AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs

AVC : accident vasculaire cérébral

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : cellules musculaires lisses

DMSO : diméthylsulfoxyde

EGF : « Epidermal Growth Factor »

ePTFE : polytetrafluoroéthylène expansé

Fmax : force maximale

HAS : Haute Autorité de Santé

HLA : « Human Leucocyte Antigen »

IAEA : « International Atomic Energy Agency »

IL-1RA : « Interleukin-1 receptor antagonist »

IRC : insuffisance rénale chronique

KGF : « Keratinocyte Growth Factor »

LDL : « low-density lipoprotein »

MAH : membrane amniotique humaine

MCV : maladies cardio-vasculaires

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCL : « Poly -(ϵ - Caprolactone) »

PDGF : « Platelet-Derived Growth Factor »

PET : polyéthylène téréphtalate

PGA : « PolyGlycolic Acid »

PLA : « PolyLactic Acid »

PTFE : polytétrafluoroéthylène

SDS : sodium dodecyl sulfate

SLPI : « Secretory Leukocyte Protease Inhibitor »

S_{max} : allongement à la rupture

TGF- β : « Transforming Growth Factor β »

TIMP : « tissue inhibitors of metalloproteinase »

TNF α : « Tumor Necrosis Factor α »

VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »

WAP : « Whey Acidic Protein »

INTRODUCTION GENERALE

En France et dans le monde, de nombreux patients nécessitent, au cours de leurs vies, la mise en place d'une ou plusieurs thérapeutiques chirurgicales de substitution vasculaire. Les complications liées à l'athérosclérose (artériopathie oblitérante du membre inférieur et infarctus du myocarde) [1,2] ainsi que les abords vasculaires pour hémodialyse [3,4] en sont les indications principales. Dans ces deux contextes médicaux, l'utilisation de vaisseaux autologues, respectivement sous forme de pontage [5–7] et de fistule [8–10], constitue le traitement de référence. Cependant, du fait de leur faible disponibilité (utilisation lors d'une précédente intervention ou progression de la maladie) cette solution n'est pas toujours possible.

Le chirurgien doit alors avoir recours à des prothèses vasculaires. A cause de leur caractère synthétique, ces dispositifs présentent un risque élevé de thrombose [11], d'hyperplasie intimale [12] et d'infection [13] pouvant causer leur échec et cela d'autant plus que le diamètre du vaisseau est faible. Par conséquent, si les performances de ce type de greffons sont très honorables dans le cas des vaisseaux de gros diamètre [14], elles restent très insuffisantes pour les vaisseaux de petit calibre [15–18].

Afin de répondre à ce besoins clinique, de nombreux travaux de recherche ont été menés dans le but de produire des substituts vasculaires biologiques [19–28]. Bien que des résultats très prometteurs aient été obtenus par certains groupes, leurs méthodes de production sont, le plus souvent, basées sur des techniques d'ingénierie tissulaire coûteuses [24–26].

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse était de produire, à moindre coût, un substitut vasculaire de petit calibre entièrement biologique. Pour y parvenir, nous avons développé une approche innovante associant la membrane amniotique humaine (MAH) à une méthode d'assemblage basée sur le tissage. En effet, la MAH est un déchet opératoire pouvant être récupéré à l'issue de l'accouchement. Ce tissu est donc disponible en grande quantité et à moindres frais. De plus, il présente une faible immunogénicité [29] ainsi que des propriétés antimicrobiennes [30] et anti-inflammatoires [31,32] lui conférant un caractère particulièrement attractif. Par ailleurs, le tissage est une méthode d'assemblage rapide, automatisable et hautement adaptable [33].

Ce manuscrit se compose de quatre parties :

- La **première partie** consiste en une revue bibliographique. Elle décrit notamment les différentes stratégies de substitutions vasculaires, qu'il s'agisse de solutions utilisées en clinique ou de travaux de recherche menés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Une attention particulière a ensuite été portée sur la MAH et sur l'assemblage par tissage qui sont deux éléments importants de notre travail.
- La **deuxième partie** expose les objectifs de cette thèse.
- La **troisième partie** présente les résultats de ce doctorat sous la forme de publications scientifiques. Le premier article (publié) étudie de manière approfondie les propriétés mécaniques de la MAH. Dans un deuxième article (en préparation), les fils de MAH ont été caractérisés puis assemblés par tissage pour produire des substituts vasculaires biologiques dont les propriétés mécaniques ont été évaluées *in vitro*.
- Enfin, une **quatrième partie** comprend la conclusion générale de ces travaux ainsi que les différentes perspectives envisagées.

Toutes les MAHs nécessaires à la réalisation de ce travail ont été obtenues grâce à une collaboration avec la Maternité Aliénor d'Aquitaine du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux.

Ce travail a été en partie financé par la chaire de recherche senior de l'initiative d'excellence de l'Université de Bordeaux.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les vaisseaux sanguins

1.1 Organisation et fonctions

Le système cardiovasculaire se compose de deux types de circulation. (1) La circulation pulmonaire (petite circulation) permet l'oxygénation du sang et l'élimination du dioxyde de carbone par les poumons. (2) La circulation systémique (grande circulation) apporte le sang oxygéné et les nutriments aux organes et ramène le sang riche en dioxyde de carbone et en déchets métaboliques vers le cœur. L'appareil circulatoire comprend plusieurs types de vaisseaux sanguins connectés en série : les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines (*figure 1*).

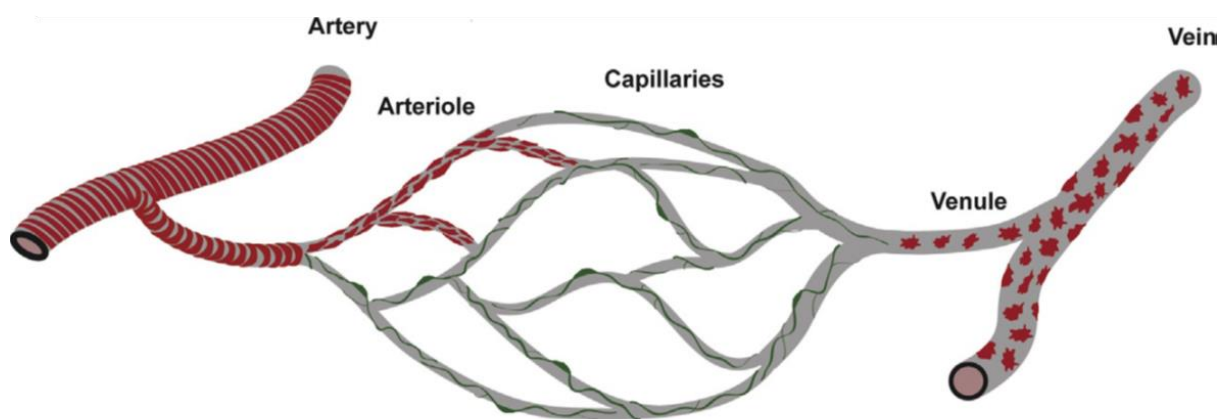


Figure 1 : Structure de l'appareil circulatoire [34]

La contraction du cœur éjecte le sang des ventricules vers les artères de gros diamètres. Le sang se déplace ensuite dans des artères de plus en plus fines, jusqu'aux artérioles, qui alimentent les capillaires, lieu d'échanges gazeux et métaboliques entre le sang et les tissus. Le sang contenu dans les capillaires est alors collecté dans les veinules, transporté dans les veines, et finalement retourné au cœur [34–36].

1.2 Structure de la paroi vasculaire

La paroi des vaisseaux sains se compose de trois couches ou tuniques centrées sur la lumière vasculaire. De l'intérieur vers l'extérieur, on distingue : l'intima, la media et l'adventice. Dans le cas des artères, ces couches sont séparées par la limitante élastique interne pour l'intima et la media et par la limitante élastique externe pour la media et l'adventice [34,37–40] (figure 2).

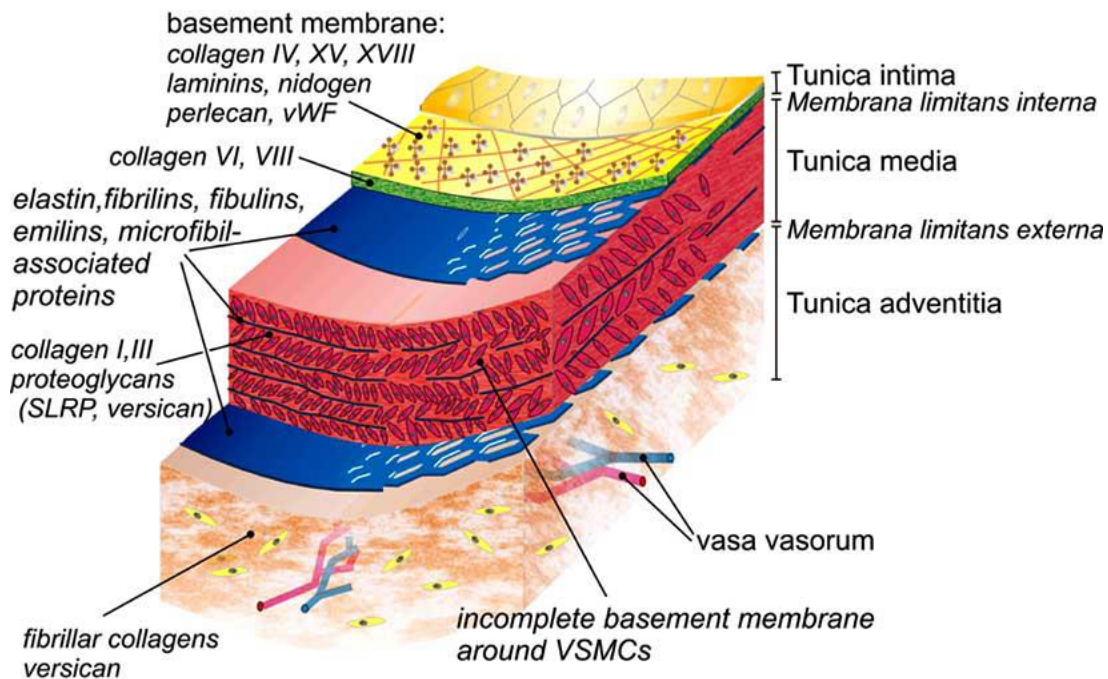


Figure 2 : Structure de la paroi artérielle [37]

L'intima comprend une monocouche de cellules endothéliales (en jaune, aspect pavimenteux). Les principaux types cellulaires composant la media et l'adventice sont respectivement les cellules musculaires lisses (en rouge) et les fibroblastes (en jaune, aspect fusiforme).

La couche en contact avec le flux sanguin, l'**intima**, comprend une monocouche de cellules endothéliales. Cet endothélium joue un rôle important dans la régulation de l'hémostase, de l'inflammation, de la vasorégulation et de l'angiogenèse. Dans le cas des vaisseaux de diamètre supérieur à 1 millimètre, l'endothélium est soutenu par une couche sous-endothéliale composée d'un tissu conjonctif lâche constitué de fibres de collagène VI et VIII hautement dispersées [34,37,39–41].

La couche intermédiaire, la **media**, comporte plusieurs couches concentriques de cellules musculaires lisses (CML) entourées de matrice extracellulaire riche en collagène I et en élastine. Les fibres de collagène et d'élastine sont agencées circonférentiellement. Cette organisation structurelle permet le maintien de la pression sanguine grâce à la vasoconstriction et à la vasodilatation du vaisseau [34,37,39,40].

La couche la plus externe, l'**adventice** est un tissu conjonctif fibro-élastique ancrant le vaisseau aux structures environnantes. Les fibroblastes sont entourés de fibres de collagène regroupées sous forme de faisceaux ondulés majoritairement alignés dans le sens axial. L'adventice des vaisseaux de gros diamètres contient également des fibres nerveuses et des vaisseaux appelés *vasa vasorum* (littéralement « vaisseaux des vaisseaux ») permettant la vascularisation de la partie externe de la paroi vasculaire, la partie interne étant nourrie par contact direct avec le sang circulant dans la lumière [34,37–40].

Il existe des **variations histologiques** entre les différents types de vaisseaux sanguins ce qui leur confère des fonctions spécifiques [34,37].

- Les artères élastiques situées à proximité du cœur ont une matrice extracellulaire riche en élastine ce qui leur permet de résister à un flux sanguin hautement pulsatile. Les artères musculaires qui assurent la distribution du sang aux différents organes, présentent une media riche en collagène leur conférant une importante résistance à l'étirement.
- Les capillaires sont uniquement constitués d'une couche de cellules endothéliales partiellement recouverte de péricytes. Cette structure favorise les échanges entre le sang et les tissus.
- Les veines sont équipées de valvules imposant au sang un sens de circulation unique et empêchant le reflux.
- En comparaison avec des artères de même diamètre, la media des veines est plus fine et l'adventice plus épaisse.

1.3 Propriétés mécaniques

Le cœur pompe le sang oxygéné et le distribue aux organes périphériques par l'intermédiaire des artères qui sont des tissus partiellement déformables. L'élastine et le collagène sont principalement responsables de leurs propriétés mécaniques.

Le comportement contrainte-déformation non linéaire de ces vaisseaux sanguins s'explique par les différences de module d'élasticité de l'élastine (0,6 – 1 MPa) et du collagène (1 GPa). L'association de ces deux molécules permet la stabilité des artères malgré les variations de la pression sanguine (*figure 3*) [33].

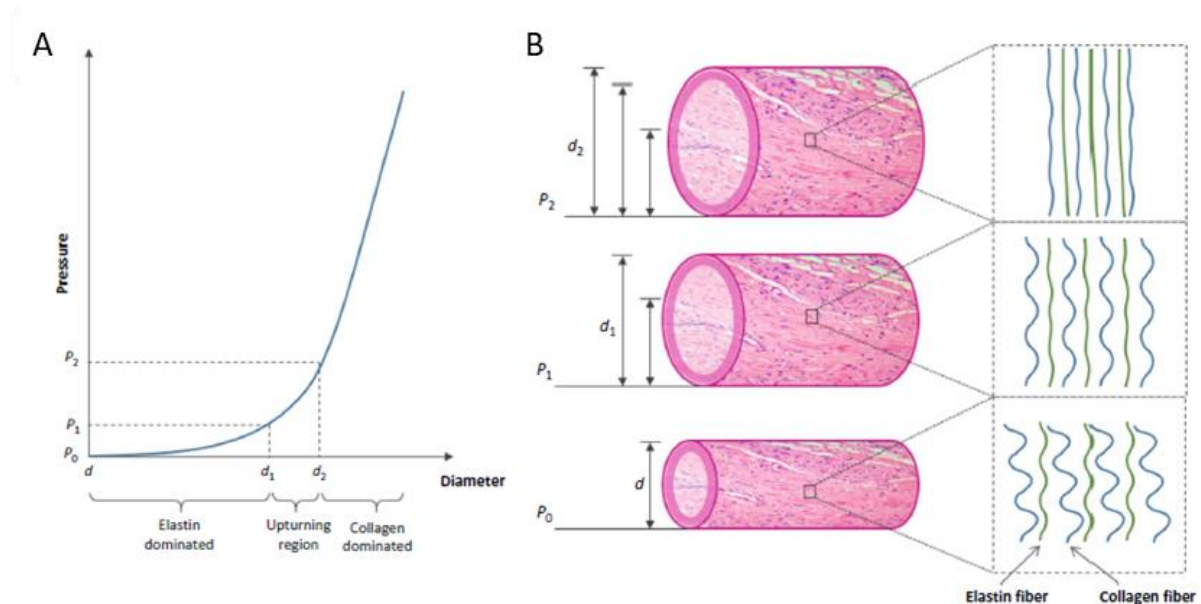


Figure 3 : Rôles du collagène et de l'élastine dans la variation du diamètre artériel en fonction de la pression sanguine [33]

A- Représentation graphique B-Représentation schématique

A basse pression, l'élasticité est essentiellement due aux fibres d'élastine. Lorsque la pression sanguine augmente (jusqu'à 80 mmHg, valeur physiologique de la pression artérielle diastolique), les fibres d'élastine et les fibres de collagène s'alignent progressivement jusqu'à ce que les fibres d'élastine soient complètement droites. Quand l'augmentation de la pression se poursuit (jusqu'à 120 mmHg, valeur physiologique de la pression artérielle systolique), les fibres d'élastine sont étirées et les fibres de collagène sont alignées. Au-delà de cette valeur, le collagène est seul responsable des propriétés mécaniques du vaisseau [33].

Par ailleurs, dans les artères et les veines, l'écoulement sanguin génère des contraintes de cisaillement à la surface des cellules endothéliales. Ces forces de friction influencent le comportement cellulaire. Physiologiquement, le flux sanguin est laminaire ce qui entraîne d'importantes contraintes de cisaillement favorisant la survie, la quiescence, l'alignement des cellules endothéliales ainsi que la sécrétion de substances vasodilatatrices.

Au contraire, l'apparition de turbulences dans le flux sanguin, au niveau des anastomoses de pontage par exemple ; engendre une diminution de ces contraintes [42,43]. L'effet de ce phénomène sur le phénotype endothélial est détaillé dans le paragraphe 3.3.2 *Hyperplasie intinale*.

Ainsi, les vaisseaux sanguins ont une structure très organisée et complexe. Par exemple, la matrice extracellulaire qui les compose maintient la paroi vasculaire en forme et supporte des forces mécaniques importantes exercées en permanence sur le vaisseau par la pression sanguine.

2. Contextes médicaux pouvant nécessiter une substitution vasculaire

Deux types de pathologies peuvent atteindre les vaisseaux sanguins : celles liées à un rétrécissement de la lumière et celles liées à une dilatation anormale des parois. Parmi les pathologies obstructives, l'athérosclérose, maladie responsable de la plupart des greffes vasculaires, sera traitée dans ce chapitre. La thrombose et l'hyperplasie intimale constituent également des causes d'échecs des substituts vasculaires et sont développées dans le paragraphe *3.3 Phénomènes d'échecs*. Par ailleurs, chez un patient insuffisant rénal, la mise en place d'un substitut vasculaire permet de relier une artère à une veine et de réaliser une voie d'abord pour l'hémodialyse. Ce contexte médical est donc également décrit dans ce chapitre.

2.1 Athérosclérose

2.1.1 Définition

En 1958, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'athérosclérose comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media » [44]. Bien que cette définition soit toujours d'actualité, l'athérosclérose est aujourd'hui reconnue comme une maladie inflammatoire chronique et systémique impliquant le système immunitaire et affectant aussi les artères de petit diamètre [45–47].

2.1.2 Mécanismes impliqués

L'athérosclérose est un processus complexe, multifactoriel, résultant des interactions entre la paroi artérielle et son environnement.

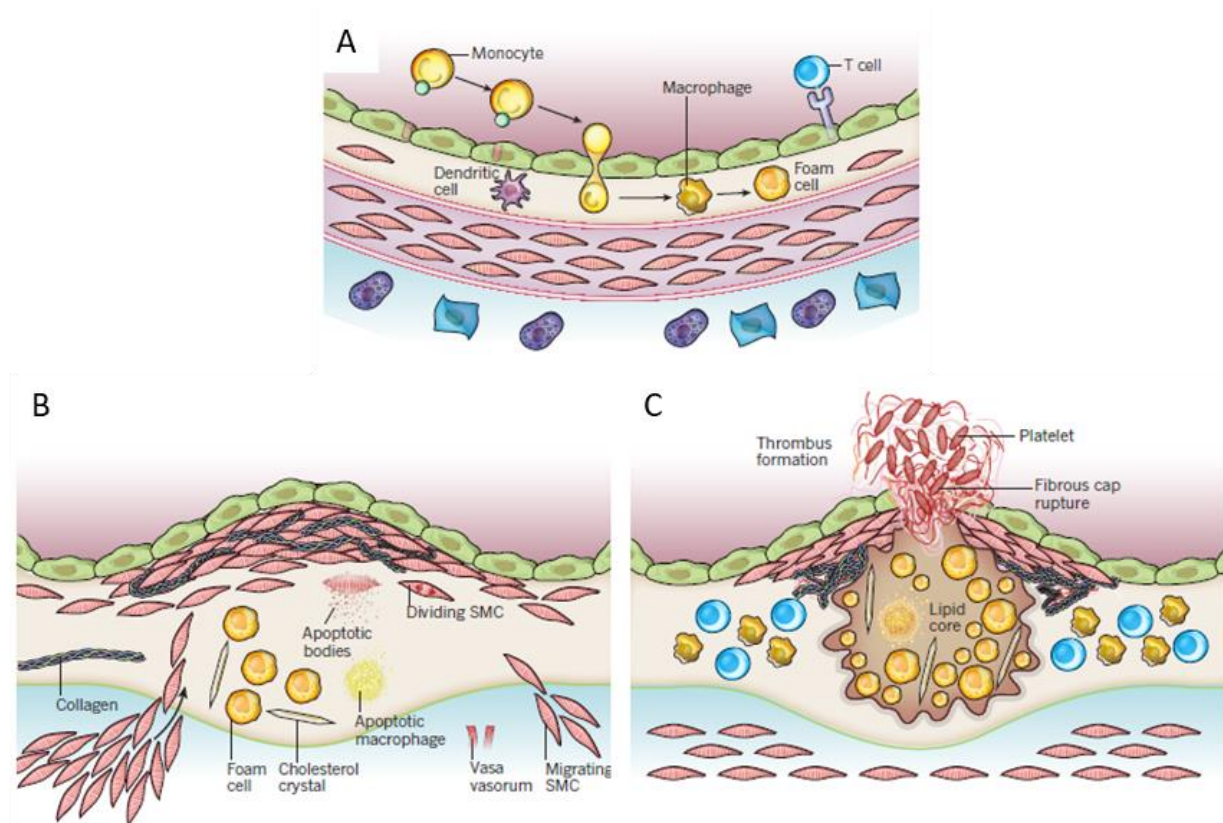


Figure 4 : Développement de l'athérosclérose [48]

A- Pénétration des monocytes circulants dans l'intima B- Migration des CML de la media vers l'intima C-Rupture de la chape fibreuse de la lésion athéromateuse

Lorsqu'elle est associée à une altération locale des fonctions protectrices de l'endothélium, une concentration sanguine excessive en lipoprotéines de basse densité (*low-density lipoprotein* (LDL)) entraîne la pénétration et l'accumulation de ces molécules dans l'intima. L'oxydation des lipoprotéines active ensuite les cellules endothéliales qui expriment des molécules d'adhésion à leur surface. Cette activation entraîne alors l'adhésion des monocytes circulants qui pénètrent dans l'intima où ils se différencient en macrophages puis en cellules spumeuses captant les LDL-oxydés (*figure 4a*). Les macrophages et les lymphocytes infiltrant la lésion athéromateuse, entretiennent une réaction inflammatoire chronique. Parallèlement, les CML migrent de la media vers l'intima où elles prolifèrent et sécrètent du collagène, des fibres élastiques et des protéoglycanes pour former une chape fibreuse qui recouvre le centre nécrotique de la lésion provenant de la dégénérescence des cellules spumeuses (*figures 4b*). L'entretien de ce phénomène aboutit à une diminution du diamètre interne du vaisseau bloquant partiellement la circulation sanguine (sténose). Par ailleurs, la chape fibreuse de la lésion peut se rompre.

Les protéines pro-coagulantes du corps nécrotique réagissent alors avec la prothrombine sanguine pour former un caillot sanguin et donc une thrombose (*figure 4c*) [48,49]. Ce processus, qui est la principale complication de l'athérosclérose, constitue également une des causes d'échec des substituts vasculaires. Il est décrit dans le paragraphe 3.3.1 *Thrombose*.

2.1.3 *Prévalence*

L'athérosclérose pouvant rester asymptomatique pendant de nombreuses années, sa prévalence est souvent sous-estimée. Néanmoins, cette pathologie est impliquée dans de nombreuses maladies cardio-vasculaires (MCV) dont les manifestations cliniques vont dépendre de la localisation du blocage. Les MCV les plus fréquentes sont l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI), l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral (AVC). Elles correspondent respectivement à l'atteinte des artères des membres inférieurs, des artères coronariennes et des artères cérébrales. Aux Etats-Unis, 8,5 millions d'AOMI, 1,5 million d'infarctus du myocarde et 795 000 AVC surviennent par an. D'après la fédération française de cardiologie, 800 000 AOMI, 150 000 AVC et 120 000 infarctus se produisent chaque année en France. Ces trente dernières années, la prévention des facteurs de risque et les progrès des thérapeutiques ont permis de diminuer partiellement la prévalence des complications de l'athérosclérose. Cependant, du fait de la fréquence et de la gravité des pathologies qu'elle est susceptible d'entraîner, l'athérosclérose constitue toujours un réel enjeu de santé publique [1,2].

2.2 *Insuffisance rénale chronique en stade terminal et hémodialyse*

D'après la Haute Autorité de Santé (HAS), l'insuffisance rénale chronique (IRC) est « une maladie durant laquelle la fonction des reins se détériore progressivement et qui peut évoluer vers un stade terminal nécessitant la mise en place d'un traitement de suppléance par dialyse ou transplantation rénale » [50]. Bien que la transplantation rénale soit le traitement de référence de l'IRC en stade terminal ; en 2017, en France, seul 20 % des candidats ont pu en bénéficier par manque de greffons disponibles [3].

Afin de suppléer la fonction d'épuration rénale, la dialyse péritonéale ou l'hémodialyse sont les seules autres options pour un patient en IRC. La dialyse péritonéale utilise le péritoine du patient comme membrane filtrante [51].

Cependant du fait de ses nombreuses contre-indications et de la diminution des capacités de filtration du péritoine avec le temps ; cette technique représente respectivement 9 % et 6 % des dialyses réalisées aux Etats-Unis et en France [3,4]. L'IRC en stade terminal est donc fréquemment traitée par hémodialyse. Environ 426 000 patients américains et 46 000 patients français bénéficient de cette thérapeutique chaque année [3,4]. L'hémodialyse consiste à dériver le sang du patient pour qu'il soit filtré dans un dispositif médical (dialyseur) afin d'éliminer les déchets. Cette dérivation est faite à l'aide d'aiguilles de diamètres importants (environ 1,6 mm) : l'une amène le sang vers le dialyseur et l'autre restitue le sang filtré au corps du patient (figure 5).

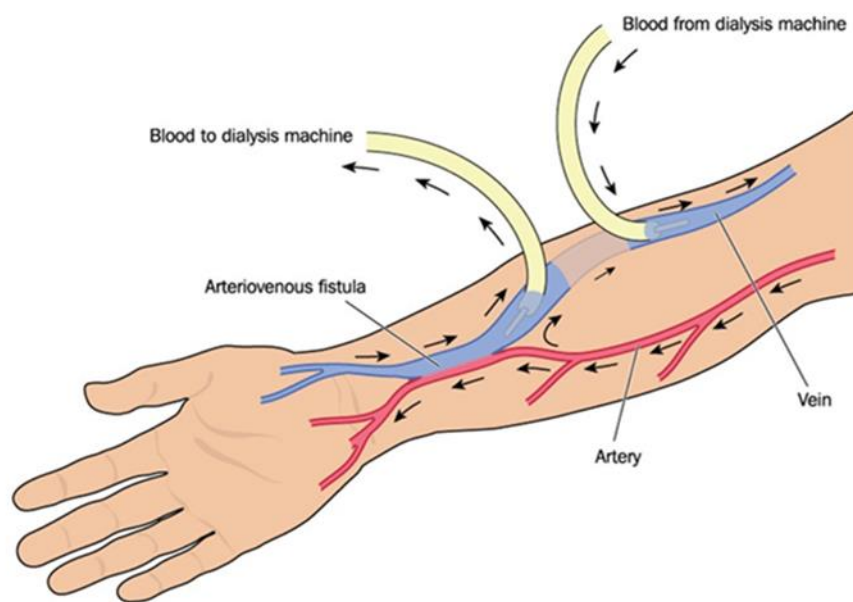


Figure 5 : Hémodialyse et fistule artério-veineuse [<https://www.nephroxenia.com>]

Pour obtenir un débit sanguin suffisant (0,6 - 1 l/min) et donc diminuer le temps de dialyse, un abord vasculaire, par cathéter ou par fistule, est nécessaire. En situation d'urgence, l'abord par cathéter est indiqué en raison de sa possibilité d'utilisation immédiate. Lorsque l'hémodialyse peut être différée, la fistule artério-veineuse est recommandée. En effet, par rapport au cathéter, elle présente une plus grande longévité et un risque d'infection moindre mais nécessite un temps de maturation d'environ 6 semaines. La fistule artério-veineuse consiste en la connexion chirurgicale directe (fistule native) ou indirecte (interposition d'un substitut vasculaire) d'une artère et d'une veine. La veine alors soumise à une haute pression, « s'artérialise ».

Elle se dilate et sa paroi s'épaissit (maturation de la fistule) permettant ainsi une ponction aisée et répétée avec des débits sanguins élevés. Cependant, les séances de dialyse sont réalisées trois fois par semaine et durent environ 4 heures ce qui impacte considérablement la qualité de vie du patient [52,53].

Les complications liées à l'athérosclérose (artériopathie oblitérante du membre inférieur et infarctus du myocarde) ainsi que les abords vasculaires pour hémodialyse constituent les principales indications d'utilisation d'un greffon vasculaire. Ces situations cliniques concernent un grand nombre de patients en France et dans le monde.

3. Substituts vasculaires utilisés en clinique

Selon le contexte médical, différentes stratégies de substitution vasculaire peuvent être proposées. Actuellement, l'utilisation des vaisseaux du patient (autogreffe) et le recours à des substituts vasculaires synthétiques sont les solutions les plus utilisées en clinique. Ce chapitre décrit les principaux substituts vasculaires disponibles, leurs indications, leurs principales causes d'échecs ainsi que leurs taux de succès.

3.1 Différents types

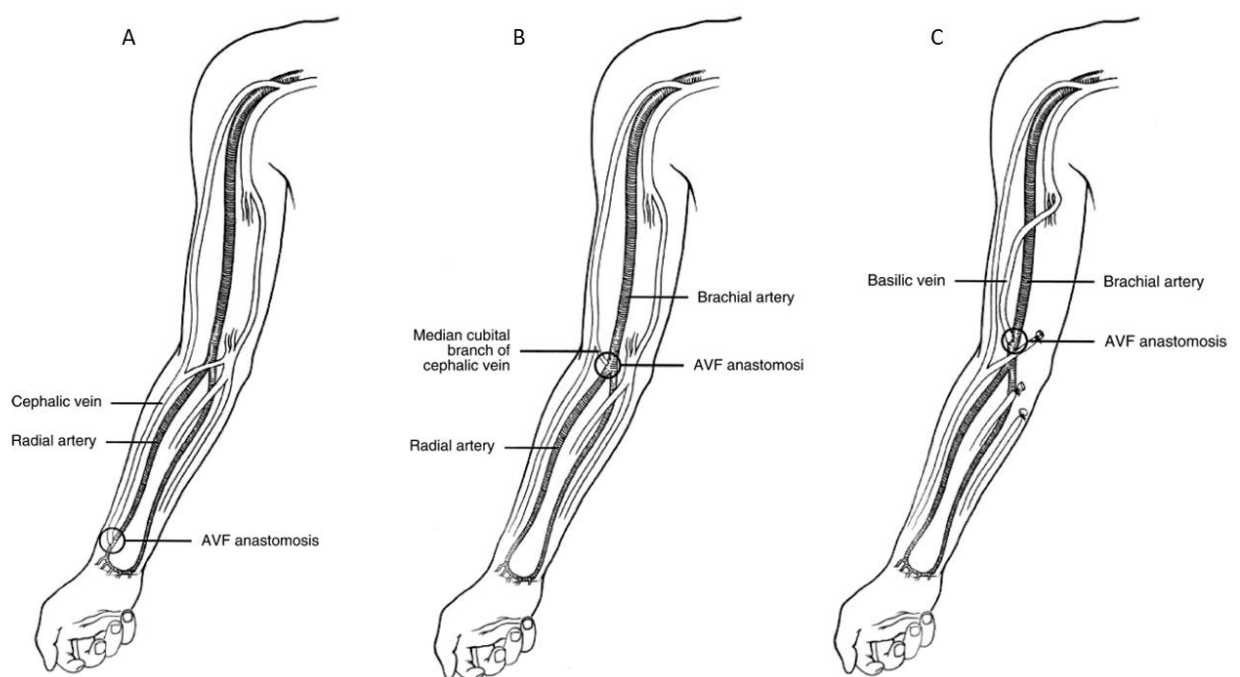
3.1.1 Autogreffes

L'autogreffe est considérée comme la technique de référence garantissant une parfaite biosécurité pour le patient. Elle présente cependant certains inconvénients comme la morbidité au niveau du site donneur et la quantité limitée de vaisseaux disponibles à cause d'une éventuelle atteinte par une maladie systémique ou d'une utilisation lors d'une précédente intervention. Deux types de vaisseaux peuvent être utilisés : les artères et les veines. Dans les deux cas, le prélèvement du greffon doit être le plus atraumatique possible.

Grâce à ses capacités de cicatrisation, à sa résistance aux infections, et à ses caractéristiques mécaniques, l'**autogreffe artérielle** constitue le substitut idéal. Cependant, son utilisation est limitée par le nombre réduit de sites de prélèvement. L'artère thoracique interne (ou mammaire interne) et l'artère radiale sont les plus employées dans le cas des pontages coronariens [5,6,54].

Malgré des propriétés mécaniques plus faibles, l'**autogreffe veineuse** reste la stratégie de remplacement vasculaire périphérique privilégiée. Avant anastomose du greffon, l'effet de ses valvules doit être supprimé. Le greffon peut être inversé ou ses valvules peuvent être éliminées par voie endovasculaire. En raison de sa disponibilité et de sa localisation superficielle, la veine saphène est le substitut le plus utilisé pour les pontages périphériques de petit diamètre [6,7,55].

La **fistule artério-veineuse native**, décrite dans le paragraphe 2.2 *Insuffisance rénale chronique en stade terminal et hémodialyse*, constitue un cas particulier. Elle consiste en la connexion chirurgicale directe entre une artère et une veine. Cette anastomose est le plus souvent réalisée au niveau du membre supérieur et de préférence du côté non dominant. Chaque membre supérieur présente trois sites potentiels : la fistule radio-céphalique dans l'avant-bras et les fistules brachio-céphalique et brachio-basilique dans le bras (*figure 6*). Une fistule peut être réalisée dans chaque avant-bras et dans chaque bras. Le choix est fonction de l'examen écho-doppler pré-opératoire qui permet de vérifier la perméabilité des différents vaisseaux et de mettre en évidence d'éventuelles variations anatomiques [8–10].



*Figure 6 : Différentes possibilités de fistules artério-veineuses natives [8]
A- Fistule radio-céphalique B- Fistule brachio-céphalique C- Fistule brachio-basilique*

3.1.2 *Substituts vasculaires synthétiques permanents*

Afin de pallier la faible disponibilité des autogreffes, les substituts vasculaires synthétiques permanents ont été développés. Les prothèses vasculaires synthétiques en polytétrafluoroéthylène (PTFE ou Teflon®) et en polyéthylène téréphtalate (PET, ou Dacron®) constituent aujourd'hui les matériaux de choix pour les chirurgiens vasculaires. Cependant, leur inconvénient majeur est lié à la présence d'un matériel étranger et donc à des risques de réaction inflammatoire et/ou d'infection [6,56].

3.1.2.1 Polytetrafluoroéthylène (PTFE)

Les prothèses en textile de PTFE ont très vite été remplacées par celles en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE). L'ePTFE est un polymère thermoplastique possédant une grande inertie chimique. Ce matériau semi-cristallin présente un faible coefficient de frottement et reste stable à des températures élevées. Ainsi, sa mise en forme par extrusion et puis étirement permet d'obtenir des structures tubulaires microporeuses (*figure 7*) [6,33].

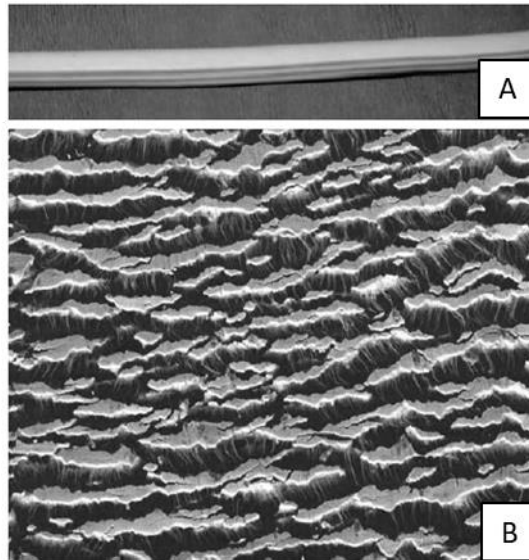


Figure 7 : Substitut vasculaire en ePTFE [6]

A- Vue macroscopique B- Microscopie électronique à balayage de la surface luminale

Actuellement, différents modèles de substituts vasculaires en ePTFE existent sur le marché [6,56,57]. Leurs caractéristiques, leurs avantages ainsi que des exemples de produits commercialement disponibles figurent dans le *tableau 1*.

Caractéristiques	Avantages	Noms commerciaux
Forme (droite ou bifurquée)	Forme bifurquée pour pontage aorto-bifémoral	Cobrahood® Gore tex® Vascular Graft
Épaisseur des parois (standard, fine et ultra fine)	Meilleure adaptation aux vaisseaux du patient	Vascugraft® Neo Maxiflow®
Extrémités évasées	↗ de la surface anastomotique	Cobrahood®
Dispositif favorisant l'élasticité	↘ de la tension au niveau des anastomoses	Gore tex® Strech Vascular Graft
Enveloppe externe de PTFE	↗ de la résistance à la suture ↗ de la résistance à l'éclatement	Flowline Bipore® Vascugraft® Neo Vascugraft® Soft
Renfort externe hélicoïdal	↘ du risque de compression ↘ du risque de vrillement	Flowline Bipore® Gore tex® Vascular Graft Vascugraft® Neo
Recouvrement luminal avec de l'héparine	↘ du risque de thrombose	Flowline Bipore® Propaten® Vascugraft® Flow
Imprégnation d'antibiotiques	↘ du risque d'infection	Seal PTFE®

Tableau 1 : Exemples de substituts vasculaires en ePTFE actuellement disponibles d'après [<https://www.medicalexpo.fr>]

3.1.2.2 Polyéthylène téréphtalate (PET)

Le PET est un polyester thermoplastique dont l'extrusion permet l'obtention de fibres synthétiques. Ces fibres sont ensuite regroupées en multifilaments qui seront assemblés par tricotage ou par ou tissage pour produire un substitut vasculaire (*figures 8 et 9*). Ces méthodes d'assemblage ont considérablement évolué avec le temps. Par exemple, pour le tricotage, le recours à des techniques de tricot de chaîne et l'incorporation de fibres texturées ont respectivement permis d'améliorer les propriétés mécaniques et d'obtenir un effet velours externe favorisant l'ancrage tissulaire [6,33] Les différents principes de l'assemblage par tissage sont abordés dans le paragraphe 6.1 *Définition et principes*.

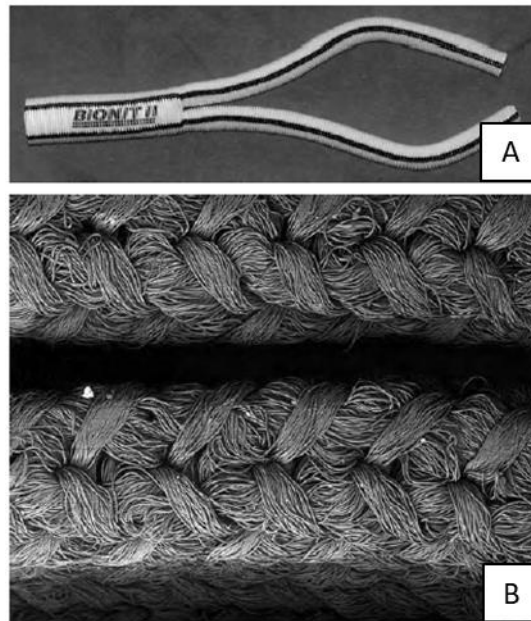


Figure 8 : Substitut vasculaire en PET tricoté [6]

A- Vue macroscopique B- Microscopie électronique à balayage de la surface luminale

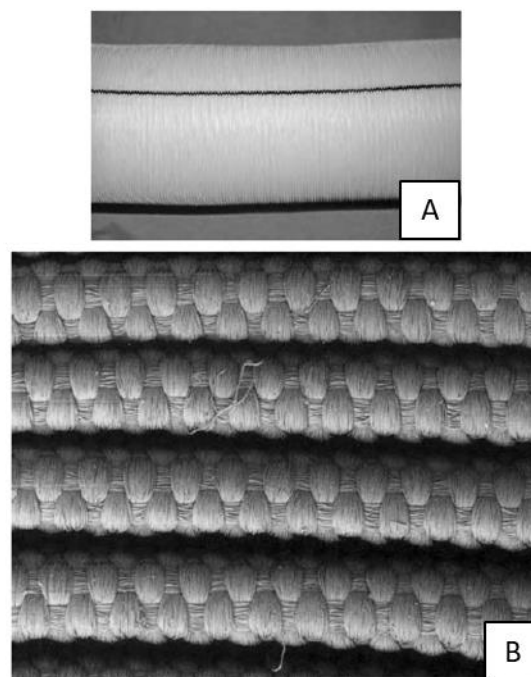


Figure 9 : Substitut vasculaire en PET tissé [6]

A- Vue macroscopique B- Microscopie électronique à balayage de la surface luminale

Actuellement, différents modèles de substituts vasculaires en PET existent sur le marché. Leurs caractéristiques, leurs avantages ainsi que des exemples de produits commercialement disponibles figurent dans le *tableau 2*.

Caractéristiques	Avantages	Noms commerciaux
Forme (droite ou bifurquée)	Forme bifurquée pour pontage aorto-bifémoral	Albograft® Polythèse®
Possibilité de plusieurs branchements	Meilleure adaptation anatomique	Flow weave plus®
Imprégnation de gélatine bovine	↘ de la perméabilité transmurale	Gelsoft® Silvergraft® Unigraft®
Imprégnation de collagène bovin		Albograft®
Imprégnation d'héparine	↘ du risque de thrombose	Gelsoft®
Imprégnation d'antibiotiques	↘ du risque d'infection	Gelsoft®
Recouvrement d'argent		Silvergraft®

Tableau 2 : Exemples de substituts vasculaires en PET actuellement disponibles d'après [<https://www.medicalexpo.fr>]

3.1.3 Autres substituts vasculaires

Pour surmonter le risque infectieux des substituts vasculaires synthétiques permanents, d'autres stratégies de substitutions vasculaires (comme les allogreffes, les prothèses biosynthétiques (ou hybrides) et les xéno-greffes) ont vu le jour. Malgré la bonne disponibilité de ces greffons, les inconvénients de ces méthodes sont les risques de transmission virale, d'infections bactériennes, et de rejet en dépit du traitement des greffons. La fixation (dénaturation/réticulation chimique), la décellularisation (extraction chimique et/ou mécanique) et la cryopréservation sont les procédures les plus utilisées pour réduire l'immunogénicité de ces substituts.

Les allogreffes consistent en la transplantation vasculaire d'un donneur humain vers le patient. Les veines sont prélevées sur cadavres ou sur donneurs vivants lors de chirurgie des varices. Dans les années 1970, le premier substitut vasculaire allogénique est produit par Dardik grâce à la fixation à la glutaraldéhyde de la veine ombilicale humaine [58]. Pour réduire la thrombogénicité et augmenter les propriétés mécaniques de ce greffon, des traitements de surface à l'héparine et le recours à un treillis extérieur en polyester ont été proposés [59,60]. Cependant sa principale limite reste la dégradation importante après implantation [61]. Actuellement la Dardik biograft® n'est plus commercialisée [62]. Aujourd'hui, différents produits dont Cryovein®/Cryoartery® (Cryolife®) et l'allogreffe Bioprotec® sont commercialisés. Leurs caractéristiques sont présentées dans le *tableau 3*.

Les **greffes hybrides (ou biosynthétiques)** sont produites à partir d'une prothèse synthétique dont le recouvrement par un tissu collagénique est obtenu grâce à une implantation sous cutanée préalable à la greffe vasculaire. Ce concept a été développé par Sparks à la fin des années 1960. A l'époque, un tube en silicone entouré d'un treillis de polyester est implanté sous la peau du patient pendant 2 mois. A l'explantation, le tube en silicone est retiré et le substitut est récupéré et greffé en position vasculaire [63]. Bien que cette méthode de production de vaisseaux autologues soit particulièrement astucieuse, les phénomènes de thrombose et de dilatation ont entraîné le retrait du marché de ces greffons [64,65]. Néanmoins, l'idée de Sparks a été reprise et appliquée dans un contexte xénogénique (implantation sous cutanée du treillis de polyester chez l'ovine). Cette prothèse est actuellement commercialisée sous le nom d'OmniFlow® II. Ses caractéristiques figurent dans le *tableau 3*. Ce principe a été repris par l'équipe de Campbell au début des années 2000 [66] et plus récemment par celles de Rotmans [67] et de Nakayama [28]. Les travaux de recherche de ces deux derniers groupes sont décrits dans le paragraphe 4.3.2.2 *Utilisation du corps comme bioréacteur*.

Enfin, les **xénogreffes** (transplantation vasculaire de l'animal vers le patient) peuvent être envisagées lorsque les tissus sont chimiquement dénaturés pour éviter le rejet. Néanmoins cette technique présente des résultats variables. En effet certaines publications rapportent une efficacité comparable à celles de substituts vasculaires synthétiques permanents pour les pontages de petit diamètre et les fistules artério-veineuses [68–71]. Cependant, d'autres articles mettent en évidence l'importante thrombogénicité et la faible colonisation par les cellules hôte des xénogreffons [72–74]. Ainsi, à ce jour, les autorités de santé nationales et internationales n'ont pas publié de recommandations concernant le recours à cette solution en clinique [75–77]. Néanmoins certains produits, dont les plus connus sont ProCol® et Artegraft® existent et sont disponibles commercialement. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le *tableau 3*.

Type de greffe	Nom commercial	Composition	Traitement	Stockage	Diamètre interne	Longueur
Allogreffe	Cryovein®	Veine saphène humaine	Cryopréservation (nitrogène)	minimum à -135°C	3 - 6 mm	20 - 80 cm
		Veine fémorale humaine			6 - 15 mm	10 - 30 cm
	Cryoartery®	Artère fémorale humaine			4 - 5 mm	10 - 30 cm
		Artère aorto iliaque humaine			Aorte : 8 - 15 mm Iliaque : 4 - 5 mm	Aorte : 6 - 11 cm Iliaque : 4 - 11 cm
Bioprotec®	Veine saphène humaine	Cryoconservation (liquide Bioprotec®)	entre +2°C et +8°C	3,5 - 12 mm	20 - 50 cm	
Greffe hydride	Omniflow® II	Treillis de polyester implanté en sous cutané chez l'ovine	Fixation - Stérilisation (glutaraldéhyde)	T° amb	5, 6, 7, 8 mm	20 - 65 cm
Xéno greffe	ProCol®	Veine mésentérique bovine	Fixation (glutaraldéhyde) Stérilisation (rayons γ)	T° amb	6 mm	10 à 40 cm
	Artegraft®	Artère carotide bovine	Décellularisation (ficine) Fixation - Stérilisation (dialdéhyde)	T° amb	4, 5, 6, 7, 8 mm	15 à 50 cm

Tableau 3 : Allogreffes, greffes hybrides, xéno greffes commercialement disponibles d'après [<http://cryolife.com> ; <http://www.bioprotec.fr> ; <https://lemaitre.com> ; <https://artegraft.com>]

3.2 Choix en fonction de la situation clinique

Hors contexte d'urgence médicale, les **complications de l'athérosclérose** sont dans un premier temps traitées par la suppression des facteurs de risque (alimentation grasse, tabagisme, consommation d'alcool, inactivité physique) associée à un traitement médicamenteux hypocholestérolémiant et/ou hypotenseur. Si ces mesures sont insuffisantes, des solutions de revascularisation doivent être envisagées. Ces techniques regroupent l'angioplastie avec ou sans pose d'endoprothèse et le pontage chirurgical permettant de contourner le blocage grâce à un substitut vasculaire. Le choix entre ces deux méthodes est fonction de facteurs anatomiques (longueur de la sténose, nombre d'occlusions) et cliniques (bénéfice/risque de l'intervention, type de pathologie). Par exemple, pour le traitement des infarctus du myocarde, l'angioplastie avec pose d'endoprothèse est privilégiée.

Concernant les pontages chirurgicaux, le choix du type de substituts est grandement déterminé par le calibre du vaisseau défaillant. Pour les remplacements de **vaisseaux de gros diamètre (\geq à 6 mm)**, il n'existe le plus souvent pas de greffon autologue adapté. Ainsi le recours des substituts vasculaires synthétiques permanents en PET est recommandé. Cependant, pour des **vaisseaux de diamètre moyen (légèrement supérieur à 6 mm)**, deux méta-analyses ont démontré la supériorité de la veine saphène autologue par rapports aux dispositifs synthétiques [78,79]. Pour les **vaisseaux de petit diamètre (\leq à 6 mm)**, il est admis que la veine saphène autologue reste le matériau de choix pour les pontages périphériques. L'utilisation de substituts vasculaires synthétiques permanents est indiquée en l'absence d'autogreffe disponible. Les données de la littérature confirment l'absence de supériorité d'un type de substituts vasculaires synthétiques permanents (ePTFE ou PET) par rapport à un autre. Enfin, pour les **vaisseaux de très petit diamètre (\leq à 3 mm)**, les substituts vasculaires synthétiques permanents ne sont pas utilisés en raison de leurs faibles performances. Par exemple, dans le cas des pontages coronariens, les autogreffes artérielles et veineuses sont proposées lorsque l'angioplastie avec pose d'endoprothèse ne peut pas être réalisée [80,81].

Lors de la **création d'un abord vasculaire**, la fistule artério-veineuse native doit être préférée par rapport aux dispositifs synthétiques en ePTFE qui seront proposés en seconde intention. A cause de leur mauvaise résistance à la ponction, l'utilisation de substituts vasculaires synthétiques permanents en PET est proscrite [75,77].

Enfin dans les deux contextes médicaux décrits précédemment, les allogreffes et les greffes hybrides ne sont indiquées qu'en cas de reconstruction en terrain infecté ou de risque élevé d'exposition du greffon [75–77].

3.3 Phénomènes d'échecs

Même lorsque les indications décrites ci-dessus sont respectées, les succès du pontage chirurgical et de l'abord vasculaire restent un défi. En effet, dès son implantation, le dispositif de substitution vasculaire et ses anastomoses sont exposés à trois risques principaux pouvant conduire à des échecs : la thrombose, l'hyperplasie intimale et l'infection. La probabilité de ces échecs varie en fonction du type de substituts vasculaires et de la situation clinique.

3.3.1 Thrombose

La thrombose est définie par la formation d'un caillot sanguin dans la lumière du substitut vasculaire. Ce phénomène peut entraîner un blocage de la circulation sanguine par obstruction totale du substitut ou par migration du caillot dans des vaisseaux de calibre inférieur (embolie). La formation de ce caillot sanguin se produit lorsque les phénomènes d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaire sont suivis par l'activation de la cascade de la coagulation. Bien que les événements thrombotiques surviennent principalement à court terme, des complications à long terme peuvent également se produire [11].

Par exemple, lors de l'implantation d'un substitut vasculaire synthétique permanent, les protéines plasmatiques (dont le fibrinogène) s'adsorbent dès que la surface luminale du substitut est mise au contact du sang. Les plaquettes circulantes se lient aux protéines adsorbées via des récepteurs membranaires spécifiques. Les plaquettes adhérentes sont ensuite activées et s'agrègent. Parallèlement, le fibrinogène adsorbé est remplacé par le kininogène de haut poids moléculaire (effet Vroman). Le facteur XII dont l'action est ainsi amplifiée, active la voie intrinsèque de la coagulation ce qui aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine qui forme une couche sur la surface du greffon. Si cette réaction se poursuit, on observera la formation d'un caillot sanguin composé de fibrine, de plaquettes et d'une quantité variable de globules rouges [82,83]. Les phénomènes de thrombose tardives s'expliquent principalement par l'absence de régénération de l'endothélium au niveau de la lumière des substituts vasculaires synthétiques permanents [84].

En effet, à l'état physiologique, l'endothélium possède des propriétés antiadhésives (charge négative du glycocalyx), antiagrégantes (production d'oxyde nitrique) et anticoagulantes (présence d'héparine dans le glycocalyx, expression de la thrombomoduline membranaire) permettant de lutter contre la thrombose [85].

Afin de limiter ces phénomènes de thrombose, l'imprégnation d'héparine des substituts vasculaires en ePTFE a été proposée. Cette stratégie est efficace pour les pontages des membres inférieurs. En effet, l'étude de Samson *et al.*, réalisée sur 252 pontages fémoro-poplités, montre que la perméabilité primaire à 5 ans des substituts vasculaires en ePTFE imprégnés d'héparine (74 %) est significativement supérieure à celle des substituts en ePTFE standard (56 %) [86]. En revanche, la méta-analyse de Lazarides *et al.*, menée sur les abords vasculaires, n'a pas permis de démontrer la supériorité d'un dispositif par rapport à l'autre en termes de perméabilité primaire à 6 mois et à 1 an [87].

3.3.2 *Hyperplasie intimale*

L'hyperplasie intimale est une complication tardive caractérisée par un rétrécissement du calibre luminal à cause de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses de la media. Cette sténose se complique fréquemment d'une thrombose [12,88].

Par exemple, lors d'un pontage chirurgical, les différences de diamètre et de compliance entre le vaisseau natif et le substitut vasculaire entraînent des perturbations hémodynamiques notamment au niveau de l'anastomose distale [89,90]. A cause des turbulences du flux sanguin, les contraintes de cisaillement s'exerçant sur les cellules endothéliales diminuent, favorisant leur apoptose ainsi que l'agrégation plaquettaire et la production de substances vasoconstrictrices [43]. Parallèlement, l'exposition de la matrice extracellulaire sous-endothéliale active les plaquettes qui libèrent alors des facteurs de croissance comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*). Cette molécule stimule la prolifération des cellules musculaires lisses entraînant ainsi l'obstruction progressive de la lumière vasculaire. Le phénomène d'hyperplasie intimale est également important dans le cas de fistule artério-veineuse native. En effet, la veine est alors soumise à une pression et à un flux sanguin supra physiologique qui peut entraîner un remodelage pathologique [91,92].

3.3.3 Infection

L'infection est due à la colonisation du substitut vasculaire par un micro-organisme pathogène. Dans 80 % des cas, le *Staphylococcus aureus* est impliqué [93]. Ce type d'événement peut survenir à court et à long terme. Les infections précoces sont dues à une contamination per-opératoire par la flore cutanée du patient ou à l'extension d'une infection superficielle au niveau de la voie d'abord. Les infections tardives résultent de l'ensemencement du substitut vasculaire par une bactériémie [94,95]. Bien que les complications infectieuses soient rares (2,6 % pour les substituts vasculaires synthétiques permanents utilisés en pontage de jambe et 3,5 % lors des abords vasculaires), elles sont à l'origine de complications graves comme les amputations de membres [13].

Afin de prévenir la survenue d'infection, l'imprégnation d'antibiotiques des substituts vasculaires synthétiques permanents a été proposée. Du fait de son spectre d'activité et de son affinité avec le PET recouvert de gélatine, la rifampicine a été particulièrement utilisée. D'après la revue de Goëau-Brissonière *et al.*, seul un essai clinique randomisé multicentrique (incluant 2610 patients) a mis en évidence son efficacité (3,2 % d'infections à 2 ans pour les substituts vasculaires en PET tricoté imprégnés de rifampicine contre 5,0 % pour ces mêmes dispositifs non imprégnés). Les deux autres essais figurant dans cette étude impliquaient moins de patients et n'ont pas permis de mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les deux groupes [96].

3.4 Taux de succès

Le succès d'une substitution vasculaire implique l'absence de complications post-opératoires précoces et tardives. Bien que les mécanismes impliqués diffèrent, une diminution de la perméabilité du dispositif implanté est observée dans la majorité de ces complications. Ainsi le taux de perméabilité primaire du substitut vasculaire (perméabilité obtenue sans réintervention) est fréquemment utilisé comme indicateur de succès.

Comme mentionné précédemment, les substituts vasculaires synthétiques permanents sont hautement thrombogènes. Cependant lors de la substitution des **vaisseaux de gros diamètre (≥ 6 mm)**, la réduction du calibre luminal consécutive à la déposition de fibrine sur les parois du greffon est faible par rapport au diamètre du substitut vasculaire. Ainsi ces substituts vasculaires présentent un taux de perméabilité primaire excellent (97 % à 5 ans) [14].

Par ailleurs, les résultats de la méta-analyse de Rychlik *et al.* montrent qu'à 5 ans, dans le cas de pontages fémoro-poplités au-dessus du genou (diamètre ≥ 6 mm), le taux de perméabilité primaire des substituts en PET est significativement supérieur par rapport à ceux en PTFE [97].

Les taux de perméabilité primaire des substituts vasculaires recommandés pour le remplacement de **vaisseaux périphériques de petit diamètre (≤ 6 mm)** et pour les **abords vasculaires** figurent dans le *tableau 4*. Les taux en gras ont été obtenus par lecture de méta-analyses ; ceux en police standard, par lecture d'études cliniques.

	PONTAGES INFRA-POPLITES	ABORDS VASCULAIRES
1ère intention	Veine saphène autologue A 1 an : 68 % - 87% [15,98] A 3 ans : 68 % [15] A 5 ans : 47 % [98]	Fistule artério-veineuse native A 6 mois : 72 % [17] A 1 an : 60 % [99] A 2 ans : 51 % - 55 % [18,99]
2ème intention	ePTFE ou PET A 1 an : 49 % - 59 % [15,16] A 3 ans : 35 % [15] A 5 ans : 30 % [16]	ePTFE A 6 mois : 58 % [17] A 1,5 an : 33 % [17] A 2 ans : 40 % [18]
3ème intention	Allogreffe (veine saphène cryopréservée) A 1 an : 56 % [100] A 3 ans : 32 % [100] A 5 ans : 17 % [100]	Allogreffe (veine fémorale cryopréservée) A 1 an : 58 % [101] A 3 ans : 35 % [101]
	Grefe hybride (Omniflow® II) Pas d'étude disponible	Grefe hybride (Omniflow® II) A 1 an : 60 % [102]

Tableau 4 : Perméabilité primaire des substituts vasculaires utilisés pour les pontages infra-poplités et pour les abords vasculaires

Dans ces deux contextes médicaux, les vaisseaux autologues, indiqués en première intention, ont un taux de perméabilité primaire significativement supérieur aux substituts synthétiques permanents et cela quelle que soit la durée d'implantation. Cette supériorité est principalement attribuée à la surface luminale endothélialisée de ces greffons [103]. Les taux de perméabilité primaire des stratégies de substitution proposées en deuxième intention sont loin d'être satisfaisants. En effet, plus de la moitié des patients est en situation d'échec à 3 ans, pour un pontage infra-poplité, ou à 1 an, lors de la création d'un abord vasculaire.

Afin de pallier les limites des substituts vasculaires synthétiques permanents, les allogreffes et les greffes hybrides ont été développées. Ces alternatives étant relativement récentes, les études publiées sont peu nombreuses et portent sur un petit nombre de patients. Leurs résultats doivent donc être interprétés avec prudence. Néanmoins, ils semblent comparables ou inférieurs aux traitements proposés en deuxième intention. Ces techniques présentent également des limites comme le faible nombre de donneurs pour l'allogreffe et la difficulté de manipulation pour les greffes hybrides. Ainsi ces produits peinent à s'imposer sur le marché.

Aujourd'hui, outre les solutions autologues, il n'existe aucun dispositif efficace à moyen et long terme pour le pontage des vaisseaux de petit diamètre (≤ 6 mm) et pour la création d'abord vasculaire. Afin de répondre à ces besoins, de nombreux travaux de recherche sont actuellement menés notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

4. Solutions proposées par l'ingénierie tissulaire

Après une définition du concept d'ingénierie tissulaire, ce chapitre présente le cahier des charges d'un substitut vasculaire. Dans le but de répondre à ces exigences, deux grandes approches ont été développées. Leurs principes et leurs principaux résultats sont abordés dans une dernière partie.

4.1 Concept d'ingénierie tissulaire

D'après Langer et Vacanti, l'ingénierie tissulaire se définit comme « l'ensemble des méthodes et des techniques s'inspirant de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques pouvant maintenir, améliorer et restaurer les fonctions des tissus vivants » [104]. Afin d'obtenir un tissu hybride, cette discipline associe généralement trois éléments : (1) un échafaudage, (2) des cellules et (3) des facteurs de croissance ou des cytokines. (1) L'échafaudage est un biomatériau d'origine synthétique, biologique ou hybride. (2) Les cellules peuvent être prélevées à partir du patient lui-même, d'un donneur de la même espèce ou d'un donneur d'une espèce différente. (3) Enfin, des biomolécules peuvent être ajoutées au milieu lors de la culture de cellules *in vitro* ou directement à l'implant pour favoriser son développement *in vivo* [104,105].

Les étapes de l'ingénierie tissulaire comprennent tout d'abord (1) un prélèvement de cellules chez un donneur. (2) Ces cellules sont alors mises en culture pour être amplifiées et/ou différenciées. (3) Elles sont ensuiteensemencées sur une matrice et (4) l'ensemble est placé dans un bioréacteur avec des facteurs de croissance. (5) Après un temps de maturation suffisant, le produit d'ingénierie tissulaire est implanté chez le patient où il sera remodelé (*figure 10*) [106].

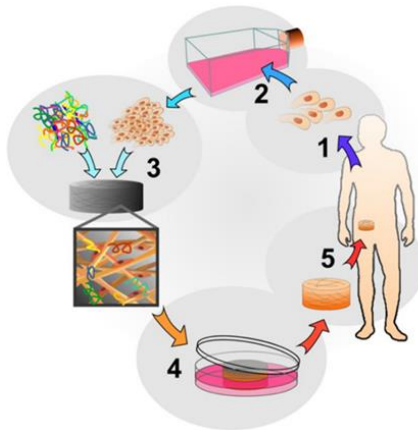


Figure 10 : Etapes de l'ingénierie tissulaire en système autologue [106]

Ce domaine de recherche fait appel à plusieurs disciplines comme la biologie, l'ingénierie, la chimie et la médecine. Ainsi, l'ingénierie tissulaire est une thématique pluridisciplinaire aspirant à pallier les limites des biomatériaux et la faible disponibilité d'organes pour transplantation.

4.2 *Cahier des charges d'un substitut vasculaire*

L'objectif de l'ingénierie tissulaire vasculaire est de produire un greffon fonctionnel à long terme. De nombreuses publications ont listé les qualités nécessaires pour un tel produit [72,107–110]. Néanmoins, toutes ces qualités n'ont pas la même importance pour le succès de la substitution vasculaire à long terme. Nous avons, par conséquent, trouvé pertinent de les classer selon qu'elles soient indispensables ou souhaitables et qu'elles interviennent avant, pendant ou après l'implantation du substitut vasculaire (*tableau 5*).

	Qualités INDISPENSABLES	Qualités SOUHAITABLES
AVANT l'implantation	x	<ul style="list-style-type: none"> ● Possibilité de stérilisation ● Production en grande quantité ● Coût moindre
PENDANT l'implantation	<ul style="list-style-type: none"> ● Résistance à l'éclatement suffisante ● Rétention à la suture compatible avec la chirurgie ● Faible perméabilité transmurale 	<ul style="list-style-type: none"> ● Possibilité de couper le greffon à la longueur désirée ● Manipulation aisée
APRES l'implantation	<ul style="list-style-type: none"> ● Intégration avec le tissu hôte ● Limitation de la thrombose, de l'hyperplasie intimale et de l'infection 	<ul style="list-style-type: none"> ● Compliance proche des vaisseaux natifs

Tableau 5 : Cahier des charges d'un substitut vasculaire

Pour les critères mécaniques, il est important de souligner qu'actuellement aucune norme ne définit les valeurs minimales à atteindre. Par contre, les valeurs obtenues par les vaisseaux natifs (veine saphène et artère thoracique interne) sont souvent utilisées comme référence [109,111]. Les valeurs physiologiques de la pression à l'éclatement, de la rétention à la suture et de la compliance figurent dans le *tableau 6*.

	Pression à l'éclatement (mmHg)	Rétention à la suture (N)	Compliance (% par 100 mmHg)
Veine saphène (Homme)	1599 ± 877	1,96 ± 0,29	0,7 à 1,5
Artère thoracique interne (Homme)	3196 ± 1264	1,38 ± 0,50	11,5 ± 3,9

Tableau 6 : Propriétés mécaniques des vaisseaux natifs [112]

4.3 Différentes approches en ingénierie tissulaire vasculaire

Afin de répondre aux exigences citées précédemment, deux grandes approches ont été développées. La première a recours à un biomatériau comme échafaudage exogène alors que la seconde utilise la matrice extracellulaire produite par les cellules comme échafaudage endogène.

4.3.1 Utilisation d'un échafaudage exogène

Dans cette partie, nous présenterons les principales stratégies reposant sur l'utilisation d'un échafaudage exogène. En fonction du type de biomatériau support (polymères synthétiques permanents ou résorbables, polymères biologiques, association de ces différents biomatériaux), plusieurs catégories peuvent être distinguées.

4.3.1.1 Polymères synthétiques

Polymères synthétiques permanents

Comme discuté précédemment, les phénomènes de thrombose s'expliquent principalement par l'absence de régénération de l'endothélium au niveau de la lumière des substituts vasculaires synthétiques permanents [84]. Ainsi, dès 1978, Herring propose d'ensemencer leur surface luminale avec des cellules endothéliales au moment de l'intervention chirurgicale [103]. Entre 1987 et 2009, Zilla et ses collaborateurs ont mené de nombreux travaux portant sur l'endothélialisation des substituts vasculaires en ePTFE avec des cellules autologues en laboratoire [20,113–115].

La méthode développée par cette équipe de recherche est basée sur la mise en culture de cellules endothéliales obtenues à partir de veines superficielles prélevées chez le patient. Une fois amplifiées, ces cellules sontensemencées à l'intérieur d'un substitut vasculaire en ePTFE préalablement recouvert de colle de fibrine. Après 9 jours de maturation dans un bioréacteur, le substitut vasculaire endothélialisé est implanté chez le patient en position de pontage des membres inférieurs (*figure 11*) [20,113–115].



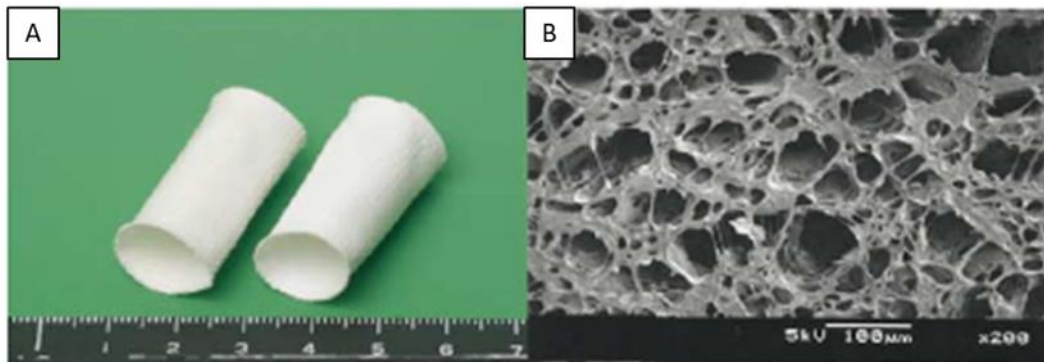
Figure 11 : Substitut vasculaire développé par Zilla et al. [113]

Ainsi, deux essais cliniques ont mis en évidence l'augmentation significative de la perméabilité primaire des substituts en ePTFE endothélialisé (85 % à 3 ans et 65 % à 9 ans) par rapport aux substituts non traités (55 % à 3 ans et 16 % à 9 ans) [113,114]. De plus, deux autres études cliniques ont confirmé les résultats satisfaisants en termes de perméabilité primaire à long terme des substituts en ePTFE endothélialisé et ce, que le pontage fémoro-poplité soit réalisé au-dessus (60 % à 7 ans et 59 % à 10 ans) ou en dessous du genou (71 % à 7 ans et 64 % à 10 ans) [20,115]. Malgré ces résultats prometteurs, les difficultés de mise en œuvre et les coûts élevés ont probablement empêché la démocratisation de cette technique.

Polymères synthétiques résorbables

L'intérêt de la communauté scientifique s'est également porté sur l'utilisation des polymères synthétiques résorbables. En effet, la maîtrise de leurs cinétiques de dégradation permettrait théoriquement d'obtenir le remplacement du substitut vasculaire synthétique par un tissu biologique produit par l'hôte. En ingénierie tissulaire vasculaire, les polymères les plus étudiés sont : l'acide polyglycolique (*PolyGlycolic Acid* (PGA)), l'acide polylactique (*PolyLactic Acid* (PLA)) et le polycaprolactone (*Poly -(ϵ - Caprolactone)* (PCL)). De nombreuses études précliniques utilisant différents types de polymères et diverses sources cellulaires ont été menées [116,117]. Cependant, les travaux de Shin'oka *et al.* portant sur le développement d'un substitut vasculaire dans un contexte de malformation cardiaque congénitale chez l'enfant, se sont largement démarqués. En effet, ce groupe a été le premier à atteindre la clinique [21,118–120].

Le substitut conçu par cette équipe est constitué d'un échafaudage de copolymère de PCL/PLA renforcé par un squelette de PGA tissé (*figure 12*). Le jour de la chirurgie cardiaque, des cellules mononucléées sont isolées à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Après ensemencement du biomatériau, l'ensemble est implanté en situation cavopulmonaire [21,119,120].



*Figure 12 : Echafaudages de copolymère de PCL/PLA utilisés par Shin'oka et al. [119]
A- Vue macroscopique B-Microscopie électronique à balayage*

Entre 2001 et 2004, 25 enfants porteurs d'une malformation cardiaque congénitale ont bénéficié de ce type d'intervention. Après 5 et 11 ans, le suivi de cette cohorte de patients n'a révélé aucune mortalité en lien avec la greffe, aucun signe d'anévrisme, de rupture, d'infection ou de calcification [21,120]. Malgré la sténose de la greffe chez 28 % des patients à 11 ans, cette intervention peut être considérée comme un succès. Cependant, il est nécessaire de souligner que l'implantation de ces greffons est réalisée dans des conditions anatomiques particulières (flux élevé, basse pression). Aussi, compte tenu des faibles propriétés mécaniques du substitut vasculaire, cette réussite n'est malheureusement pas transposable à un contexte de pontage périphérique ou d'abord vasculaire où la pression artérielle s'exerçant sur le substitut vasculaire est beaucoup plus importante [121].

Pour améliorer le traitement de ce type de cardiopathie congénitale, deux voies de recherche sont actuellement explorées par cette équipe. La première concerne l'utilisation des techniques d'impression en trois dimensions afin de produire un matériau personnalisé s'adaptant aux variations anatomiques de chaque patient. En ce sens, deux études réalisées chez le mouton ont montré des résultats satisfaisants après 6 mois de suivi [122,123]. De plus, en 2018, le recours à cette technologie a permis de traiter un malade avec succès [123]. La seconde stratégie repose sur la fonctionnalisation des substituts vasculaires en polymères synthétiques résorbables grâce à des biomolécules. Cette solution, basée sur le recrutement des cellules de l'hôte, permet d'éviter tout prélèvement cellulaire. Ainsi des greffons en polymères synthétiques résorbables, dont la surface luminale était fonctionnalisée avec du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)), ont été implantés dans la veine cave inférieure de souris (basse pression). Les résultats ont montré, qu'après 2 semaines, le diamètre interne de ces greffons était significativement plus élevé par rapport à ceux dont la surface n'avait pas été modifiée [124].

Enfin, dans un contexte clinique plus large (pontage en situation de haute pression et création d'abord vasculaire), il est important de garder à l'esprit que la mise au point d'un substitut vasculaire synthétique résorbable fonctionnalisé serait l'idéal. En effet, elle permettrait de s'affranchir des étapes de prélèvement et de culture cellulaire. Par conséquent, il a été envisagé de modifier la surface de ces polymères avec des molécules comme l'héparine [125–127] ou le VEGF [128,129]. Ainsi, des substituts vasculaires fonctionnalisés avec du VEGF ont été implantés en situation de haute pression chez le rat [129] et chez le chien [128]. Les résultats de ces expérimentations montrent, qu'après 6 mois et 1 an, la fonctionnalisation de ces greffons augmente significativement leur perméabilité primaire.

En effet, le facteur de croissance greffé favorise le recrutement des progéniteurs endothéliaux circulants et donc l'endothélialisation précoce de ces substituts vasculaires [128,129]. Cependant, avant d'envisager des essais cliniques chez l'Homme, plusieurs éléments comme la cinétique de délivrance de ces molécules et l'absence d'effets indésirables sur l'organisme doivent être investigués.

4.3.1.2 Polymères biologiques

Les produits de dégradation des polymères synthétiques pouvant être associés à une réponse inflammatoire persistante, les polymères biologiques obtenus à partir de la matrice extracellulaire ont été étudiés comme alternative. En effet, grâce à leur nature biologique, ces matériaux favorisent l'adhésion, la colonisation et la prolifération cellulaire tout en étant facilement remodelés.

Le collagène, étant un composant majoritaire des vaisseaux sanguins et jouant un rôle prépondérant dans leurs propriétés mécaniques, a été largement utilisé en ingénierie tissulaire vasculaire [116,130]. Dès 1986, Weinberg et Bell présentent ainsi un premier vaisseau sanguin entièrement biologique s'inspirant de la structure histologique de la paroi artérielle. Cette architecture tubulaire est constituée de gels de collagène concentriquesensemencés par des cellules bovines formant de l'intérieur vers l'extérieur des équivalents d'endothélium (cellules endothéliales), de media (cellules musculaires lisses et collagène) et d'adventice (fibroblastes et collagène). Cependant pour supporter des pressions physiologiques, la structure devait être renforcée par des matrices en Dacron® [131]. Près d'une décennie plus tard, Matsuda et ses collaborateurs ont produit des substituts vasculaires composés d'un gel de collagène/dermatane sulfate contenant des cellules musculaire lisses, dont la lumière était tapissée de cellules endothéliales [132]. Néanmoins, les implantations en système autologue chez le chien ont montré que la présence d'une prothèse vasculaire synthétique était toujours nécessaire pour obtenir une résistance mécanique suffisante [133]. Depuis, la réticulation a été envisagée afin d'augmenter les propriétés mécaniques des gels de collagène. Malgré cela, leur résistance mécanique est encore trop faible pour qu'ils puissent être utilisés seuls en situation de haute pression [134].

Par ailleurs, même si le chitosane et la fibroïne de soie sont des molécules biologiques qui n'entrent pas dans la composition de la matrice extracellulaire humaine, leur utilisation a également été proposée en ingénierie tissulaire vasculaire.

Bordenave *et al.* ont, par exemple, mis au point des hydrogels tubulaires de chitosane. Bien que la résistance à l'éclatement de ces biomatériaux (1313 ± 196 mmHg) soit inférieure à celle des vaisseaux natifs (environ 1500 mmHg pour les veines et 3000 mmHg pour les artères), ces greffons ont été implantés dans la carotide de deux brebis [135,136]. A 3 jours, tous étaient perméables et ne présentaient aucun signe de dilatation [136]. Malgré ces résultats prometteurs, des investigations à plus long terme et sur un plus grand nombre d'animaux sont nécessaires.

De plus, grâce à l'*electrospinning* ou au tissage, des substituts vasculaires en fibroïne de soie peuvent être obtenus. Leur résistance à l'éclatement varie de 575 à 849 mmHg selon les études et est donc relativement faible [137–141]. Néanmoins, de nombreuses implantations en site orthotopique ont été réalisées avec succès chez les rongeurs [137,138,142,143]. Ces résultats sont encourageants mais l'efficacité de ces greffons dans un modèle de gros animal, où le rapport diamètre / épaisseur de la paroi est différent, reste à démontrer.

Enfin, l'association de différents polymères naturels a été envisagée. Plusieurs études ont été menées dans ce domaine [144–146]. Avec des expérimentations chez le gros animal, les travaux de Liu *et al.* sont les plus avancés. En 2012, cette équipe a mis au point un substitut vasculaire à base de chitosane, de gélatine et de fibrine (*figure 13*).



Figure 13 : Substitut vasculaire développé par Liu et al. [22]

Après 9 mois d'implantation interpositionnelle dans l'artère fémorale chez le chien, tous les greffons étaient perméables et entièrement colonisés par les cellules de l'hôte [22]. Ces données très encourageantes ont été obtenues chez une espèce particulièrement favorable à l'endothélialisation [147]. Aussi, il semble nécessaire de confirmer ces résultats en réalisant des implantations chez le mouton ou chez le babouin qui sont des modèles animaux plus proches de l'Homme en termes de physiologie cardiovasculaire [147].

4.3.1.3 Substituts vasculaires hybrides

Afin de cumuler les avantages des biomatériaux décrits précédemment, deux stratégies hybrides ont été principalement rapportées dans la littérature. Tout d'abord, pour augmenter les propriétés mécaniques des polymères biologiques, leur association avec des polymères synthétiques permanents a été décrite [148–150]. Par ailleurs, pour diminuer la susceptibilité à l'infection et l'inflammation chronique suite à l'implantation, de nombreuses études ont évalué l'utilisation simultanée des polymères biologiques et des polymères synthétiques résorbables [19,151–155]. Parmi ces travaux, ceux de Jockenhoevel *et al.* sont particulièrement prometteurs. Ce groupe de recherche a, en effet, proposé un substitut vasculaire avec un échafaudage de PLA macroporeux et de fibrine ensemencé avec des CML et des fibroblastes autologues (*figure 14*) [19,23].

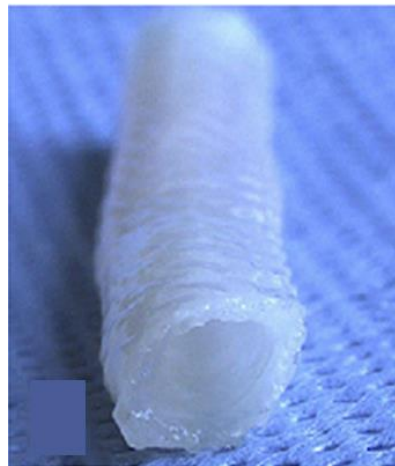


Figure 14 : Substitut vasculaire développé par Jockenhoevel et al. [23]

Après 4 semaines de maturation en bioréacteur, ces greffons ont été implantés dans l'artère carotide chez le mouton. A 6 mois, tous les greffons étaient perméables et remodelés par les cellules de l'hôte [23]. Malgré ces résultats positifs, ces travaux publiés en 2010 n'ont pas été poursuivis. Il est également important de noter que la complexité de mise en œuvre d'un modèle contenant des cellules autologues reste une des principales limites de cette technique.

4.3.2 Utilisation d'un échafaudage endogène

Dans cette partie, nous présenterons les stratégies utilisant la matrice extracellulaire produite par les cellules comme échafaudage. Selon que l'étape de maturation est réalisée dans un bioréacteur ou par une implantation *in vivo*, deux catégories peuvent être distinguées.

4.3.2.1 Maturation en bioréacteur

Actuellement, cinq stratégies comportent une étape de maturation en bioréacteur et permettent la production de substituts vasculaires. Elles sont respectivement basées sur l'utilisation (1) de supports de polymères synthétiques résorbables, (2) de supports de polymères biologiques, (3) d'aucun support, (4) de matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains ou animaux et sur (5) la culture de micro agrégats.

Supports de polymères synthétiques résorbables

Dans ce domaine, les travaux de Niklason *et al.* se sont largement distingués. Cette équipe propose un substitut vasculaire produit à partir d'un échafaudage de PGAensemencé avec des CML allogéniques. Pendant les 8 semaines de culture en bioréacteur pulsatile, ces cellules sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire à mesure que le support de PGA se dégrade. L'ensemble est ensuite décellularisé grâce à une solution détergente de SDS (sodium dodecyl sulfate) / CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) (*figure 15*) [24]. Le principe du processus de décellularisation est décrit dans le paragraphe dédié aux matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains ou animaux (page 58).



Figure 15 : Substitut vasculaire développé par Niklason et al. [24]

Des études *in vitro* ont tout d'abord démontré que ces greffons présentaient des propriétés mécaniques proches des vaisseaux humains et cela même après conservation dans une solution saline à 4°C pendant un an [112]. Ensuite, des implantations en site orthotopique chez le rat [156], le chien et le babouin [112] ont respectivement fourni des résultats satisfaisants après 6 semaines, 1 an et 6 mois de suivi. Tous ces éléments ont permis de réaliser un essai clinique de phase I/II chez l'Homme [24]. L'objectif de cette étude était d'évaluer la sécurité et l'efficacité de ce dispositif chez 60 patients présentant une insuffisance rénale chronique en stade terminal. Après implantation en position d'abord vasculaire, le taux de perméabilité primaire des substituts était de 63 % à 6 mois et de 28 % à 1 an [24]. L'analyse histologique d'explants prélevés lors de réintervention chez ces patients a permis d'étudier la colonisation par les cellules de l'hôte. Ainsi, des cellules endothéliales (positives pour le CD31) et des CML (positives pour l'actine alpha du muscle lisse (*alpha smooth muscle actin* (α -SMA))) ont été respectivement mises en évidence au niveau de la lumière et dans les parois des greffons. Par ailleurs la présence de certains marqueurs ; comme Nestin, CD34 ou CD90, suggère que les cellules souches circulantes sont impliquées dans ce phénomène de recellularisation [157]. Enfin, un essai clinique de phase III comparant l'efficacité de ce substitut vasculaire par rapport à celle de la fistule artério-veineuse native, traitement de référence de l'insuffisance rénale chronique, est actuellement en cours [<https://humacyte.com/publications/>].

Afin de s'affranchir de l'étape de décellularisation et de travailler en système autologue, des travaux portant sur l'ensemencement d'échafaudages de PGA par des cellules souches pluripotentes induites, qui sont ensuite différenciées en CML, ont été menés par ce même groupe. Les résultats ont montré qu'après maturation en bioréacteur, les greffons obtenus présentaient des propriétés mécaniques suffisantes pour être implantés dans l'aorte abdominale chez le rat immunosupprimé [158]. Après 2 semaines, tous les substituts étaient perméables et présentaient des signes de remodelage. De plus, aucun tératome ni aucune rupture n'ont été détectés [159].

En conclusion, tous ces éléments sont extrêmement prometteurs. Cependant, le principal inconvénient de cette approche reste la période de culture qui est longue, coûteuse et difficile à gérer d'un point de vue réglementaire.

Supports de polymères biologiques

Par ailleurs, Tranquillo et ses collaborateurs ont réussi à surmonter la faiblesse mécanique des polymères biologiques en proposant un substitut vasculaire constitué d'un tube de fibrine ensemencé par des fibroblastes de derme ovin associé à une longue période de maturation en bioréacteur. Cette maturation de 8 semaines permet aux cellules de produire de la matrice extracellulaire à mesure que le support de fibrine est dégradé. Ensuite, l'ensemble est décellularisé avec une solution de SDS et une DNase (*figure 16*) [160]. Le principe du processus de décellularisation est décrit dans le paragraphe dédié aux matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains ou animaux (page 58).



Figure 16 : Substitut vasculaire développé par Tranquillo et al. [25]

Malgré ce traitement chimique, ces greffons présentent de propriétés mécaniques compatibles avec une implantation en situation de haute pression. Ainsi ils ont été testés dans l'artère fémorale chez la brebis. A 6 mois, ils ne présentaient aucun signe d'anévrisme ou de calcification. Leur concentration en collagène était augmentée. De plus, la présence de CML dans les parois du greffon ainsi que de cellules endothéliales sur l'intégralité de la surface luminale témoignait de la colonisation par les cellules de l'hôte [161]. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'implantation de ces substituts vasculaires dans l'artère pulmonaire de jeunes agneaux [162]. Enfin, des greffons, produits selon la méthode précédemment décrite, ont été cellularisés avec des fibroblastes de derme humain et évalués en position d'abord vasculaire chez le babouin. En excluant les événements thrombotiques précoces (dus au choix du modèle chirurgical, qui a été modifié par la suite), le taux de perméabilité primaire des greffons était respectivement de 83 % et 60 % après 3 et 6 mois. Comme dans les expériences précédentes, le phénomène de recellularisation a été mis en évidence par analyse histologique des explants. Enfin, bien que ces résultats soient encourageants, la principale limite de cette approche reste le coût engendré par la période de culture cellulaire et l'utilisation d'un bioréacteur [25].

Absence de support

Les produits de dégradation des polymères synthétiques étant susceptibles de causer une réponse inflammatoire et donc une mauvaise intégration du greffon, plusieurs travaux de recherche ont porté sur la mise au point d'un substitut vasculaire entièrement biologique [163–165]. En étant le premier à produire des greffons mécaniquement forts et en allant jusqu'à l'essai clinique chez l'Homme, L'Heureux et ses collaborateurs se sont largement distingués. En effet, ce groupe a développé un greffon entièrement biologique en roulant autour d'un mandrin des feuillets de matrice extracellulaire obtenus grâce à la culture de fibroblastes humains pendant 8 semaines. Ensuite, la maturation en bioréacteur pendant 8 semaines supplémentaires permettait la fusion entre les différentes couches du « rouleau » (*figure 17*). Les étapes de roulage et de maturation étaient répétées deux fois.



Figure 17 : Substitut vasculaire développé par L'Heureux et al. [166]

Dès 1998, cette équipe propose une **première génération** de greffons s'inspirant de l'histologie de la paroi artérielle. En effet, leur modèle présentait plusieurs couches concentriques distinctes : un endothélium, une « membrane interne » formée par la dévitalisation de la matrice extracellulaire sécrétée par des fibroblastes, une « media » composée de CML et un « adventice » contenant des fibroblastes. Les feuillets produits par les CML et les fibroblastes étaient successivement enroulés autour d'un mandrin. Après 16 semaines de maturation en bioréacteur, la fusion entre les différentes couches était obtenue et le mandrin retiré afin que la lumière soitensemencée avec des cellules endothéliales. *In vitro*, la résistance à l'éclatement de ces substituts était supérieure à celle de la veine saphène. Ces greffons étaient également facilement manipulables et suturables ce qui a permis l'implantation d'un modèle non endothélialisé dans l'artère fémorale de chiens immunosupprimés. Après une semaine, aucun ne présentait de signe de dilatation mais seulement la moitié était perméable. Ce résultat s'explique par l'absence d'endothélialisation préalable des greffons utilisés pour cette expérience. En effet, la présence d'un endothélium humain aurait causé un rejet agressif. Ainsi, cette première étude a démontré qu'il était possible de produire un substitut vasculaire capable de supporter la pression artérielle physiologique sans utiliser de biomatériau support. Néanmoins, pour envisager une application clinique, la simplification de la méthode de production semblait nécessaire [167].

Par conséquent, une diminution du nombre de types cellulaires composant le greffon a été envisagée. Des substituts vasculaires de **seconde génération**, sans couche de CML, ont donc été proposés et validés dans différents modèles d'animaux immunosupprimés. Une étude à court terme chez le chien a, tout d'abord, permis de confirmer la suturabilité et la stabilité mécanique initiale de ces nouveaux greffons. Ensuite, une étude à plus long terme réalisée chez le rat a montré, qu'après 7 mois, le taux de perméabilité de ces substituts était de 85 %. De plus, les vaisseaux étaient intégrés dans les tissus environnants et présentaient des cellules positives pour le facteur de von Willebrand d'une part et pour l' α -SMA d'autre part, suggérant respectivement la formation d'un endothélium et d'une media. Enfin, ces greffons ont été implantés en site orthotopique chez trois primates agressivement immunosupprimés. Après 8 semaines, tous étaient perméables et recolonisés par les cellules de l'hôte [166]. L'ensemble de ces résultats a permis la réalisation d'un essai clinique de phase I/II chez 10 malades présentant une insuffisance rénale chronique en stade terminal. Pour cela, des substituts vasculaires ont été produits à partir de fibroblastes autologues. Des études *in vitro* ont mis en évidence que la force à l'éclatement de ces greffons était égale ou supérieure de celle de l'artère thoracique interne, et cela, quels que soient l'âge et le statut médical du patient [111]. De plus, après 1 et 6 mois en position d'abord vasculaire, le taux de perméabilité primaire des substituts était respectivement de 78 % et de 60 %. Bien que ces résultats soient très encourageants, le temps nécessaire pour produire ces greffons était en moyenne de 7,5 mois, ce qui est incompatible avec un besoin clinique urgent [168].

Pour pallier à cette limite, une **troisième génération** de greffons allogéniques dévitalisés a été proposée. La dévitalisation comprend des étapes de séchage, de congélation à -80°C et de réhydratation. Les substituts vasculaires allogéniques déshydratés, stockés congelés, seraient donc disponibles immédiatement. Des travaux *in vitro* réalisés sur des feuillets de matrice extracellulaire produits par culture de fibroblastes, ont démontré que la dévitalisation n'affecte significativement ni l'architecture ni les propriétés mécaniques du tissu [169]. Dans un premier temps, un substitut vasculaire déshydraté, obtenu à partir de fibroblastes autologues isolés à partir d'une biopsie de peau, a donc été stocké congelé. Avant la chirurgie, il a été réhydraté puis endothélialisé avec les cellules du patient. Ce greffon a ensuite été implanté en position d'abord vasculaire chez le malade.

Après 8 mois, le substitut vasculaire fonctionnait sans complication [170]. Dans un second temps, la production de greffons allogéniques non endothélialisés a permis de simplifier d'avantage la méthode de production et d'améliorer encore la disponibilité de ces produits d'ingénierie tissulaire. Ces substituts étaient obtenus par culture de fibroblastes allogéniques. La dévitalisation ne modifiant pas leurs caractéristiques mécaniques, ils ont été implantés en tant qu'abord vasculaire chez trois patients. Les résultats, basés sur un temps de suivi maximal de 11 mois, ont montré qu'aucun greffon ne présentait de signe de dilatation ou de dégradation [26]. Malgré cette réussite, les 24 semaines de culture cellulaire nécessaires à la production de ces substituts vasculaires (8 semaines pour la production des feuillets et 16 semaines pour obtenir la fusion entre les différentes couches) restent le principal obstacle à l'utilisation de cette technique en routine.

Afin s'affranchir de l'étape de maturation en bioréacteur et donc de diviser le temps de production des greffons par trois, ce groupe de recherche utilise actuellement une nouvelle méthode d'assemblage basée sur le tissage. Une première étude a montré que les feuillets de matrice extracellulaire peuvent être coupés en fines bandelettes pour former des fils. Ces fils sont ensuite assemblés par tissage afin de produire des substituts vasculaires dont les propriétés mécaniques sont largement supérieures à celles des vaisseaux natifs [171]. Même si l'implantation d'un greffon tissé dans l'artère carotide d'une brebis a fourni une preuve de faisabilité, des études portant sur un plus grand nombre d'animaux et avec un suivi à long terme sont nécessaires pour conclure à l'efficacité de cette méthode. En ce sens, le développement d'un modèle allogénique chez la brebis est actuellement en cours. Les premiers résultats ont montrés que des feuillets de matrice extracellulaire pouvaient être obtenus à partir de fibroblastes de derme ovin. Comme pour la matrice extracellulaire humaine, ces feuillets peuvent être découpés sous forme de fils qui, une fois assemblés par tissage, permettent l'obtention de substituts vasculaires présentant des propriétés mécaniques supra physiologiques [données non publiées]. Ainsi, des expérimentations *in vivo* basées sur l'implantation de substituts vasculaires allogéniques tissés dans l'artère carotide de brebis vont être prochainement réalisées.

Matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains ou animaux

Comme évoqué précédemment, les étapes de culture cellulaire sont longues, couteuses et difficiles à gérer d'un point de vue réglementaire. Aussi, le recours à des matrices biologiques directement disponibles a été proposé pour s'en affranchir. Ces tissus provenant de sources allogéniques ou xénogéniques, un traitement de décellularisation est parfois utilisé pour diminuer leur immunogénicité.

Ce processus vise à éliminer les cellules tout en préservant les protéines de la matrice extracellulaire qui sont responsables des propriétés mécaniques. Pour cela, des techniques physiques et / ou chimiques (digestion enzymatique, solution détergente, etc.) sont possibles. En ingénierie tissulaire vasculaire, les matrices biologiques les plus étudiées sont : les artères, la sous muqueuse du petit intestin et la membrane amniotique humaine (MAH).

Certains auteurs ont proposé d'utiliser les artères mammaires internes [172], ombilicales [173,174] et placentaires humaines [175,176] après décellularisation. Dans ce domaine, les travaux de Kajbafzadeh *et al* sont les plus avancés. Cette équipe a, en effet, implanté des artères mammaires internes humaines décellularisées dans l'artère fémorale superficielle chez le lapin. Après 3 ans, tous les substituts vasculaires étaient perméables et colonisés par les cellules de l'hôte [172]. Par ailleurs, d'autres chercheurs ont envisagé de les recellulariser avec des cellules endothéliales et/ou des cellules musculaires lisses avant implantation [177]. Ainsi, différentes études *in vivo* ont démontré que la perméabilité de ces greffons était significativement supérieure par rapport à ceux qui n'avaient pas été modifiés [177]. D'autre part, en contexte xénogénique, certains produits, comme le dispositif Artegraft® qui correspond à une artère carotide bovine décellularisée, sont disponibles commercialement (voir paragraphe 3.1.3 *Autres substituts vasculaires*).

Par ailleurs, dès 1989, Badylak et ses collaborateurs utilisent un greffon constitué de sous muqueuse du petit intestin dans un contexte de substitution vasculaire autologue chez le chien. Après 1 an, 90 % des vaisseaux étaient perméables sans signe d'infection, de thrombose ou d'hyperplasie intimale. Néanmoins, il est important de souligner que ces résultats ont été obtenus avec des pontages de gros diamètre (10 mm) [178]. Depuis, différentes stratégies pour renforcer [179–181] et/ou fonctionnaliser [181,182] ce tissu ont été étudiées. Les résultats les plus encourageants ont été obtenus par Koenigskecht *et al*.

Leurs substituts vasculaires constitués de sous muqueuse du petit intestin dont la surface était fonctionnalisée avec de l'héparine et du VEGF, ont été implantés dans la carotide de brebis. Après 3 mois, leur taux de perméabilité était de 92 % et tous présentaient des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et une quantité augmentée en collagène et en élastine [182].

Enfin, actuellement, plusieurs groupes de recherche utilisent la MAH pour produire des substituts vasculaires [27,183–185]. McFetridge *et al.* proposent, par exemple, un greffon obtenu par roulage de MAH préalablement décellularisée. Afin d'obtenir la fusion entre les différentes couches de membrane, l'ensemble estensemencé avec des CML humaines et cultivé en bioréacteur pendant 4 semaines (*figure 18*) [27,183]. Après 1 mois d'implantation dans la carotide de lapins immunocompétents, tous les greffons étaient perméables et recolonisés par les cellules de l'hôte [27].

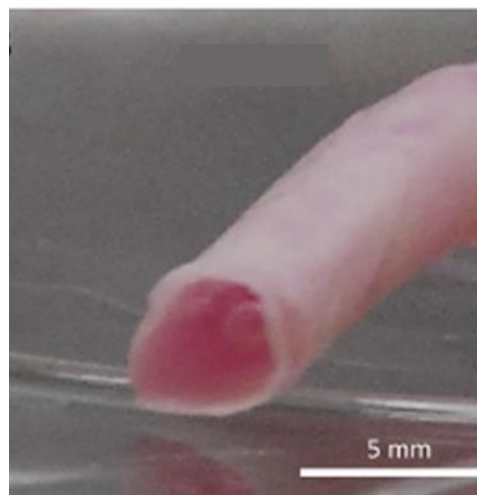


Figure 18 : Substitut vasculaire développé par McFetridge et al. [27]

Par ailleurs, le groupe de Niknejad *et al.* a également développé un substitut vasculaire constitué d'un rouleau de MAH maintenu par des sutures. Après 48 semaines dans la veine jugulaire chez la brebis, les huit greffons étaient perméables et présentaient une monocouche de cellules endothéliales au niveau de leurs surfaces luminales [185]. Il est cependant intéressant de souligner qu'il s'agissait d'une implantation veineuse et donc que la pression à laquelle les greffons étaient soumis était faible comparativement à celle d'une artère.

Culture de micro agrégats

Enfin, la dernière approche repose sur la maturation en bioréacteur de micro agrégats. En effet, des conditions de cultures particulières permettent aux cellules de s'organiser sous forme de sphéroïdes. Ces micro agrégats peuvent ensuite être agencés grâce à différentes techniques [186].

En 2010, Hoerstrup et son équipe ont, par exemple, eu recours à une technique automatisée de microgouttes pour produire, dans un moule cylindrique, des micro agrégats contenant des fibroblastes et des cellules endothéliales d'origine humaine. Après 14 jours de culture en bioréacteur, l'ensemble des sphéroïdes avait fusionné et formait un substitut vasculaire. Cependant, les analyses histologiques *in vitro* n'ont pas mis en évidence de cellules endothéliales au niveau de la surface luminale. De plus, les propriétés mécaniques du substitut vasculaire n'ont pas été évaluées [187].

L'agencement de ces micro agrégats est également possible grâce à la bio-impression. Ce procédé de fabrication additive assisté par ordinateur permet l'impression de sphéroïdes sur un hydrogel sacrificiel afin d'obtenir une structure tubulaire. Grâce à une étape de maturation en bioréacteur, les différentes couches cellulaires fusionnent et le support en hydrogel peut être retiré. Forgacs et ses collaborateurs ont produit un substitut vasculaire en utilisant cette technique en 2009 [188]. Plus récemment, Morita *et al.* se sont affranchis de cet hydrogel sacrificiel en proposant une approche basée sur l'impression de sphéroïdes sur un réseau d'aiguilles. Ces sphéroïdes contenaient trois types cellulaires humains : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes. Quatre jours après l'impression, le réseau d'aiguilles était retiré. La maturation de la structure tubulaire était alors poursuivie pendant 4 jours dans un bioréacteur. Les greffons ainsi obtenus (*figure 19*), ont été implantés dans l'aorte abdominale de rats immunosupprimés [189].

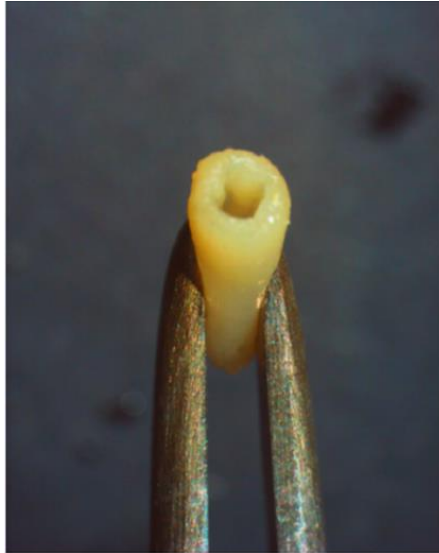


Figure 19 : Substitut vasculaire développé par Morita et al. [189]

Après 5 jours, tous étaient perméables et présentaient des signes de remodelage [189]. Cependant, afin de confirmer que ces greffons sont capables de supporter des contraintes mécaniques physiologiques, une étude *in vivo* à plus long terme semble nécessaire. Par ailleurs, aucune donnée concernant les propriétés mécaniques de ces substituts vasculaires n'a été publiée. Or la faiblesse de ces propriétés constitue souvent la limite des greffons obtenus par bio-impression.

4.3.2.2 Utilisation du corps comme bioréacteur

L'utilisation du corps du patient comme bioréacteur a, par ailleurs, été envisagée afin de produire un substitut vasculaire autologue entièrement biologique. Cette méthode est basée sur la réponse immunitaire à corps étranger déclenchée par l'implantation sous cutanée d'un biomatériau cylindrique. Le biomatériau est alors encapsulé par un tissu collagénique produit par les cellules de l'hôte. Après un temps de maturation suffisant, l'ensemble est explanté et le biomatériau support retiré. La capsule fibreuse est ensuite greffée en position de substitut vasculaire [190]. Comme mentionné dans le paragraphe 3.1.3 *Autres substituts vasculaires*, ce concept a tout d'abord été proposé par Sparks à la fin des années 1960 [63].

Au début des années 2000, Campbell et ses collaborateurs ont proposé d'implanter le biomatériau dans la cavité péritonéale afin que la face interne de la capsule soit recouverte par des cellules mésothéliales dont les propriétés anticoagulantes sont similaires à celles des cellules endothéliales [66]. Enfin, plus récemment, ce concept a été repris par deux autres groupes de recherche.

Ainsi, l'équipe de Rotmans *et al.* a démontré qu'un traitement de surface du copolymère support (poly(éthylène oxyde téréphthalate) et poly(butylène téréphthalate)) avec du chloroforme augmentait l'adhésion et la prolifération cellulaire et favorisait l'encapsulation [191]. Les substituts vasculaires, produits après implantation et maturation de ces biomatériaux en site sous cutané, ont été évalués dans deux modèles autologues de gros animaux. Après 4 semaines d'implantation dans la carotide de porc, le taux de perméabilité de ces greffons était de 88 %. De plus, leurs surfaces luminales étaient entièrement recouvertes de cellules endothéliales et leurs parois présentaient des cellules positives pour l' α -SMA [192]. Lors d'expérimentations réalisées chez la chèvre, les substituts vasculaires présentaient une résistance à l'éclatement de 2392 ± 129 mmHg et une rétention à la suture de $2,0 \pm 0,5$ N. Après implantation en position d'abord vasculaire, 80 % et 67 % des greffons étaient perméables à 1 et 2 mois respectivement [67].

D'autre part, avec la réalisation de deux accès vasculaires chez l'Homme, les travaux de Nakayama *et al.* se sont largement distingués. Dès 2004, ce groupe démontre que la production *in vivo* d'un « biotube » est possible après implantation sous cutanée d'un tube en silicone chez le lapin pendant 2 mois [193]. Ces greffons, dont les extrémités étaient renforcées par des éponges en polyuréthane, ont ensuite été implantés dans la carotide de lapins traités par anticoagulant. A 12 semaines, les substituts vasculaires étaient colonisés par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de l'hôte et 82 % d'entre eux étaient perméables [194]. De plus, dans un de ces animaux, le greffon n'a pas été obstrué pendant plus de deux ans [195]. Afin de contrôler l'épaisseur pariétale des « biotubes », les travaux de ce groupe sont ensuite portés sur l'optimisation du design du dispositif implanté en sous cutané. Un système avec un tube en silicone entouré d'une cage (« biotube de type C ») a finalement été retenu. En effet, la résistance à l'éclatement ainsi que le taux de perméabilité à une semaine de ces greffons étaient significativement supérieurs (1825 mmHg, 100 %) par rapport à ceux obtenus avec la méthode classique (944 mmHg, 33 %) [196]. Ces substituts ont ensuite été validés en position d'abord vasculaire chez le chien.

Après 4 semaines d'implantation, tous étaient perméables sans signe d'anévrisme ni d'hémorragie imputables aux ponctions répétées des aiguilles d'hémodialyse [197]. L'ensemble de ces données a permis l'implantation de greffons autologues en position d'abord vasculaire chez 2 patients atteints d'insuffisance rénale chronique en stade terminal. Ainsi, des « biotubes de type C » de 7 cm de long et de 6 mm de diamètre interne, ont été obtenus après 2 mois d'implantation sous cutanée dans la zone abdominale (*figure 20*).

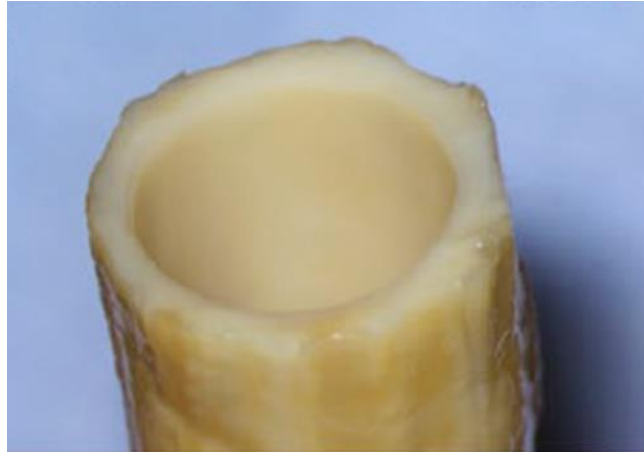


Figure 20 : Substitut vasculaire développé par Nakayama et al. [28]

Après 2 ans de suivi, les deux greffons étaient perméables. Pour un substitut aucune intervention n'a été nécessaire alors que pour l'autre deux angioplasties (à 7 mois et à 2 ans) ont été réalisées [28]. Ces résultats sont favorables. Cependant, la présence de deux sites opératoires, la difficulté de mise en place d'un contrôle qualité, ainsi que l'impossibilité de produire le substitut vasculaire à l'avance constituent les principales limites de cette technique.

Une étude portant sur l'évaluation d'un biotube décellularisé xénogénique a donc récemment été publiée par ce même groupe [198]. Ainsi, des tubes en silicone ont été implantés en sous cutané pendant 4 semaines chez le chien. Après explantation, les biotubes obtenus ont été décellularisés avec du SDS et du TritonX-100 et transplantés dans l'aorte abdominale de trois rats Wistar. Après 1 mois, les greffons ne présentaient aucun signe de thrombose et étaient colonisés par les cellules de l'hôte [198]. Ces données prometteuses doivent néanmoins être confirmées par d'autres expérimentations *in vivo* avec un plus grand nombre d'animaux et un suivi à plus long terme.

4.3.3 Synthèse des solutions proposées par l'ingénierie tissulaire

Afin de développer un substitut vasculaire de petit diamètre (≤ 6 mm), différentes approches ont été proposées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

Les principales informations concernant les stratégies les plus prometteuses figurent dans le *tableau 7*. Toutes ces techniques ont fourni des résultats satisfaisants en termes de perméabilité et d'intégration du greffon après les temps de suivi indiqués. Cette liste se limite aux stratégies qui ont atteint les essais cliniques ou les expérimentations *in vivo* dans un modèle de gros animal. Néanmoins, concernant les matrices biologiques produites à partir de tissus humains, les travaux de McFetridge, portant sur le développement d'un substitut vasculaire obtenu par roulage de MAH décellularisée, ont été mentionnés. En effet, compte tenu du sujet de notre thèse, la comparaison de cette étude avec les autres était particulièrement pertinente.

Abréviations du tableau 7 :

CE = Cellules endothéliales

BM-MNC = *Bone Marrow mononuclear cells*

CML = Cellules musculaires lisses

PE = Pression à l'éclatement

RS = Résistance à la suture

C = Compliance

\emptyset int = Diamètre interne

	Stratégie	Groupe leader	Substitut vasculaire	Temps de culture cellulaire	Avantages	Inconvénients	Ø int	Site d'implantation	n	Suivi	Réf
E C H A F A U D A G E E X O G E N E	Polymères synthétiques permanents	Zilla	CE autologues + ePTFE	2 semaines	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés mécaniques suffisantes (ePTFE) Recul clinique (ePTFE) 	<ul style="list-style-type: none"> 2 temps chirurgicaux / 2 sites opératoires Disponibilité immédiate impossible Absence de résorption <i>in vivo</i> Coût élevé 	6 et 7 mm	Pontage fémoro-poplitée (au-dessus et en-dessous du genou) chez l'Homme	341	10 ans	[20]
	Polymères synthétiques résorbables	Shin'oka	BM-MNC autologues + PCL/PLA + squelette de PGA	x	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical Bonne intégration chez l'hôte Disponibilité immédiate Résorption <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 2 sites opératoires Propriétés mécaniques faibles 	12 à 24 mm	Connexion cavopulmonaire extra cardiaque chez l'enfant	25	11 ans	[21]
	Polymères naturels	Liu	Chitosane + Gélatine + Héparine	x	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical / 1 site opératoire Disponibilité immédiate Résorption <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés mécaniques = données non disponibles 	2 mm	Artère fémorale chez le chien	7	9 mois	[22]
	Substituts hybrides	Jockenhoevel	CML et fibroblastes autologues + Fibrine + PLA	4 semaines	<ul style="list-style-type: none"> Résorption <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 2 temps chirurgicaux / 2 sites opératoires Propriétés mécaniques ≤ aux vaisseaux natifs PE = 466 ± 78 mmHg (Ø int = 4,3 mm, 21 jours de culture) [19] RS = donnée non disponible C = donnée non disponible Disponibilité immédiate impossible Coût élevé 	5 mm	Artère carotide chez le mouton	6	6 mois	[23]
E C H A F A U D A G E E N D O G E N E	Supports de polymères synthétiques résorbables	Niklason	CML allogéniques + Echafaudage en PGA + Décellularisation (CHAPS + SDS)	8 semaines	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical / 1 site opératoire Propriétés mécaniques suffisantes PE = 2914 ± 928 mmHg RS = 2,10 ± 0,53 N C = 3,3 ± 0,8 %/100 mmHg (Ø int = 6 mm) [112] Disponibilité immédiate 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé 	6 mm	Abord vasculaire chez l'Homme (Insuffisance rénale terminale)	60	16 mois	[24]
	Supports de polymères naturels	Tranquillo	Fibroblastes de derme humain + Tube de fibrine bovine + Décellularisation (SDS + DNase)	8 semaines	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical / 1 site opératoire Propriétés mécaniques suffisantes PE = 3164 ± 324 mmHg RS = 1,99 ± 0,56 N C = 11 ± 1 %/100 mmHg (Ø int = 4 mm) [161] Disponibilité immédiate 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé 	6 mm	Abord vasculaire chez le babouin	6	6 mois	[25]
	Absence de support	L'Heureux	Feuillets de matrice extra-cellulaire (fibroblastes allogéniques) + Assemblage par roulage + Dévitalisation	24 semaines	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical / 1 site opératoire Propriétés mécaniques suffisantes PE = 5783 ± 675 mmHg RS = 3,27 ± 0,71 N C = 2,5 ± 0,5 %/100 mmHg Disponibilité immédiate 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé 	4,8 mm	Abord vasculaire chez l'Homme (Insuffisance rénale terminale)	3	11 mois	[26]
	Matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains	McFetridge	CML humaines + MAH + Décellularisation (SDS + DNase) + Assemblage par roulage	4 semaines	<ul style="list-style-type: none"> 1 temps chirurgical / 1 site opératoire Disponibilité immédiate 	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés mécaniques ≤ aux vaisseaux natifs PE = 1430 ± 250 mmHg RS = donnée non disponible C = 7,9 %/mmHg (Ø int = 4,2 mm) [183] Contrôle qualité difficile 	3,2 mm	Artère carotide chez le lapin	3	1 mois	[27]
	Utilisation du corps comme bioréacteur	Nakayama	Capsule fibreuse autologue	8 semaines (implantation sous cutanée)	<ul style="list-style-type: none"> Propriétés mécaniques proches des vaisseaux natifs PE = 2017 ± 391 mmHg RS = donnée non disponible C = donnée non disponible En théorie, meilleure intégration chez l'hôte 	<ul style="list-style-type: none"> 2 temps chirurgicaux Disponibilité immédiate impossible Contrôle qualité difficile 	6 mm	Abord vasculaire chez l'Homme	2	2 ans	[28]

Tableau 7 : Stratégies les plus avancées en ingénierie tissulaire vasculaire

Parmi toutes ces stratégies, l'utilisation de matrices obtenues grâce à la culture de fibroblastes de derme humain nous apparaît la plus prometteuse. En effet, elle permet l'obtention d'un substitut vasculaire humain entièrement biologique sans jamais avoir recours à un biomatériau support. Cette approche semble particulièrement intéressante lorsqu'elle est associée au tissage. Cette méthode d'assemblage permet, en effet, de s'affranchir de l'étape de maturation en bioréacteur et donc de limiter les coûts de production. Cependant, le coût lié à la production des feuillets de matrice extracellulaire reste la principale limite de cette technique. Pour pallier à cela, l'utilisation d'un tissu biologique humain disponible à moindre coût et en grande quantité semble être une voie de recherche intéressante.

5. Membrane amniotique humaine

Parmi les tissus biologiques, la membrane amniotique humaine (MAH) est un déchet opératoire pouvant être récupéré à l'issue de l'accouchement. Elle est donc disponible en grande quantité et à moindre coût. De plus, elle présente une faible immunogénicité et des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires ce qui lui confère un caractère particulièrement attractif en ingénierie tissulaire. Ce chapitre traitera donc : de (1) l'anatomie et de l'histologie de la MAH, de (2) ses principales propriétés, de (3) ses différentes possibilités de traitements et de (4) son utilisation en clinique et en ingénierie tissulaire.

5.1 Anatomie et histologie

Le placenta et les membranes fœtales se mettent en place quelques jours après la fécondation. Ces structures permettent les échanges métaboliques et gazeux entre la mère et le fœtus et constituent également une barrière protectrice. Les membranes fœtales sont constituées du chorion à l'extérieur et de la MAH ou amnion à l'intérieur. La MAH correspond donc au tissu le plus interne entourant le fœtus lors du développement embryonnaire [31,32,199]. Elle est représentée en jaune sur la *figure 21*.

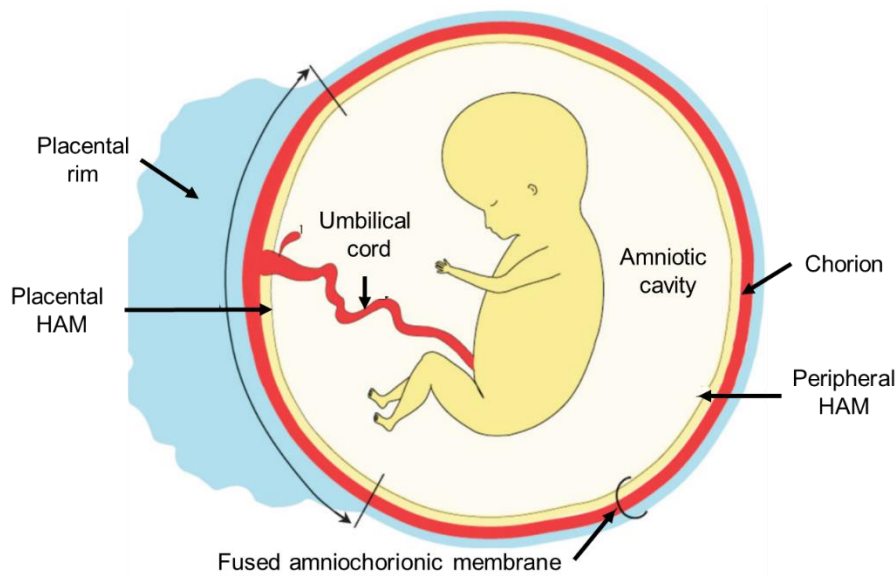


Figure 21 : Situation anatomique de la membrane amniotique humaine [31]

La MAH se compose d'une couche conjonctive, qui n'est ni vascularisée ni innervée, et d'un épithélium unistratifié cubique directement en contact avec le liquide amniotique. Ces cellules épithéliales expriment des marqueurs des cellules souches et reposent sur une membrane basale riche en collagène de type IV, laminine, fibronectine et nidogène. La composante conjonctive est divisée en trois couches contenant du collagène de type I et III. De l'intérieur vers l'extérieur, peuvent être distinguées : (1) une couche conjonctive dense et acellulaire, (2) une couche conjonctive lâche et (3) une couche spongieuse composée essentiellement de protéoglycanes. Enfin, le chorion sous-jacent, qui lui est vascularisé, permet par diffusion, la nutrition et l'oxygénation de la MAH (*figure 22*) [31,32,199].

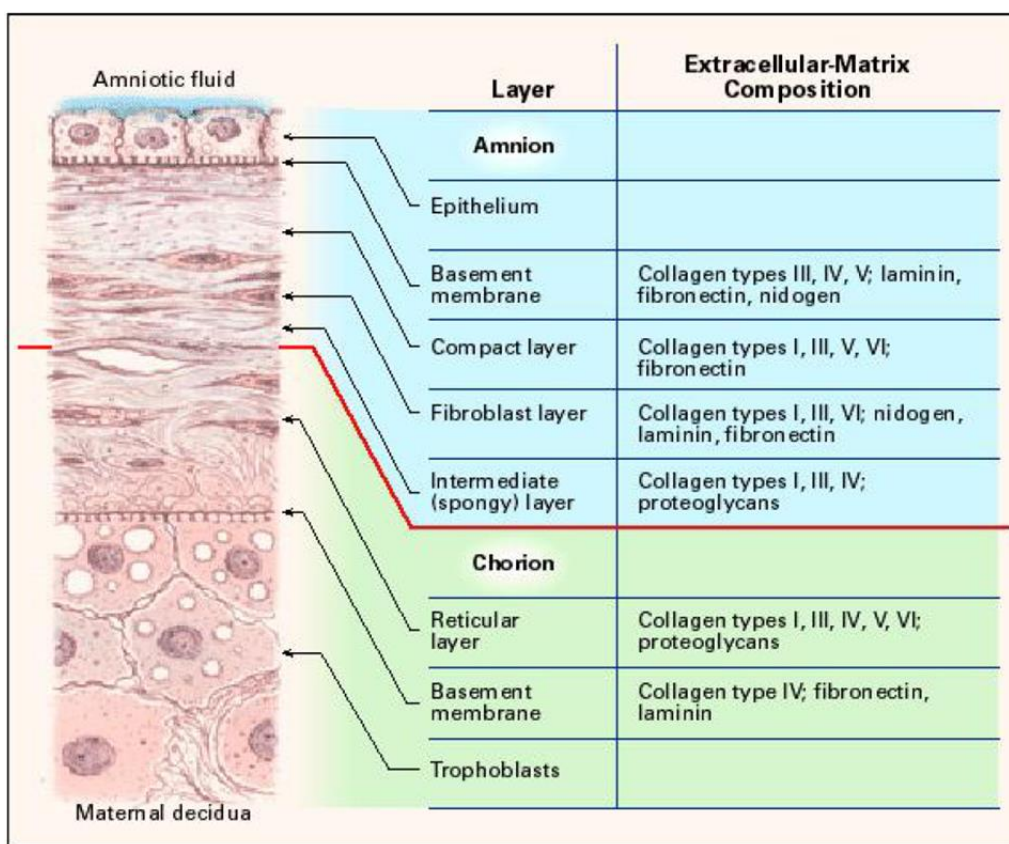


Figure 22 : Histologie de la membrane amniotique humaine [32]

5.2 Principales propriétés

Ce paragraphe présente les principales caractéristiques biologiques et mécaniques de la MAH ainsi que les différents mécanismes qui sous-tendent ces propriétés.

5.2.1 Sur le plan biologique

5.2.1.1 Faible immunogénicité

La faible immunogénicité de la MAH est due d'une part, à l'absence d'expression des antigènes leucocytaires humaines (*Human Leucocyte Antigen* (HLA)) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II ; et d'autre part, à l'expression de molécules immunorégulatrices comme HLA-G et Fas-ligand [32,199].

De manière générale, HLA-A, HLA-B et HLA-C sont exprimées par toutes les cellules nucléées et permettent à l'organisme de discriminer le soi du non soi (CMH de classe I). De plus, HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR se trouvent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et permettent l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à l'agresseur (CMH de classe II). Au niveau des cellules de la MAH, seul HLA-G (CMH de classe I) est exprimé. En inhibant l'activité cytolytique des cellules *Natural Killer*, cette molécule permet au fœtus de ne pas être rejeté par l'organisme maternel bien que leurs génomes soient seulement compatibles de moitié. Les cellules de la MAH expriment également le Fas-ligand. La liaison de cette molécule avec son récepteur présent à la surface des lymphocytes T activés induit l'apoptose de ces cellules et contribue par conséquent à la tolérance fœto-maternelle [29,200].

5.2.1.2 Propriétés antimicrobiennes

Par ailleurs, grâce à l'expression de peptides appartenant à la famille des β -défensines, la MAH possède des propriétés antimicrobiennes. Le spectre d'activité de ces molécules est très large et comprend les bactéries, les virus enveloppés, les champignons et les protozoaires. Après fixation, ces molécules perméabilisent la membrane de ces microorganismes entraînant ainsi leurs destructions [30,201].

De plus l'expression de protéines acides de lactosérum (*Whey Acidic Protein* (WAP)) a également été mise en évidence au niveau de la MAH. Cette famille de protéines comprend l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI)) et l'élafine. Ces protéines présentent à la fois une activité antimicrobienne et anti-inflammatoire. Néanmoins, à ce jour, leurs modes d'action sont mal connus [201].

5.2.1.3 Propriétés anti-inflammatoires

Les propriétés anti-inflammatoires de la MAH résultent de l'association de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, les cellules de la MAH expriment des cytokines anti-inflammatoires, comme l'antagoniste au récepteur de l'interleukine 1 (*interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1RA)) et l'IL-10. En se liant à son récepteur, IL-1RA empêche la fixation de l'IL-1 et inhibe ainsi une cascade de réactions qui aboutit à la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-10, quant à elle, inhibe la production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2 et le facteur de nécrose tumorale α (*Tumor Necrosis Factor α* (TNF α)). De plus, une étude *in vitro* a récemment démontré que la culture de macrophages en présence de milieux conditionnés de cellules mésenchymateuses de la MAH favorisait le passage du phénotype M1 (pro-inflammatoire) vers un phénotype M2 (anti-inflammatoire). Enfin, la production d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (*tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP)) par les cellules mésenchymateuses de la MAH permet, grâce à la formation de complexes, de neutraliser les métalloprotéases matricielles et donc d'éviter une destruction excessive de la matrice extracellulaire. [32,202–204].

5.2.1.4 Réépithélialisation favorisée

Plusieurs études ont aussi démontré que la MAH favorisait la réépithélialisation [32,199]. En effet, elle contient des facteurs de croissance comme le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor* (EGF)) ou le facteur de croissance des kératinocytes (*Keratinocyte Growth Factor* (KGF)) qui sont des promoteurs de la différenciation épithéliale. De plus, en diminuant l'expression du facteur de croissance transformant β (*Transforming Growth Factor β* (TGF- β)), les cellules de la MAH inhibent l'activation des fibroblastes conférant à cette membrane des propriétés anti-fibrotiques et pro-cicatrisantes. Ainsi, lorsque ce tissu est appliqué sur une plaie, grâce à la membrane basale qu'il contient, il facilite la migration des cellules épithéliales et évite l'invasion fibroblastique [32,199].

5.2.1.5 Propriétés pro- et anti-angiogéniques

La présence de ces deux propriétés au sein d'un même tissu s'explique par la production de facteurs pro-(VEGF, IL-6 et IL-8) et anti-angiogéniques (thrombospondine, TIMP, IL-1RA et IL-10) par les cellules de la MAH [205,206]. Ainsi, les travaux de Niknejad *et al.* ont révélé que la face épithéliale de la MAH inhibe l'angiogenèse contrairement à la face conjonctive qui elle, favorise ce phénomène [207]. Différentes publications ont également établi que la MAH peut être utilisée comme support pour la culture de cellules endothéliales [208,209].

5.2.2 *Sur le plan mécanique*

La MAH est un tissu hautement déformable qui supporte un étirement progressif dû à la croissance de l'embryon tout en le protégeant des éventuels traumatismes extérieurs [210,211]. Dès 1990, Oxlund et ses collaborateurs ont mis en évidence que la MAH est en grande partie responsable de la force mécanique des membranes fœtales [210]. Ensuite, El Khwad *et al.* ont démontré que chaque membrane présente une zone de faiblesse correspondant à la portion de tissu recouvrant le col de l'utérus (*cervix*) [212]. Cette région présente des caractéristiques biochimiques et histologiques particulières facilitant le processus de rupture des membranes fœtales lors de la délivrance [213–215]. Par ailleurs, d'autres groupes de recherche ont publié des études portant sur le caractère viscoélastique de ce tissu et sur ses propriétés mécaniques intrinsèques [211,216–218]. Enfin, la MAH étant un tissu biologique, l'étude de ses propriétés mécaniques en fonction des donneurs paraît particulièrement intéressante. Aucune publication n'existant à ce sujet, cette thématique de recherche a fait l'objet d'un premier article présenté dans le paragraphe 1.2 Article n°1.

5.3 Différentes possibilités de traitements

Toutes ces propriétés confèrent à la MAH un caractère particulièrement attractif. De plus, le placenta et les membranes fœtales étant considérés comme des déchets opératoires sur le plan juridique, ils peuvent être récupérés relativement facilement après l'accouchement, sous réserve de l'accord de la patiente. Afin d'éviter toute contamination par la flore vaginale, les accouchements par césarienne sont exclusivement utilisés. Une fois l'intervention terminée, le placenta et les membranes fœtales sont transférés en laboratoire dans un milieu de transport approprié. L'ensemble est ensuite disséqué, la MAH est isolée en étant séparée manuellement du chorion.

Afin d'améliorer la disponibilité et la sécurité biologique de la MAH, différentes méthodes de préparation (état frais, décellularisation), de conservation (cryopréservation, lyophilisation) et de stérilisation (stérilisation aux rayons gamma, stérilisation à l'acide péracétique) ont été proposées. Ces traitements sont susceptibles de modifier les caractéristiques biologiques et mécaniques de la MAH. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association (*figure 23*) [219,220].

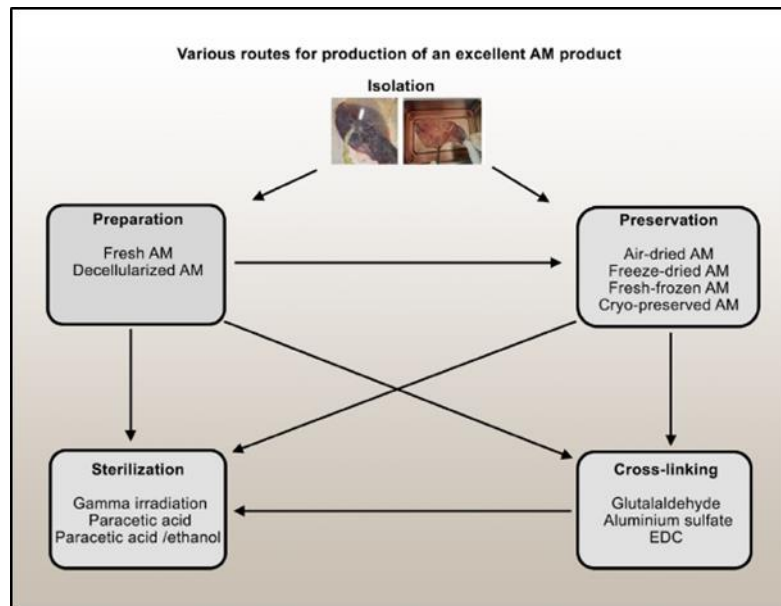


Figure 23 : Traitements possibles pour la membrane amniotique humaine [220]

Remarque : Les traitements par réticulation ne seront pas abordés. En effet, ils causent un tel niveau de dénaturation que nous considérons que la nature biologique du tissu est perdue.

5.3.1 Préparation

L'utilisation de la MAH directement après la dissection des membranes fœtales (MAH « fraîche ») permet de préserver la viabilité des cellules, les protéines de la matrice extra cellulaire et les facteurs de croissance. Néanmoins avec cette technique, le stockage à moyen ou long terme des échantillons est impossible [220].

Afin de diminuer l'immunogénicité de la MAH « fraîche », certains groupes de recherche ont proposé de l'utiliser sous forme décellularisée [219,220]. Pour ce faire, différents protocoles basés sur des techniques physiques et / ou chimiques (digestion enzymatique, solution détergente, etc.) ont été décrits [219–222].

Quelle que soit la méthode employée, la décellularisation élimine les cellules épithéliales et mésenchymateuses de la MAH entraînant une exposition de la membrane basale ce qui favorise, l'adhésion et la prolifération cellulaire lors d'ensemencements *in vitro* [219,220,223,224]. Enfin, bien que les facteurs de croissance soient partiellement ou totalement éliminés par ce type de traitement, la préservation des protéines de la matrice extracellulaire permet à la MAH décellularisée d'avoir des propriétés mécaniques équivalentes à celles du tissu frais [223,225].

5.3.2 Conservation

Malgré une sélection rigoureuse des patientes en fonction de leurs sérologies, leurs séroconversions *a posteriori* est possible. Ainsi, dans de nombreux pays, les autorités recommandent de conserver la MAH pendant plusieurs mois et de confirmer leur innocuité par des tests sérologiques avant de les utiliser. Cette stratégie de sécurité est rendue possible grâce à la cryopréservation ou à la lyophilisation qui sont les méthodes de conservation de longue durée les plus utilisées [219,220].

Ainsi, la MAH peut être cryopréservée à -80°C dans des milieux de conservation contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO) 10 % ou du glycérol 50 %. La MAH peut aussi être conservée, sous forme lyophilisée, pendant plusieurs mois à température ambiante [219,220]. Contrairement à la cryopréservation, ce mode de conservation ne nécessite pas de matériel de stockage particulier et permet un transport facilité des échantillons puisque le respect de la chaîne du froid n'est pas nécessaire. Ensuite, bien que l'activité antibactérienne soit préservée par ces deux techniques [226], la MAH cryopréservée et la MAH lyophilisée présentent une viabilité cellulaire et des propriétés mécaniques significativement inférieures à celles de la MAH « fraîche » [209,225,227]. Enfin, la destruction d'une grande partie des facteurs de croissance est également observée. Cependant ce phénomène est moins marqué pour les échantillons cryopréservés [228,229].

5.3.3 Stérilisation

Même si de nombreuses précautions en termes d'asepsie sont prises lors des étapes de prélèvement, de dissection et de conservation de la MAH; le recours à une méthode de stérilisation est préférable afin d'éviter tout risque de transmission d'infection lors de l'implantation. Dans le cas de la MAH, la stérilisation aux rayons gamma et la stérilisation à l'acide peracétique sont les techniques les plus fréquemment utilisées [219,220].

La stérilisation aux rayons gamma est basée sur la destruction des microorganismes grâce à l'émission de rayons ionisants par une source radioactive. En effet, ces rayonnements entraînent directement ou indirectement (par l'intermédiaire de radicaux libres) des dommages génétiques et protéiques conduisant à la destruction des bactéries, des virus et des champignons. Du fait de la forte pénétration de ces rayonnements, la possibilité de stérilisation à travers l'emballage constitue un des principaux avantages de cette méthode [230]. Selon l'*International Atomic Energy Agency* (IAEA), la dose de 25 kGy correspond à la référence pour la stérilisation des tissus biologiques utilisés pour les greffes [231]. Bien que cette dose soit compatible avec une utilisation clinique de la MAH [232], elle est à l'origine de modifications histologiques (condensation de la chromatine, destruction des faisceaux de fibres de collagène) et donc d'une diminution des propriétés mécaniques [233–235]. Ces changements sont plus ou moins marqués selon le traitement de conservation associé. La cryopréservation dans du glycérol semble, par exemple, avoir un effet protecteur [236].

L'acide peracétique est un agent de stérilisation chimique à fort pouvoir oxydant. Il est efficace sur les bactéries, les virus et les champignons [237]. Son principal avantage réside dans sa décomposition en deux résidus faiblement toxiques pour l'organisme : l'acide acétique et le peroxyde d'oxygène [238]. De plus, cette méthode de stérilisation assure une meilleure préservation des protéines de la matrice extracellulaire et donc une plus grande conservation des propriétés mécaniques par rapport à la stérilisation aux rayons gamma [222,233].

5.4 Utilisation en clinique et en ingénierie tissulaire

Du fait de sa disponibilité, de ses propriétés et de son faible coût, la MAH est un tissu biologique extrêmement attractif utilisé en clinique et en ingénierie tissulaire.

En clinique, la première utilisation de la MAH pour réparer de la cornée a été décrite par De Roth en 1940 [239]. Aujourd'hui, la greffe de MAH fait partie des traitements proposés en ophtalmologie pour soigner les pathologies oculaires de surface [240]. En France, cette thérapeutique est pratiquée en routine depuis plus de 10 ans. Par ailleurs, en dermatologie, des essais cliniques portant sur l'utilisation de la MAH pour traiter les brûlures ou les ulcères de pieds diabétiques sont actuellement en cours [241,242].

En ingénierie tissulaire, la MAH peut être utilisée comme une source de cellules souches ou comme une matrice biologique [32]. Le recours à ce tissu comme échafaudage a, par exemple, été décrit dans les domaines de la régénération osseuse [243–245], cartilagineuse [246], parodontale [247], nerveuse [248] et vasculaire [27,183,185]. Les approches portant sur l’usage de la MAH en ingénierie tissulaire vasculaire sont détaillées dans le paragraphe dédié aux matrices biologiques obtenues à partir de tissus humains et animaux (page 59).

De par ses propriétés biologiques et mécaniques, la MAH est très populaire en ingénierie tissulaire. Pour la régénération vasculaire, différentes approches utilisant ce tissu comme matrice ont été décrites. En s’inspirant de la stratégie basée sur l’assemblage de feuillets de matrice extracellulaire développée par L’Heureux *et al.* [166], l’équipe de McFetridge a mis au point un modèle de greffon obtenu par roulage de MAH. Ce tissu étant disponible facilement et en grande quantité, son utilisation permet de s’affranchir des étapes de culture cellulaire liées à la production des feuillets. Cependant, pour obtenir la fusion entre les différentes couches de membrane, l’ensemble doit êtreensemencé avec des CML humaines et cultivé en bioréacteur pendant 1 mois [27,183]. Afin de supprimer cette étape et de réduire encore les coûts de production, le recours à une autre méthode d’assemblage est une piste de réflexion intéressante.

6. Tissage dans la production de substituts vasculaires

Des textiles sont entre autres utilisés en ingénierie tissulaire cardiovasculaire [33,249,250] et musculo-squelettique [251]. Ces technologies permettent de produire des structures complexes à partir de fils mono ou multi filaments. Selon la manière dont les fils sont entrelacés, trois techniques sont décrites: (1) le tressage, (enchevêtrement de trois fils ou plus), (2) le tricotage (assemblage de fils grâce à des boucles) et (3) le tissage (entrecroisement orthogonal des fils). Parmi ces procédés, seul le tissage permet l'obtention d'une structure faiblement poreuse [33,252]. Aussi, compte tenu du sujet de notre thèse, nous avons porté une attention toute particulière à cette méthode d'assemblage. Ainsi, ce chapitre décrit les grands principes du tissage, ses avantages, ses inconvénients et son utilisation en ingénierie tissulaire vasculaire.

6.1 Définition et principes

Le tissage est un procédé de production de tissu dans lequel deux ensembles de fils sont entrelacés à angle droit. Les fils verticaux constituent les fils de chaîne (*warp*) et les fils horizontaux, les fils de trame (*weft*). L'armure décrit la façon dont ces fils s'entrecroisent les uns avec les autres. En deux dimensions, il en existe trois principaux types : la toile (*plain weave*), le sergé (*twill weave*) et le satin (*satin weave*) (figure 24). L'assemblage de plusieurs couches tissées grâce à d'autres types d'armures est également possible et permet d'obtenir des structures en trois dimensions [33,252].

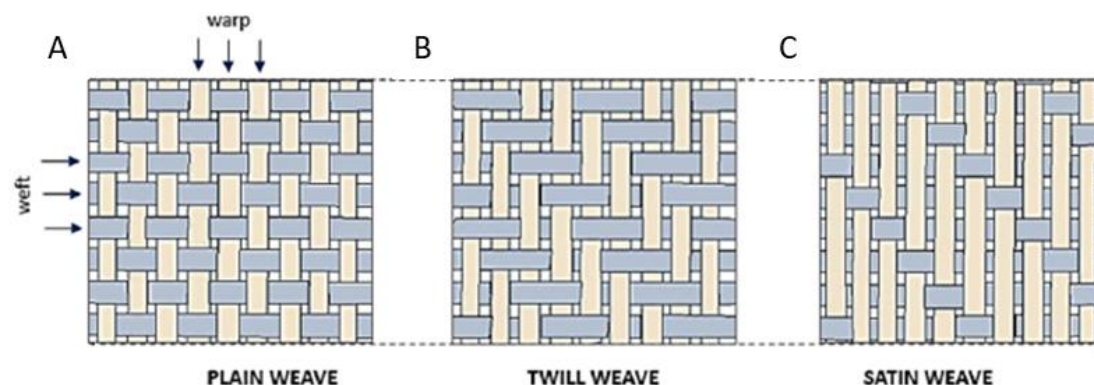


Figure 24 : Armures de tissage [33]

En armure toile, le fil de trame passe alternativement au-dessus d'un fil de chaîne puis en-dessous du fil de chaîne suivant (*figure 24a*). Même si les fils se croisent toujours de manière orthogonale, certaines variations sont possibles. Sur l'exemple d'armure sergé présenté en *figure 24b*, le fil de trame passe successivement au-dessus de deux fils de chaîne puis en-dessous des deux fils de chaîne suivant. Ainsi, le tissu obtenu sera caractérisé par la présence de côtes obliques sur l'endroit. Sur l'exemple d'armure satin présenté en *figure 24c*, le fil de trame passe en-dessous de quatre fils de chaîne puis au-dessus d'un fil de chaîne. Les fils de chaîne seront donc particulièrement exposés sur l'endroit du tissu [33,252].

6.2 Avantages de l'assemblage par tissage

Ce mode d'assemblage est tout d'abord hautement adaptable. En effet, la nature des fils tissés, leur diamètre, leur nombre ainsi que le choix du type d'armure sont autant de paramètres facilement modifiables qui influencent grandement les caractéristiques (flexibilité, état de surface, porosité) du tissu obtenu. Ensuite, les structures tissées sont faiblement poreuses. Cette propriété est particulièrement intéressante en ingénierie tissulaire vasculaire. En effet, elle permet au greffon d'avoir une imperméabilité pariétale suffisante pour éviter toute fuite sanguine, tout en laissant possible les échanges avec le tissu environnant, permettant par exemple, la colonisation par des cellules de l'hôte. Enfin, le tissage est une technique d'assemblage simple qui lorsqu'elle est automatisée, permet de produire des structures tissées rapidement et en grande quantité [33,252,253].

6.3 Inconvénients de l'assemblage par tissage

Tout d'abord, les structures tissées ont tendance à s'effilocheur lorsque leurs extrémités sont coupées, ce qui peut poser problème lors des sutures [254]. Ensuite, la principale limite de l'assemblage par tissage réside dans la faible compliance des produits obtenus [253]. Cette propriété est cependant importante en ingénierie tissulaire vasculaire.

En effet, elle permet au vaisseau sanguin de se distendre radialement et longitudinalement en fonction de la pression sanguine.

La faible compliance des structures tissées s'explique par l'entrelacement orthogonal des fils de trame et des fils de chaîne ce qui limite grandement la déformation radiale et longitudinale du substitut vasculaire. De plus, il est important de noter qu'une différence de compliance entre les vaisseaux natifs et le greffon peut entraîner des zones de traction et de fatigue au niveau des sutures ainsi qu'une perturbation importante du flux sanguin au niveau des anastomoses, favorisant l'hyperplasie intinale [33,252]. Ce phénomène décrit dans le paragraphe 3.3.2 *Hyperplasie intinale* entraîne un rétrécissement du calibre luminal du substitut vasculaire. Cette sténose se complique fréquemment d'une thrombose.

Afin d'améliorer la compliance des structures tissées, différentes solutions ont été proposées. Parmi elles, le crêpage, couramment utilisé dans le cas des prothèses vasculaires en PET, consiste en l'ondulation des parois du greffon grâce à un traitement thermomécanique. Ce procédé permet d'augmenter la compliance longitudinale du substitut vasculaire et de diminuer sa rigidité à la flexion, ce qui réduit son risque de plicature lorsqu'il est courbé [253]. Ces phénomènes sont d'autant plus importants que les ondulations sont étroites et hautes [255]. Cependant, le crêpage a pour principal inconvénient de modifier la cinétique du flux sanguin [253]. L'utilisation de fils plus élastiques a également été envisagée [254]. Enfin, un système coaxial basé sur l'association de biomatériaux plus ou moins élastiques répartis en plusieurs couches a été proposé [256]. Ainsi, un modèle de substitut vasculaire composé d'un tissage interne de polytriméthylène téréphtalate (élastique) et d'un tissage externe de PET (rigide) a été mis au point par Chen *et al.* Les résultats *in vitro* ont montré qu'à basse pression, la contrainte était absorbée par la couche interne alors que lorsque la pression était plus élevée, la couche externe était sollicitée. La compliance globale du substitut vasculaire était donc augmentée [257]. Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée à ce jour.

6.4 Exemples de substituts vasculaires tissés

Du fait de ses nombreux avantages, l'assemblage par tissage a été utilisé pour produire des substituts vasculaires. En fonction de la nature des fils utilisés, différents groupes de recherche se sont distingués.

Le tissage de **fils synthétiques non résorbables** a été proposé en 1952 par Voorhees. En effet, à cette époque, des greffons en Vinyon N tissé ont été implantés avec succès dans l'aorte abdominale du chien [258]. Suite à cela, de nombreuses études ont porté sur les substituts vasculaires en fils synthétiques non résorbables tissés [259]. Aujourd'hui, comme mentionné dans le paragraphe 3.1.2.2 *Polyéthylène téréphtalate (PET)*, les greffons en PET tissé sont largement utilisés clinique.

L'assemblage par tissage de **fils synthétiques résorbables** a également été étudié. En 2008, l'équipe de Sawa *et al.* a implanté, dans l'artère carotide du chien, un substitut vasculaire composé d'un tissage interne de fils de PLA et d'un tissage externe de fils de PGA. Après 1 an de suivi, les quatre greffons étaient perméables. Des cellules endothéliales ainsi que des cellules musculaires lisses ont respectivement été mises en évidence au niveau de la lumière et de la paroi des greffons [260].

Deux ans plus tard, Sata *et al.* ont proposé un modèle constitué de trois couches tissées de fibroïne de soie. Ce prototype obtenu par tissage de **fibres naturelles** a été implanté avec succès dans l'aorte abdominale de rats Sprague-Dawley. A 1 an, les greffons étaient perméables et colonisés par les cellules de l'hôte [142].

Enfin, récemment, L'Heureux *et al.* ont produit un substitut vasculaire entièrement biologique en tissant des **fils de matrice extracellulaire** obtenus par culture de fibroblastes de derme humain. Les tests réalisés *in vitro* ont démontré que les propriétés mécaniques de ces greffons étaient largement supérieures à celles des vaisseaux natifs. De plus, un greffon a été implanté avec succès dans l'artère carotide d'une brebis [171].

Les fils utilisés dans l'étude citée précédemment étaient obtenus grâce à la découpe de feuillets de matrice extracellulaire synthétisée par des fibroblastes de derme humain cultivés pendant 8 semaines. Afin de simplifier ce procédé, le recours à une matrice disponible en grande quantité et à moindre coût a été envisagé. Compte tenu, de ses nombreux avantages, la MAH est apparue comme un tissu de choix. Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse est de développer un substitut vasculaire produit par tissage de fils de la MAH.

OBJECTIFS

En réponse à la faible performance des prothèses synthétiques pour les revascularisations de petit diamètre (≤ 6 mm), des substituts vasculaires biologiques ont été développés comme alternative [24–28]. Parmi les différentes approches décrites en ingénierie tissulaire vasculaire, celle de proposée par L'Heureux et ses collaborateurs s'est particulièrement distinguée. En effet, elle est à la seule à produire des greffons biologiques avec des propriétés mécaniques suffisantes sans avoir recours à un échafaudage exogène [111].

Dans cette approche, les feuillets de matrice extracellulaire, produits grâce à la culture de fibroblastes de derme humain pendant 8 semaines, constituent la matière première permettant la fabrication des greffons. Une fois obtenus, ces feuillets sont enroulés autour d'un mandrin. L'ensemble est ensuite assemblé grâce à une période de maturation en bioréacteur de deux fois 8 semaines. Cette étape permet la fusion entre les différentes couches du « rouleau ». Grâce à la cohésion de la structure, le mandrin central peut alors être retiré et le substitut vasculaire est obtenu [166]. Bien que ces greffons aient été implantés avec succès en position d'abord vasculaire chez plusieurs patients présentant une insuffisance rénale chronique en stade terminal [26,168,170], leur coût de production très élevé et la complexité de la méthode sont les principaux obstacles à l'utilisation de cette méthode en routine clinique.

Afin de proposer une meilleure solution, deux modifications sont envisagées.

(1) Celle de la matière première : L'utilisation d'un tissu biologique disponible à moindre coût permettrait de remplacer avantageusement les feuillets de matrice extracellulaire obtenus grâce à la culture de fibroblastes. Dans ce contexte, la membrane amniotique humaine (MAH) apparaît comme une voie de recherche particulièrement intéressante. En effet, étant considéré comme un déchet opératoire sur le plan juridique, la MAH est disponible en grande quantité et gratuitement en France. De plus, sa structure et sa composition sont très proches de celles des feuillets de matrice extracellulaire [31,32,169]. Enfin, comme détaillé dans notre revue de littérature, ce tissu présente de nombreuses propriétés le rendant particulièrement intéressant pour l'ingénierie tissulaire et justifiant son utilisation pour certaines applications cliniques [31,32].

(2) Celle de la méthode d'assemblage : Afin de s'affranchir des infrastructures lourdes et des coûts élevés liés à la période de maturation en bioréacteur, L'Heureux *et al.* ont récemment proposé d'utiliser une méthode d'assemblage sans cellule inspirée du textile [171]. Cette approche basée sur le tissage est plus rapide que l'assemblage par roulage décrit précédemment [171]. Elle est également hautement polyvalente. En effet, les propriétés mécaniques des produits obtenus peuvent être facilement adaptées en modifiant le nombre et les caractéristiques des fils. Cette technique est aussi automatisable et donc compatible avec une production de masse [33]. Enfin, les résultats d'un doctorat mené parallèlement à ce travail ont démontré que les substituts vasculaires produits par tissage de fils de matrice extracellulaire obtenue par la culture de fibroblastes de derme humain, présentaient des propriétés mécaniques cliniquement pertinentes [171].

Ainsi, dans cette thèse, ces deux éléments ont été associés dans le but de produire, à moindre coût, un greffon vasculaire humain de petit calibre et entièrement biologique. Notre **objectif général** était donc de développer un nouveau type de substitut vasculaire produit par tissage de fils issus de la MAH.

La **première partie** de ce travail consistait en l'étude des propriétés mécaniques de ce tissu. Afin de réaliser une cartographie détaillée et reproductible, une méthode de découpe et d'échantillonnage ont tout d'abord été mises au point. Puis, une série d'expériences, basée sur des mesures d'épaisseur, des analyses histologiques et des tests mécaniques, a permis de sélectionner les paramètres mécaniques pertinents pour la suite de notre travail. La force maximale et l'allongement à la rupture ont été retenus. Ensuite, huit MAHs ont été cartographiées. Au total plus de 800 échantillons ont été testés en traction uniaxiale. Les résultats obtenus ont permis d'identifier, sur chaque membrane, deux zones présentant des caractéristiques mécaniques différentes en termes de force et d'étirabilité. Ces différences ont été corrélées avec des observations histologiques. Enfin, la variabilité de ces propriétés mécaniques entre les membranes a été étudiée.

La **deuxième partie** avait pour objectif la production de fils à partir de la MAH et leur caractérisation. Pour cela, des feuillets de MAH ont été découpés longitudinalement sous forme de fines bandelettes appelées rubans. Ces rubans pouvaient ensuite être torsadés pour former des fils. Nous avons tout d'abord démontré que le degré de compaction du tissu ainsi que ses propriétés mécaniques pouvaient être facilement modifiés par torsadage.

Ensuite, notre objectif à long terme étant l'implantation de nos substituts vasculaires dans un contexte allogénique, nous avons étudié les effets de la décellularisation et / ou de la stérilisation aux rayons gamma sur les caractéristiques histologiques et mécaniques de nos rubans qui sont les principales unités de construction de nos greffons.

Dans la **troisième partie**, les fils de MAH ont été assemblés par tissage manuel pour obtenir des substituts vasculaires entièrement biologiques de petit diamètre. Les conclusions obtenues dans la première partie nous ont alors permis d'optimiser l'utilisation de la MAH. Des expérimentations *in vitro* (pression à l'éclatement, rétention à la suture et perméabilité transmurale) ont démontré que les caractéristiques mécaniques de nos substituts vasculaires étaient compatibles avec une future implantation orthotopique chez l'animal.

Les résultats de la première partie sont présentés sous la forme d'un article publié dans « *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* ». Les résultats de la deuxième et de la troisième parties font l'objet d'un second article actuellement en préparation pour le journal « *Acta Biomaterialia* ».

RESULTATS

1. Cartographie des propriétés mécaniques de la membrane amniotique humaine

1.1 Introduction

Du fait de sa faible immunogénicité [29], de ses effets antimicrobiens [30] et anti-inflammatoires [31,32], et de ses propriétés cicatrisantes [32,199], la membrane amniotique humaine (MAH) est actuellement utilisée pour certaines applications cliniques et est également très populaire en ingénierie tissulaire. Sa structure histologique et sa composition protéique ont, par conséquent, largement été analysées [31,32,199].

Cependant, ses propriétés mécaniques sont peu documentées. En 1990, Oxlund *et al.* ont démontré que la MAH était en grand partie responsable de la force des membranes fœtales [210]. Depuis, d'autres groupes de recherche ont publié des travaux détaillés concernant son comportement viscoélastique et ses propriétés mécaniques intrinsèques [211,217]. A notre connaissance, seul El Khwad et ses collaborateurs ont étudié les propriétés mécaniques de ce tissu en fonction de la localisation des échantillons prélevés. Leurs résultats ont mis en évidence, au sein de la MAH périphérique (et plus particulièrement sur la portion tissulaire recouvrant le *cervix*), la présence d'une zone plus fragile avec des caractéristiques biochimiques et histologiques particulières [212]. Bien que ces observations soient cohérentes avec celles de McParland *et al.* [215], cette étude présentait des limites. Ces limites étaient, tout d'abord, en lien avec le patron d'échantillonnage utilisé qui était très peu dense et excluait de l'analyse la membrane recouvrant le disque placentaire. De plus, les propriétés mécaniques des échantillons étaient évaluées grâce à des tests de perforation. Cependant, les résultats de ce type de tests sont difficilement comparables entre montages expérimentaux et ne renseignent pas sur la directionnalité des forces. De plus, les contraintes générées par ces tests ne sont pas forcément représentatives de celles s'exerçant sur le tissu une fois implanté. Enfin, aucune notion concernant la variabilité de ces propriétés en fonction des donneurs n'était rapportée. Or la MAH étant un tissu biologique, il nous paraissait légitime de s'y intéresser afin de mieux appréhender la variabilité des produits d'ingénierie tissulaires qui seront obtenus à partir de celle-ci.

Compte tenu de l'ensemble de ces éléments et de l'importance des propriétés mécaniques dans la réussite de la substitution vasculaire, **l'objectif de ce travail était de réaliser une cartographie détaillée des propriétés mécaniques de la MAH** afin d'identifier des zones mécaniquement fortes ou mécaniquement faibles devant être favorisées ou évitées lors de la production de nos fils.

**CARTOGRAPHY OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF
THE HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE**

Agathe Grémare^{1,2}, Sarah Jean-Gilles³, Pauline Musqui², Laure Magnan¹, Yoann Torres¹,
Mathilde Fénelon^{1,2}, Stéphanie Brun⁴, Jean-Christophe Fricain^{1,2}, Nicolas L'Heureux¹

¹ Univ. Bordeaux, INSERM, Tissue Bioengineering, U1026, F-33076 Bordeaux, France

² CHU Bordeaux, Odontology and Oral Health Department, F-33076 Bordeaux, France

³ Univ. Cergy-Pontoise, F-95000 Cergy-Pontoise, France

⁴ CHU Bordeaux, Gynecology-Obstetrics Service, F-33076 Bordeaux, France

Publié dans :

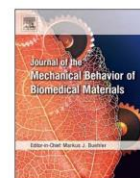
« *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* »

DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.07.007



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmbbm

Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane

Agathe Grémare^{a,b}, Sarah Jean-Gilles^c, Pauline Musqui^b, Laure Magnan^a, Yoann Torres^a, Mathilde Fénelon^{a,b}, Stéphanie Brun^d, Jean-Christophe Fricain^{a,b}, Nicolas L'Heureux^{a,*}

^a Univ. Bordeaux, INSERM, Tissue Bioengineering, U1026, F-33076, Bordeaux, France

^b CHU Bordeaux, Odontology and Oral Health Department, F-33076 Bordeaux, France

^c Univ. Cergy-Pontoise, F-95000 Cergy-Pontoise, France

^d CHU Bordeaux, Gynecology-Obstetrics Service, F-33076 Bordeaux, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Human amnion
Tissue engineering
Natural biomaterial
Mechanical properties
Mapping

ABSTRACT

Because of its low immunogenicity, biological properties, and high availability, the Human Amniotic Membrane (HAM) is widely used in the clinic and in tissue engineering research. However, while its biological characteristics are well described, its mechanical properties remain understudied especially in terms of inter- and intra-HAM variability. To guide bioengineers in the use of this natural biomaterial, a detailed cartography of the HAM's mechanical properties was performed. Maximal force (Fmax) and strain at break (Smax) were identified as the relevant mechanical criteria for this study after a combined analysis of histological sections, thickness measurements after dehydration, and uniaxial tensile tests. Eight HAMs were studied by mechanical cartography using a standardized cutting protocol and sampling pattern. On average, 103 ± 10 samples were retrieved and tested per HAM. Intra-tissue variability highlighted the fact that there were two mechanically distinct areas (placental and peripheral) in each HAM. For all HAMs, placental HAM was significantly stronger by $82 \pm 45\%$ and more stretchable by $19 \pm 6\%$ than their peripheral counterparts. Our results also demonstrated that placental, but not peripheral, HAM presented isotropic mechanical properties. Thus, placental HAM can be a raw material of choice that could be favored especially in the development of tissue engineering products where mechanical properties play a key role.

1. Introduction

The human amniotic bag is composed of both amniotic and chorionic membranes. The human amniotic membrane (HAM) corresponds to the innermost membrane (Dobrev et al., 2010). This tissue comprises a connective layer, that is neither vascularized nor innervated, and an epithelial monolayer, which is in direct contact with the amniotic fluid. This epithelium rests on a thin basal membrane rich in collagen type IV, laminin, fibronectin and nidogen. The connective layer is divided into three layers containing collagen types I and III: the inner acellular compact layer, the loose fibroblast layer and the outer spongy layer. The spongy layer of the HAM can be easily delaminated to separate the HAM and the chorion by blunt dissection (Dobrev et al., 2010; Niknejad et al., 2008).

This tissue is routinely discarded *post-partum* and, consequently, is a widely available and cost-effective raw material for medical and tissue engineering applications. Clinically, allogenic HAM has long been used in both ophthalmology, for ocular surface reconstruction (Malhotra and

Jain, 2014), and dermatology, for treatment of chronic non-healing wounds (Ilic et al., 2016). These good clinical outcomes are attributed to the HAM's purported low immunogenicity due to the lack of HLA class II antigens (Kubo et al., 2001; Magatti et al., 2017). Moreover, this tissue has both anti-inflammatory (Hao et al., 2000) and anti-microbial effects (King et al., 2007; Kjaergaard et al., 2001) due to the production of anti-inflammatory proteins (such as IL-1 RA and IL-10) and β -defensins respectively. These qualities have made the HAM particularly attractive as a biological scaffold for tissue engineering (Niknejad et al., 2008) and has been used for vascular (Amensag et al., 2017; Ottenio et al., 2015; Peirovi et al., 2012), peripheral nerve (Mligiliche et al., 2002), periodontal (Fenelon et al., 2018a; Mohan et al., 2017), cartilage (Diaz-Prado et al., 2010), and bone regeneration (Fenelon et al., 2018b; Li et al., 2015) research among others.

Mechanically, this tissue is highly deformable yet strong and withstands the progressive stretching of the growing embryo as well as protects it from external traumas (Buerzle and Mazza, 2013; Oxlund et al., 1990). Oxlund et al. demonstrated that the amniotic membrane is

* Corresponding author. Laboratory for the Bioengineering of Tissues (BioTis), Inserm U1026 Campus Carreire 146 rue Léo Saignat, Zone Nord, Bat 4A, 2ème étage 33076, Bordeaux Cedex, France.

E-mail address: nicolas.lheureux@inserm.fr (N. L'Heureux).

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.07.007>

Received 8 March 2019; Received in revised form 7 June 2019; Accepted 13 July 2019

Available online 13 July 2019

1751-6161/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

largely responsible for the strength of intact fetal membranes (Oxlund et al., 1990) (Oxlund et al., 1990). Other groups have published detailed studies of the viscoelastic behaviour of this tissue and its intrinsic mechanical properties (Buerzle and Mazza, 2013; Joyce et al., 2009; Mauri et al., 2015; Oyen et al., 2004). In this report, we have performed a comparative study using simple mechanical properties to assess the variability within individual HAMs as well as between HAMs of different donors. Indeed, like all biological tissues, a high level of variability of the mechanical properties of the HAM can be expected. In addition, scientists have shown that HAMs have a distinct weak zone overlying the cervix, to facilitate the process of fetal membrane rupture during delivery, with particular biochemical and histological features⁹²⁶. Hence, it is critical to assess the variability of the mechanical properties of this natural biomaterial in order to develop effective production strategies for tissue-engineered products relying on its strength. To our knowledge, no study has provided a detailed mechanical cartography of the HAM.

In this study, we developed standardized HAM cutting and HAM sampling protocols that allowed the evaluation of up to 125 samples per membranes to meticulously assess the inter- and intra-tissue variability of its mechanical properties.

2. Materials and methods

2.1. HAM collection

Fetal membranes were collected from eight patients who had a caesarean delivery at term before the initiation of labor. Patients were recruited for this study with informed consent approved by the institutional review board. All patients had mono-fetal pregnancies and were seronegative for Human Immunodeficiency Virus (HIV) 1 and 2 and for Hepatitis B and C viruses. Tissues were kept in ice-cold transport solution containing phosphate buffered solution (PBS 1X, Gibco®) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco®). The next day, negative HIV 1 and 2 serologies were confirmed using a band immunochromatography test (ALERE®, ref: 7D2346) and the samples were collected.

2.2. HAM cutting protocol and sampling pattern

To perform HAM cartographies, a HAM standardized cutting protocol was developed (Fig. 1). First, the umbilical cord was removed. Tissues were then rinsed with distilled water at least six times. The placenta and its membranes were placed on a large cutting board with the placental long axis oriented horizontally. Before cutting, membranes were spread out and distributed homogeneously on the placenta. They were cut into eight parts with a surgical blade (Fig. 1B). The first cut was made along the long axis of the placenta, starting at the edge of the placental rim and finishing on the other side of the placental rim. The second cut was made perpendicular to the first in the same way. Then, four additional cuts were performed, at equal intervals to allow the membranes to lay flat. The amnion and the chorion were then separated manually (Fig. 1C). Finally, the HAM was detached from the placenta (Fig. 1D). This tissue was then sampled using a dog-bone shaped punch similar to ASTM D-638 type V (maximal width = 7.5 mm, minimal width = 2.5 mm, linear length = 6 mm and overall length = 38.63 mm) following a sampling pattern with two areas (placental and peripheral) and two directions (radial and circumferential) (Fig. 1E). Wet samples were stored at -20°C .

2.3. Histological analysis

Fresh HAM samples were fixed in 4% PFA (Antigenfix®) overnight. After rinses in PBS 1X, HAM samples were rolled, put in a cassette and processed for paraffin embedding. Paraffin sections (5 μm) were deparaffinized in toluene for 3×5 min, followed by a descending series

of ethanol baths and stained with Masson's trichrome Masson that stains fibrillar collagen specifically in green. Images were acquired using an optical microscope (Nikon®, Eclipse 80i). All samples were treated at the same time and imaged using identical settings to allow staining intensity comparison.

2.4. Thickness measurement

Four square pieces of HAM (0.25 cm²) were cut with a scalpel. Each piece was put on a metallic tube with a known diameter of 4774 μm . Metallic tube diameter plus HAM thickness were measured using a laser micrometer (Aeroel®, Xactum) to determine HAM thickness.

2.5. Uniaxial tensile test

After thawing (1.5 h, at room temperature, in distilled water), uniaxial tensile tests were performed on dog-bone shaped HAM samples using an Autograph AGS-X tensile tester using the Trapezium® software (Shimadzu®) (Fig. 2A). Care was taken to ensure that samples remained fully hydrated at all times. Distilled water was regularly put on the samples using a brush. HAM samples were pre-loaded at 20 mm/min to 0.1 N (without additional pre-conditioning). Then, samples were stretched at a speed of 1% of loaded initial length (L_0) per second (typically around 0.24 mm/s). Maximal force before rupture (F_{max}) and strain at failure (S_{max}) were recorded (Fig. 2B). Ultimate Tensile Stress (UTS) was F_{max} divided by the cross-section area (width of the thinnest part of the dog bone (2.5 mm) multiplied by the thickness as determined by laser micrometer measurement). Young's modulus (E) was determined as the slope of the straight portion of the stress/strain curve between 4 and 5 MPa (Fig. 2C).

2.6. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation, with n indicating the number of HAM sample tested. If data followed Gaussian distribution (D'Agostino and Pearson omnibus normality test), differences were assessed by two-tailed t -test. Otherwise, they were assessed by the Mann and Whitney test. In both cases, differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Masson's trichrome staining of cross sections of paraffin-embedded HAM samples showed 3 layers: 1) a monolayer of epithelial cells, 2) a thin compact, acellular, collagen-rich, conjunctive layer, and 3) a thick loose layer sparsely populated with fibroblasts (Fig. 3A). This loose conjunctive layer could be partly removed by gentle manual scraping (Fig. 3B). Since it was not possible to control the amount of loose tissue left on the HAM, the thickness of the tissue was unpredictable making thickness-dependent values, such as the Ultimate Tensile Stress (UTS) and Young's modulus (E), highly unreliable. We hypothesized that the loose tissue was mostly water and did not contribute much structural collagenous material, and hence, that thickness-dependent values were meaningless in this analysis. To test this idea, HAM samples scraped to various thicknesses (ranging from 22 to 143 μm) were dehydrated while their thickness was measured continuously (Fig. 3C). Despite their very different starting hydrated thicknesses, dried sample thicknesses varied only from 4 to 5 μm ($4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$), suggesting that wet tissue thickness was not proportional to the amount of structural material present. We then compared the mechanical properties of scraped (thin) and unscraped HAM (thick), sampled next to each other on the same HAM, using a uniaxial tensile test. No statistically significant difference in both maximal force (F_{max}) and strain at break (S_{max}) was observed due to scrapping (Fig. 3D and E). However, when evaluating classic material properties, which are calculated based on tissue thickness (UTS and E), we observed clear significantly different values (Fig. 3F

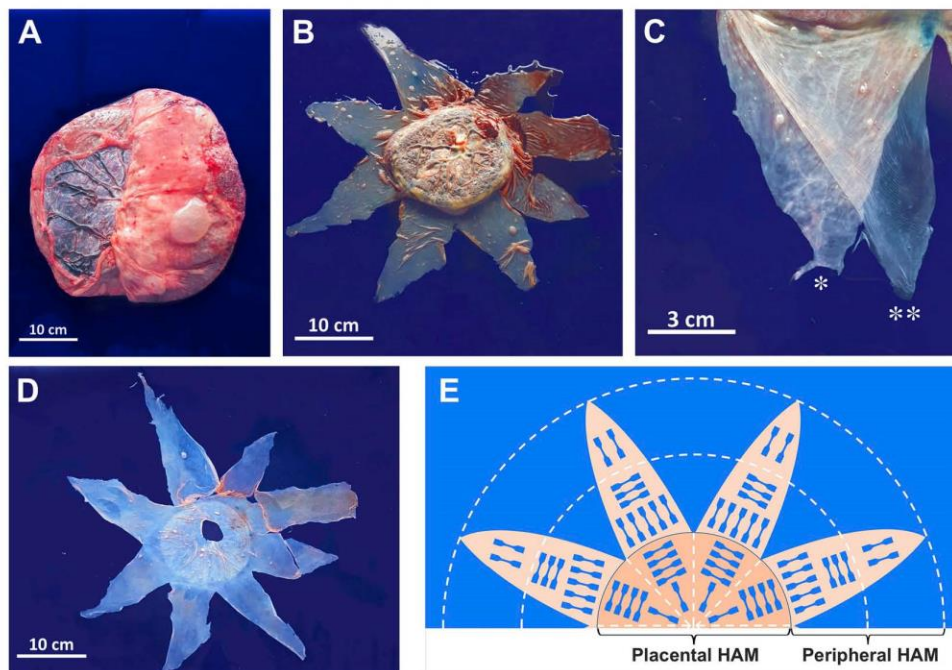


Fig. 1. HAM cutting protocol and sampling pattern. (A) The placenta, umbilical cord and fetal membranes were collected from eight patients who had a caesarean delivery at term. The fetal bag (membranes) is seen on top of the placenta and a surgical incision is clearly visible. (B) The amniochorionic membrane was cut in eight parts (the placenta is at the center under the membrane). (C) The amnion (**) and the chorion (*) were manually separated. (D) The HAM was isolated and spread out. (E) The HAM was sampled in two areas (placental and peripheral HAM) and in two directions (radial and circumferential).

and G). These results showed that, because of the heterogeneity of the tissue's layered structure, UTS and E are not representative of HAM mechanical properties, which was likely provided by the compact conjunctive layer. Thus, maximal force (F_{max}) and strain at break (S_{max}) were selected to investigate HAM mechanical properties in the rest of our study.

Eight HAMs were mechanically cartographed using our standardized cutting protocol and dense sampling pattern (Fig. 3A-H). Socio-demographic information on the patient's tissue are presented in Table 1.

On average, 103 ± 10 samples were analyzed per HAM for a total of 813 samples. However, this does not include an average of $17 \pm 3\%$ of the samples from the preset pattern that could not be recovered due to umbilical cord insertion, surgical incision, annex placental segments, or due to damage during sampling.

Overall, the average F_{max} was 0.8 ± 0.4 N and the average S_{max} was $17 \pm 3\%$ ($n = 813$). This overall variability, which combines inter- and intra-tissue variability, is associated with a coefficient of

variation (CV%) of 46% and 20%, respectively. When data were grouped for each tissue and compared ($n = 8$), the average F_{max} was 0.83 ± 0.07 N and S_{max} was $17 \pm 1\%$, indicating an inter-HAM variability (of the average of all samples) of only 8.7% and 5.9%.

When we looked at the average intra-tissue variability *i.e.*, the average of the CV% from each HAM, we obtained a value of $47\% \pm 8\%$ for F_{max} and $19\% \pm 4\%$ for S_{max} indicating that intra-tissue variability was fairly similar in all HAMs because the variability of the variability *i.e.*, the CV% of the CV%, was only 17% and 21%, respectively (Table 2). However, this highlighted that intra-tissue variability seemed to account for much of the overall variability, which led us to investigate if placental and peripheral areas were distinct from a mechanical point of view.

Fig. 4 provides a visual representation of intra-tissue variability of F_{max} for each HAM analysed, where sample color indicates the strength of the tissue and ranges from dark green, for the strongest sample, to red, for the weakest. In each tissue, green samples appeared concentrated in the placental area of the HAM supporting the idea that

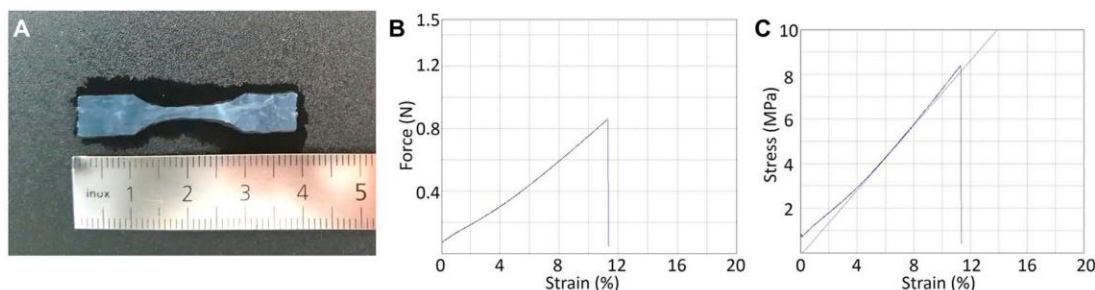


Fig. 2. HAM uniaxial tensile test. (A) Uniaxial tensile tests were performed on dog-bone shaped HAM sample. (B) and (C) Typical representation of force/strain (B) and stress/strain (C) curves obtained after testing. Young's modulus (E) was determined as the slope of the straight portion of the stress/strain curve between 4 and 5 MPa.

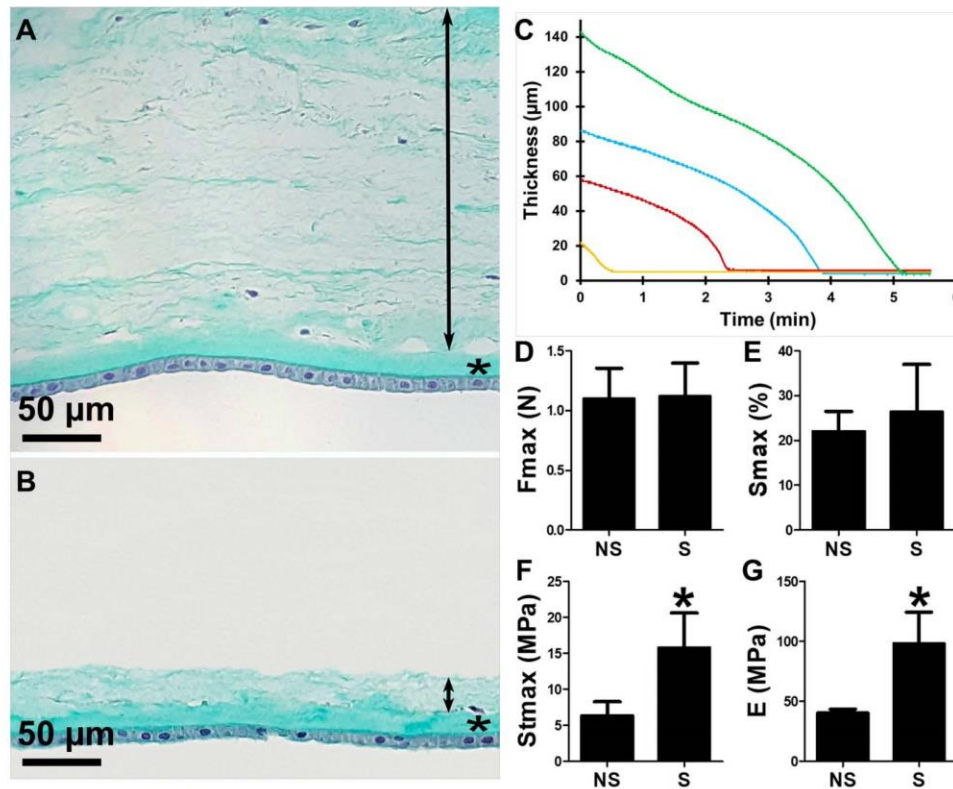


Fig. 3. Structure and mechanical properties of scraped and non-scraped HAM.(A-B) Masson's trichrome staining of cross sections of paraffin-embedded peripheral HAM samples showed a thick loose conjunctive layer (arrow), a small compact conjunctive layer (*) and an epithelial monolayer. (B) This loose layer could be partially removed by gentle manual scraping. (C) Thickness as a function of time during the dehydration of HAM samples scraped to various starting thicknesses (ranging from 22 to 143 μm). Each color is a HAM sample. Dried samples thickness varied only from 4 to 5 μm ($4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$). (D-E) Direct tensile mechanical properties (force (Fmax) and strain at break (Smax)) of scraped (S) and non-scraped samples (NS) were not statistically different. (F-G) Scraping significantly increased thickness-dependent properties like Ultimate Tensile Stress (UTS) and Young's modulus (E). Data are means \pm SD, n = 4 HAM samples, * indicates $p < 0.05$.

Table 1
Sociodemographic informations on the patient's tissue.

	Age (year)	Gravidity	Parity
HAM 1	28	5	2
HAM 2	27	2	0
HAM 3	29	3	2
HAM 4	34	2	1
HAM 5	34	1	0
HAM 6	37	2	1
HAM 7	34	4	2
HAM 8	37	9	6

it was mechanically different than the peripheral area.

Statistical analysis confirmed that, for all HAMs, placental HAM was significantly stronger than peripheral HAM by an average of $82\% \pm 45\%$ (range: 22%–133%) with an average Fmax of 1.2 ± 0.2 (CV% = 16%, range: 0.9–1.5 N, n = 8 HAMs) and of 0.68 ± 0.08 (CV% = 11%, range: 0.6–0.9 N, n = 8 HAMs), respectively (Fig. 5A). All placental HAMs were also significantly more stretchable than their peripheral counterparts by an average of $19\% \pm 6\%$ (range: 11%–29%) with an average Smax of $19\% \pm 3\%$ (CV% = 5%, range: 18–21%, n = 8 HAMs) and $16\% \pm 1\%$ (CV% = 6%, range: 15–18%, n = 8 HAMs), respectively (Fig. 5B). These results were consistent with macroscopic observations (Fig. 1B), which showed that placental HAM was more opaque indicating that it was possibly denser. This was

Table 2
Inter- and intra-tissue variability of HAM's mechanical properties.

	Fmax	Smax
OVERALL VARIABILITY		
All (n = 813 samples) – CV%	46	20
Placental (n = 222 samples) – CV%	33	15
Peripheral (n = 591 samples) – CV%	37	20
INTER-TISSUE VARIABILITY (n = 8 HAMs)		
All – CV%	8.7	5.9
Placental – CV%	16	5
Peripheral – CV%	11	6
INTRA-TISSUE VARIABILITY (n = 8 HAMs)		
All – average of the CV% (CV% of the CV%)	47 (17)	19 (21)
Placental – average of the CV% (CV% of the CV%)	31	14
(CV% of the CV%)	(40)	(18)
Peripheral – average of the CV% (CV% of the CV%)	37	19
(CV% of the CV%)	(19)	(20)

confirmed by histological analysis. Masson's trichrome staining of cross sections of paraffin-embedded placental HAM showed that both the loose and compact conjunctive layers were richer in collagen than placental HAM as indicated by the semi-quantitatively more intense collagen-specific green staining (Fig. 5C vs. Fig. 3B).

The average intra-tissue variability *i.e.*, the average of the CV% (n = 8), calculated for each area was $31\% \pm 13\%$ (Fmax) and $14\% \pm 3\%$ (Smax) for placental, and $37\% \pm 7\%$ (Fmax) and

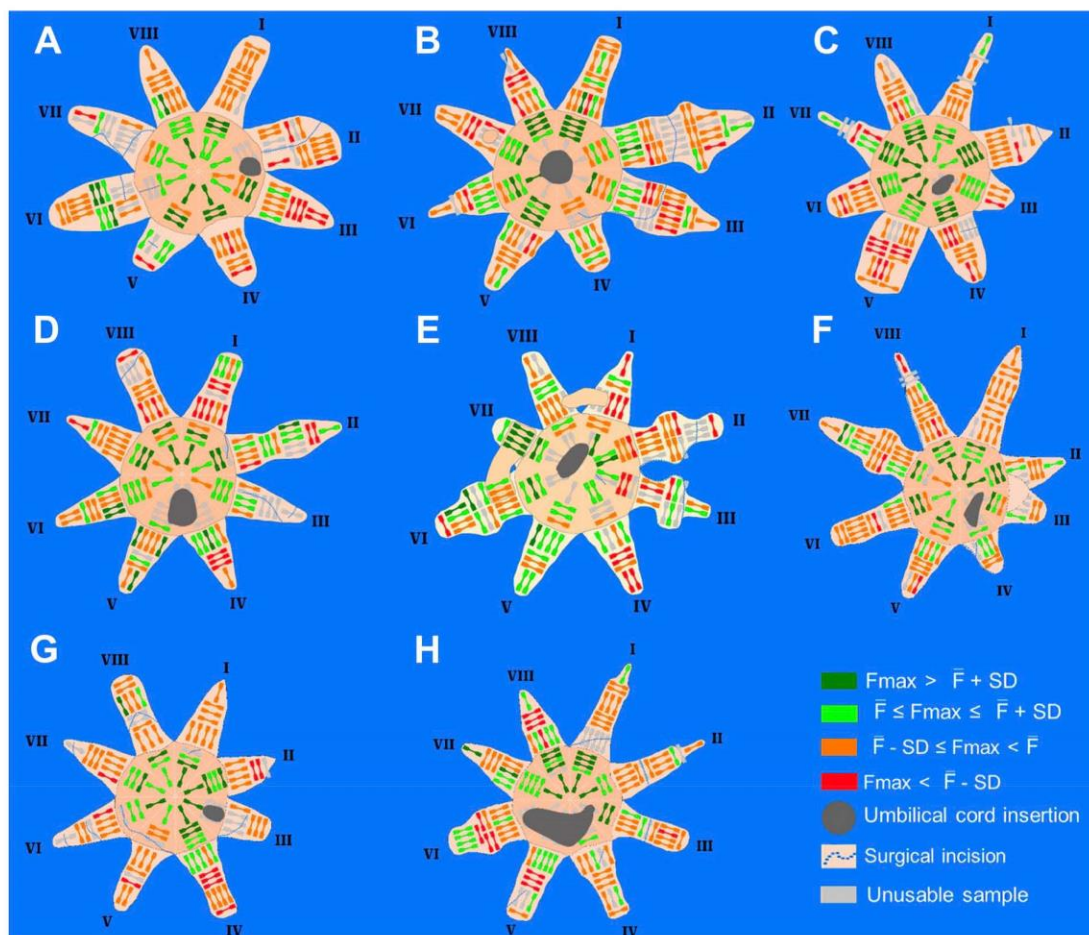


Fig. 4. Schematic representation of HAM's F_{max} mechanical cartography. (A-H) Eight HAMs were mechanically cartographed. On average, 103 ± 10 samples were analyzed per HAM with a total of 822 samples. Sample color indicates tissue strength (F_{max}) ranging from dark green ($F_{max} > \bar{F} + SD$) to red ($F_{max} < \bar{F} - SD$). Green and orange samples correspond to mean force $\leq F_{max} \leq$ mean force $+ SD$ and to mean force $- SD \leq F_{max} \leq$ mean force, respectively. The sampling pattern described in Fig. 1 had to be adapted to each case because of sample loss due to umbilical cord insertion (black dot) or surgical incision (blue dotted line). Samples which could not be recovered are colored in grey.

$19\% \pm 7\%$ (S_{max}) for peripheral, which was generally lower than the overall intra-tissue variability (47% and 19%). The variability of the intra-tissue variability *i.e.*, CV% of CV%, was 40% (F_{max}) and 18% (S_{max}) for placental, and 19% (F_{max}) and 20% (S_{max}) for peripheral, which were similar to the values for whole HAM (17% and 21%), except for the 40%. The inter-tissue variability for each area was 16% (F_{max}) and 5.1% (S_{max}) for placental, and 11% (F_{max}) and 6.5% (S_{max}) for peripheral, which, surprisingly, were higher than F_{max} or equivalent to S_{max} values of the inter-tissue variability calculated without regard for HAM area sampling (8.7% and 5.9%, respectively) (Table 2). Taken together, this data suggests that, even when accounting for sampling area, intra-tissue variability appears to be the more important contributor to overall variability.

Next, the role of sample orientation on HAM mechanical properties was studied. For placental HAM, there was no difference between radial and circumferential samples for both F_{max} and S_{max} (Fig. 6A and B). However, in peripheral HAM, radial samples were statistically stronger than the circumferential in 5 out of 8 HAMs by an average of $37\% \pm 16\%$ (Fig. 6C). In terms of stretchability, sample orientation had no effect on peripheral HAM except for one case where the circumferential samples were more stretchable (Fig. 6D). Taken together, these results demonstrate that placental HAM is an isotropic tissue that

is stronger and more stretchable than peripheral HAM whose isotropy is not always guaranteed.

4. Discussion

Thanks to its low immunogenicity, biological properties, and high availability, the HAM is widely used in the clinic and in tissue engineering research (Niknejad et al., 2008). However, while its biological characteristics are well described (Bourne, 1962; Dobрева et al., 2010; Niknejad et al., 2008), its mechanical properties remain understudied (El Khwad et al., 2005). Thus, in order to help guide tissue engineers in their use of this tissue for the development of products where mechanical properties are critical, this study was performed to generate a detailed cartography of the HAM's mechanical properties. While fresh HAM is sometimes used in the clinic, commercial surgical products are typically treated using various, undisclosed, protocols that can include steps of decellularization, lyophilization, and sterilization (Ilic et al., 2016). In tissue engineering, HAM treatments are usually less extensive but also vary widely (Ilic et al., 2016; Niknejad et al., 2011). Considering that there are no standard HAM processing protocols, we chose to work on the raw material (fresh HAM). We would expect that the regional variations in mechanical properties of the raw material

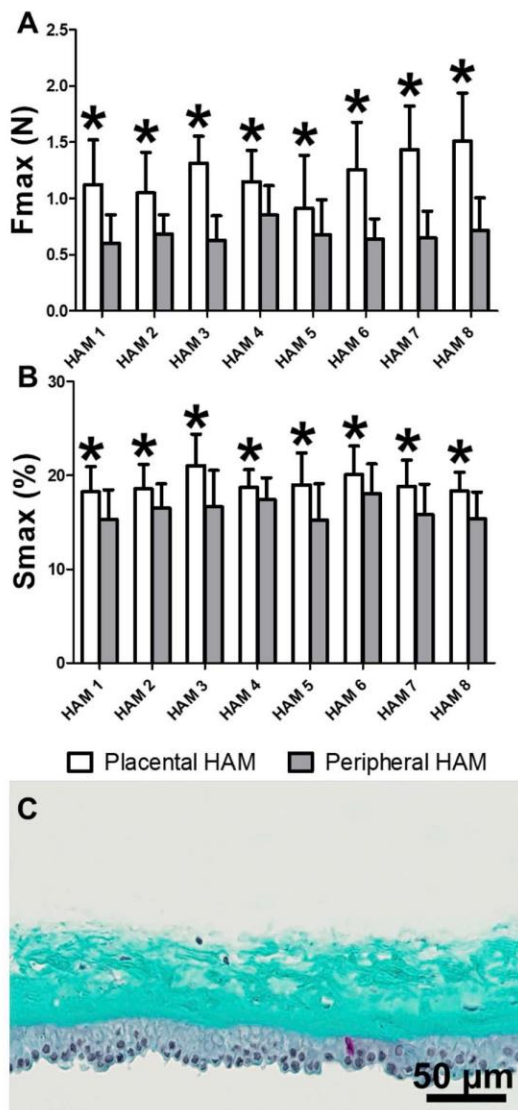


Fig. 5. Differences between placental and peripheral HAM in terms Fmax, Smax, and structure. (A–B) Placental HAM (white column) was $82 \pm 45\%$ stronger and $19 \pm 6\%$ more stretchable than peripheral HAM (grey column). Data are means \pm SD, n placental = 222 samples (min = 21, max = 39) and n peripheral = 591 samples (min = 61, max = 94), * indicates $p < 0.05$. (C) Masson's trichrome staining of a cross section of paraffin-embedded scraped placental HAM showed a loose and a compact conjunctive layer which were both very richer in collagen (more intense green staining) than peripheral HAM (Fig. 3B).

would translate to the treated HAM but this hypothesis should be confirmed experimentally in future studies. Besides, as the benefits of working with intact or minimally treated ECM are becoming more recognized, characterization of the intact HAM may be more relevant to some investigators (Amensag et al., 2017; Gui et al., 2009; Wystrychowski et al., 2014).

Prior to performing the mechanical cartography, relevant mechanical criteria were first determined. Combined analysis of histological

sections, thickness measurements after dehydration, and uniaxial tensile tests, led us to select maximal force (Fmax) and strain at break (Smax) as the appropriate values to investigate HAM mechanical properties. Other groups have also used these two (or similar) thickness-independent parameters to evaluate the mechanical characteristics of the HAM (Niknejad et al., 2011). However, some studies used Ultimate Tensile Stress (UTS) and Young's Modulus (E) instead of, or in addition to, force and strain at failure^{5 16 32}. Nevertheless, our data clearly show how UTS or E evaluated on this heterogeneous multi-layered tissue are: 1) only "apparent" values and not material properties, 2) are extremely dependent on the presence of loose connective tissue, which will vary greatly from operator to operator. Indeed, the large variability of HAM thickness is clearly visible in the literature where some investigators report values of 20 μm (Chuck et al., 2004), 44 μm (Oxlund et al., 1990), 80 μm (Niknejad et al., 2011), or even 111 μm (Jabareen et al., 2009). While some of these differences can be related to the various measurement methods used, Jabareen et al. measured the thickness of 9 HAMs and reported a range of 43–305 μm and a standard deviation of 78 (CV% = 70%). This clearly suggests that UTS and E are poor values to describe HAM mechanical properties.

A standardized cutting protocol and a dense sampling pattern were developed for the mechanical cartography of the HAM. To our knowledge, El Khwad et al. published the only mechanical cartography of the HAM (El Khwad et al., 2005). Although that study involved a slightly higher patient number than our (12 vs. 8 in our study), their sampling pattern used very large samples and, as a result, had a small number of samples per HAM (13 samples vs. more than 100 in our study). In addition, the study used a perforation test, which does not give comparable tensile data or information on the isotropy of the tissue. Finally, that study did not investigate the properties of the placental HAM.

To understand the process of fetal membrane rupture, a natural and necessary event of the delivery process, scientists have shown that, in peripheral HAM, there was a distinct weak zone overlying the cervix with particular biochemical and histological features (El Khwad et al., 2005; McLaren et al., 1999; McParland et al., 2003). Despite the high resolution of our sampling, we did not locate this weak zone. We hypothesize that, this area was not identified because it was along the tear created when the obstetric surgeon widened his surgical incisions. It would make sense that this weak region would preferentially propagate the initial cut during the stretching of the membranes at the end of a cesarean delivery. Since we did not get access to the fetal bag prior to delivery to stain the region above the cervix to be able to locate it at the time of sampling, this question still remains a hypothesis.

The average tensile Fmax (0.83 ± 0.07 N, n = 8 HAMs) was roughly twice that of the value reported by Oxlund et al. (0.4 ± 0.3 N) (Oxlund et al., 1990). Note that the samples tested by Oxlund et al. were 4 mm wide strips so we normalized their values to account for this difference in width. Also, the standard deviation was calculated from the standard error of the mean reported in their study with an n = 6. Similar values can be calculated from the data reported by Niknejad et al. for fresh and glycerol-frozen HAM (≈ 0.4 N and 0.2 N respectively) (Niknejad et al., 2011). An approximate Fmax value of ≈ 0.6 N can be calculated from the data of Chuck et al. (2004). The higher Fmax from our study is partially due to the fact that some of our samples came from placental HAM (27%), unlike the cited studies which focused exclusively on peripheral HAM. The average Fmax for peripheral HAM only was 0.68 ± 0.08 N, which is still generally higher than published data. This may be due, in part, to the fact that these studies used strips, which would normally break at lower values than the dog-bone shaped samples we used. Since strain rate can influence the breaking strength, we hypothesize that this variable might also contribute to our higher values. Only Oxlund et al. provided sufficient data to establish the strain rate used, which we calculated to be $2.4\% \text{ s}^{-1}$ ³².

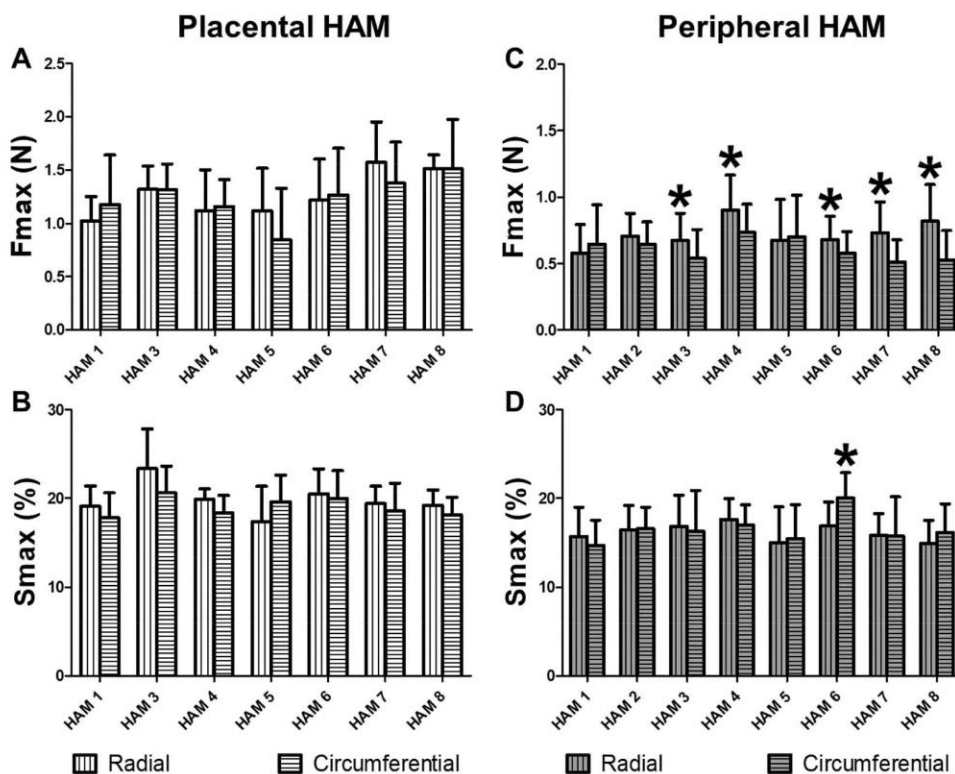


Fig. 6. Effect of sample's orientation on both Fmax and Smax. (A-B) In placental HAM, no orientation effect was observed between radial (vertical hatches on white fill) and circumferential samples (horizontal hatches on white fill) in terms of Fmax and Smax. (C) However, in peripheral HAM, the radial samples (vertical hatches on grey fill) were stronger than the circumferential samples (horizontal hatches on grey fill) in 5 HAMs out of 8. (D) Moreover, sample orientation had no effect on stretchability except for HAM n°6 where the circumferential samples were more stretchable. Data are means \pm SD, n radial = 423 samples (min = 42, max = 59) and n circumferential = 390 samples (min = 41, max = 66), * indicates $p < 0.05$.

Considering that we used a $1\% s^{-1}$ strain rate and that breaking strength increases with the testing strain rate (Ottenio et al., 2015), this difference in strain rate could only explain a higher Fmax for Oxlund et al. This suggests that both strain rates represent quasi-static testing conditions.

The average Smax for peripheral samples was $16\% \pm 1\%$, which was roughly half that of Oxlund et al., the only study we found that measured strain at break. This difference is surprising because stronger tissues can generally be stretched more before breaking and our Fmax was roughly twice that of Oxlund et al. (Chuck et al., 2004; Niknejad et al., 2011). This apparent discrepancy could be due to the fact that this group did not use any pre-loading or mechanical pre-conditioning. As a result, their L_0 was measured on a very loose tissue while the L_0 we used was measured on a tissue loaded with 0.1 N. This would allow for an important displacement before equivalent loading of the tissue and result in a larger displacement before failure (D_f). As a result, the Smax would be overestimated due to both a higher displacement at break and a shorter L_0 since $Smax = L_0 + D_f/L_0$. However, in retrospect, our use of 0.1 N as a pre-load might have been excessive since it represents close to 10% of the Fmax.

The novelty of this study was to describe the important mechanical difference between peripheral and the often-forgotten placental HAM. The differences between these two areas in terms of transparency (Deihim et al., 2016), histological structure^{2 13}, metabolic activity (Banerjee et al., 2015) and gene expression (Han et al., 2008) have already been reported. However, to our knowledge, no study has

compared their mechanical properties. Our results demonstrated that placental HAM was always stronger, by an average of $82 \pm 45\%$, and more stretchable, by an average of $19 \pm 6\%$, than peripheral HAM. This data was consistent with the richer collagen structure of the placental HAM revealed by histology. These data are supported by those obtained by Jabareen et al. who found that inter-tissue (patient-to-patient) variability in peripheral HAM strength could be explained by collagen content differences (Jabareen et al., 2009) For placental human amniotic membrane, Fmax and Smax varied in the same direction although it is not always the case with all tissues.

Another novel aspect of our study was that we investigated the isotropy of this material. Because the fetal bag might be exposed to directional forces due to the fetus' movements, we looked at the influence of sample orientation on mechanical properties. We used samples that were in the axis that goes from the placenta to the opposite side of the fetal bag (radial samples), and samples that were taken perpendicularly to that direction (circumferential). We demonstrated that, in all HAMs, placental sampling was not sensitive to orientation in term of Fmax and Smax. However, in peripheral HAM, radial samples were significantly stronger than circumferential samples in 5 out of 8 HAMs (by $37 \pm 16\%$). These results could be explained by the fact that the HAM covering the placenta is mechanically connected to the very thick placenta, which could shield it from deformations caused by the fetus pushing on the fetal membranes. The peripheral HAM would not benefit from such a mechanical support and would likely be more exposed to deformations and stress. In addition, because the peripheral

HAM is more mobile and the placental more tethered, we would expect tension to develop preferentially along lines going from the more mobile towards the less mobile tissue. This could result in the alignment of collagen fibers along these stress lines, *i.e.* in the radial orientation. This would explain why radial samples were generally stronger than circumferential samples only in the peripheral HAM. In only 1 out of 8 cases, the circumferential peripheral samples were more stretchable. We attribute this observation to a non-homogenous and exceptional distribution that caused a statistical anomaly. This lack of increased stretchability at failure might seem surprising since stronger tissues are typically more stretchable. However, this generalization is made when stronger tissues are thicker or denser. If we suppose that the increased strength of the tissue is only due to a collagen fiber reorganization, one would not expect the tissue to be more stretchable (on the contrary).

Inter-tissue (patient-to-patient) variability was surprising low even when we compared HAM values that combined peripheral and placental tissues (CV% = 8.7% for Fmax and 5.9% for Smax). Even more surprising was that inter-tissue variability was somewhat higher (for Fmax), or very similar (for Smax), when we analyzed data separately for placental (CV% = 16% and 5.1%, respectively) and peripheral areas (CV% = 11% and 6.5%, respectively), suggesting that intra-tissue variability accounts for most of the overall variability. Indeed, intra-tissue variability for each area was $33\% \pm 13\%$ (Fmax) and $14\% \pm 3\%$ (Smax) for placental, and $37\% \pm 7\%$ (Fmax) and $19\% \pm 7\%$ (Smax), which account for most of the overall variability of 46% (Fmax) and 20% (Smax). This variability analysis confirms that sourcing material from multiple HAMs only marginally increases tissue variability and can be considered a sound strategy.

5. Conclusions

This study, based on the analysis of more than 800 samples, is the most detailed cartography of the HAM's mechanical properties. We have quantified the inter- and intra-tissue variability in terms of strength and stretchability in order to allow tissue engineers to make informed design decisions when using HAM as a scaffold. We show for the first time that strength, stretchability, and isotropy are superior in the placental compared to peripheral HAM. Thus, although the placental HAM is often neglected because of its smaller size and its less homogenous appearance, it offers specific mechanical properties. Placental HAM can be, therefore, a raw material of choice that could be favored especially in the development of tissue engineering products where mechanical properties play a key role.

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Patrick Guitton for his technical help.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2019.07.007>.

References

Amensag, S., Goldberg, L., O'Malley, K.A., Rush, D.S., Bercei, S.A., McPetridge, P.S.,

2017. Pilot assessment of a human extracellular matrix-based vascular graft in a rabbit model. *J. Vasc. Surg.* 65, 839–847 e831.
- Banerjee, A., Weidinger, A., Hofer, M., Steinborn, R., Lindenmair, A., Hennerbichler-Lugscheider, S., Eibl, J., Redl, H., Kozlov, A.V., Wolbank, S., 2015. Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. *Placenta* 36, 1329–1332.
- Bourne, G., 1962. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad. Med. J.* 38, 193–201.
- Buerzle, W., Mazza, E., 2013. On the deformation behavior of human amnion. *J. Biomech.* 46, 1777–1783.
- Chuck, R.S., Graff, J.M., Bryant, M.R., Sweet, P.M., 2004. Biomechanical characterization of human amniotic membrane preparations for ocular surface reconstruction. *Ophthalmic Res.* 36, 341–348.
- Delhim, T., Yazdanpanah, G., Niknejad, H., 2016. Different light transmittance of placental and reflected regions of human amniotic membrane that could be crucial for corneal tissue engineering. *Cornea* 35, 997–1003.
- Diaz-Prado, S., Rendal-Vazquez, M.E., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Rodriguez-Cabarcos, M., Fuentes-Boquete, I., de Toro, F.J., Blanco, F.J., 2010. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank.* 11, 183–195.
- Dobrev, M.P., Pereira, P.N., Deprest, J., Zwijsen, A., 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 761–777.
- El Khwad, M., Stetzer, B., Moore, R.M., Kumar, D., Mercer, B., Arikat, S., Redline, R.W., Mansour, J.M., Moore, J.J., 2005. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol. Reprod.* 72, 720–726.
- Fenelon, M., Catros, S., Fricain, J.C., 2018a. What is the benefit of using amniotic membrane in oral surgery? A comprehensive review of clinical studies. *Clin. Oral Investig.* 22, 1881–1891.
- Fenelon, M., Chassande, O., Kalisky, J., Gindraux, F., Brun, S., Bareille, R., Ivanovic, Z., Fricain, J.C., Boiziau, C., 2018b. Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29, 78.
- Gui, L., Muto, A., Chan, S.A., Breuer, C.K., Niklason, L.E., 2009. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng. A* 15, 2665–2676.
- Han, Y.M., Romero, R., Kim, J.S., Tarca, A.L., Kim, S.K., Draghici, S., Kusanovic, J.P., Gotsch, F., Mittal, P., Hassan, S.S., Kim, C.J., 2008. Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biol. Reprod.* 79, 954–961.
- Hao, Y., Ma, D.H., Hwang, D.G., Kim, W.S., Zhang, F., 2000. Identification of anti-angiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19, 348–352.
- Ilic, D., Vicovac, L., Nikolic, M., Lazic Ilic, E., 2016. Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds. *Br. Med. Bull.* 117, 59–67.
- Jabareen, M., Mallik, A.S., Bilic, G., Zisch, A.H., Mazza, E., 2009. Relation between mechanical properties and microstructure of human fetal membranes: an attempt towards a quantitative analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 144 (Suppl. 1), S134–S141.
- Joyce, E.M., Moore, J.J., Sacks, M.S., 2009. Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 144 (Suppl. 1), S121–S127.
- King, A.E., Paltoo, A., Kelly, R.W., Sallenave, J.M., Bocking, A.D., Challis, J.R., 2007. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 28, 161–169.
- Kjaergaard, N., Hein, M., Hyttel, L., Helmig, R.B., Schonheyder, H.C., Uldbjerg, N., Madsen, H., 2001. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 94, 224–229.
- Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R., Usui, M., 2001. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1539–1546.
- Li, W., Ma, G., Brazile, B., Li, N., Dai, W., Butler, J.R., Claude, A.A., Wertheim, J.A., Liao, J., Wang, B., 2015. Investigating the potential of amnion-based scaffolds as a barrier membrane for guided bone regeneration. *Langmuir* 31, 8642–8653.
- Magatti, M., Vertua, E., De Munari, S., Caro, M., Caruso, M., Silini, A., Delgado, M., Parolini, O., 2017. Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 2895–2911.
- Malhotra, C., Jain, A.K., 2014. Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology. *World J. Transplant.* 4, 111–121.
- Mauri, A., Ehret, A.E., Perrini, M., Maake, C., Ochsenbein-Kolbe, N., Ehrbar, M., Oyen, M.L., Mazza, E., 2015. Deformation mechanisms of human amnion: quantitative studies based on second harmonic generation microscopy. *J. Biomech.* 48, 1606–1613.
- McLaren, J., Malak, T.M., Bell, S.C., 1999. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum. Reprod.* 14, 237–241.
- McParland, P.C., Taylor, D.J., Bell, S.C., 2003. Mapping of zones of altered morphology and chorionic connective tissue cellular phenotype in human fetal membranes (amniochorion and decidua) overlying the lower uterine pole and cervix before labor at term. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 1481–1488.
- Milgiche, N., Endo, K., Okamoto, K., Fujimoto, E., Ide, C., 2002. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve

- regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 63, 591–600.
- Mohan, R., Bajaj, A., Gundappa, M., 2017. Human amnion membrane: potential applications in oral and periodontal field. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 7, 15–21.
- Niknejad, H., Dehimi, T., Solati-Hashjin, M., Peirovi, H., 2011. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology* 63, 145–151.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, A.M., 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* 15, 88–99.
- Ottenio, M., Tran, D., Ni Annaidh, A., Gilchrist, M.D., Bruyere, K., 2015. Strain rate and anisotropy effects on the tensile failure characteristics of human skin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 41, 241–250.
- Oxlund, H., Helmig, R., Halaburt, J.T., Ulbjerg, N., 1990. Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 34, 247–255.
- Oyen, M.L., Cook, R.F., Calvin, S.E., 2004. Mechanical failure of human fetal membrane tissues. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 651–658.
- Peirovi, H., Rezvani, N., Hajinasrollah, M., Mohammadi, S.S., Niknejad, H., 2012. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J. Vasc. Surg.* 56, 1098–1104.
- Wystrychowski, W., McAllister, T.N., Zagalski, K., Dusserre, N., Cierpka, L., L'Heureux, N., 2014. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J. Vasc. Surg.* 60, 1353–1357.

1.3 Conclusions

La MAH présente une structure histologique hétérogène qui inclut une fine couche de collagène dense responsable de l'ensemble de ses propriétés mécaniques. Bien que le stress à la rupture et le module de Young soient classiquement utilisés pour étudier les propriétés mécaniques, ces paramètres tiennent compte de l'épaisseur globale du matériau testé et n'étaient donc pas adaptés pour l'étude de ce tissu. Ainsi la force maximale et l'allongement à la rupture, qui sont deux paramètres indépendants de l'épaisseur, ont été retenus pour ce travail.

Afin de cartographier la MAH de façon précise et reproductible, une méthode de découpe et d'échantillonnage ont, tout d'abord, été mises au point. Ainsi, 103 ± 10 échantillons ont été prélevés par membrane selon un patron d'échantillonnage particulièrement dense présentant deux zones et deux directions.

Les échantillons ont ensuite été soumis à des tests de traction uniaxiale. Huit MAHs ont ainsi été cartographiées. Les résultats obtenus ont permis d'identifier, dans chaque MAH, deux zones (placentaire et périphérique) avec des propriétés mécaniques différentes. Pour toutes les membranes, la zone placentaire présentait des propriétés mécaniques isotropiques et était significativement plus forte (82 ± 45 %) et plus étirable (19 ± 6 %) que sa contrepartie périphérique. Malgré la haute résolution de notre échantillonnage, aucune zone de fragilité n'a été mise en évidence au sein de la MAH périphérique. Enfin, la variabilité des propriétés mécaniques était plus importante au sein d'une même membrane qu'entre des membranes issues de différents donneurs.

Les différences de force ont été mises en relation avec des observations histologiques. De façon générale, la corrélation entre les propriétés mécaniques et la composition/structure du tissu aurait pu être approfondie. Des dosages de collagène et d'élastine ou l'étude de l'orientation des fibres de collagène auraient pu, par exemple, être réalisés. Néanmoins, les résultats obtenus étant suffisants pour la poursuite de notre travail, ces points n'ont pas été investigués pour l'instant.

Ainsi, ce travail basé sur l'analyse de plus de 800 échantillons constitue à ce jour, la cartographie la plus détaillée des propriétés mécaniques de la MAH. Pour la première fois, la MAH placentaire est apparue comme une zone particulièrement intéressante avec des propriétés mécaniques isotropiques et augmentées en termes de force et d'étirabilité par rapport à la MAH périphérique.

Dans la suite de notre thèse, cette zone, bien que de surface réduite, devra donc être exploitée. Par ailleurs, les résultats concernant la variabilité des propriétés mécaniques nous autorisent raisonnablement à utiliser des MAHs provenant de différents donneurs pour produire un seul greffon. Enfin, de manière générale, toutes ces données aident les ingénieurs utilisant la MAH à choisir leurs sites de prélèvement en fonction des contraintes mécaniques auxquelles le produit d'ingénierie tissulaire sera soumis une fois implanté et donc, de l'application clinique visée.

2. Développement d'un substitut vasculaire produit par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine

2.1 Introduction

En réponse à la faible performance des prothèses synthétiques pour les revascularisations de petit diamètre (≤ 6 mm), des substituts vasculaires biologiques ont été développés comme alternative [24–28]. Parmi les différentes approches décrites en ingénierie tissulaire vasculaire, celle de proposée par L'Heureux et ses collaborateurs s'est particulièrement distinguée. En effet, elle est à la seule à produire des greffons biologiques avec des propriétés mécaniques suffisantes sans avoir recours à un échafaudage exogène [111].

Dans cette approche, les feuillets de matrice extracellulaire, produits grâce à la culture de fibroblastes de derme humain pendant 8 semaines, constituent la matière première permettant la fabrication de ces greffons. Une fois obtenus, ces feuillets sont enroulés autour d'un mandrin. L'ensemble est ensuite assemblé grâce à une période de maturation en bioréacteur de deux fois 8 semaines. Cette étape permet la fusion entre les différentes couches du « rouleau ». Grâce à la cohésion de la structure, le mandrin central peut alors être retiré et le substitut vasculaire est obtenu [166]. Bien que ces greffons aient été implantés avec succès en position d'abord vasculaire chez plusieurs patients présentant une insuffisance rénale chronique en stade terminal [26,168,170], leur coût de production très élevé et la complexité de la méthode sont les principaux obstacles à l'utilisation de cette méthode en routine clinique.

Pour réduire ce coût, le remplacement des feuillets de matrice extracellulaire par un tissu biologique disponible en grande quantité et à moindres frais est une solution intéressante. McFetridge *et al.* ont donc développé un modèle de substitut vasculaire obtenu par roulage de la membrane amniotique humaine (MAH) préalablement décellularisée [183]. Même si les implantations dans la carotide de lapins immunocompétents ont fourni des résultats prometteurs [27], une étape de maturation en bioréacteur est indispensable à la production de ces greffons. Pour s'en affranchir, le recours à une autre méthode d'assemblage est nécessaire. En ce sens, notre groupe de recherche a récemment proposé d'utiliser une approche inspirée du textile [171]. Cette méthode plus rapide et plus adaptable que l'approche par roulage, a permis d'obtenir des substituts vasculaires tissés à partir de fils de matrice extracellulaire produite par la culture fibroblastes de derme humain. *In vitro*, ces greffons présentaient des propriétés mécaniques supra physiologiques largement compatibles avec une implantation orthotopique dans un modèle animal [171].

Ainsi, en utilisant la MAH comme matière première et le tissage comme méthode d'assemblage, **l'objectif de ce travail était de produire à moindre coût, un substitut vasculaire de petit diamètre entièrement biologique.**

Les expérimentations basées sur les techniques de cryo-microscopie électronique à balayage et de microscopie électronique à transmission ont été réalisées grâce à une collaboration avec le Bordeaux Imaging Center.

Les tests de pressions à l'éclatement ont été réalisés grâce à une collaboration avec le laboratoire RESCOLL à Bordeaux.

**DEVELOPMENT OF A VASCULAR SUBSTITUTE PRODUCED BY
WEAVING YARNS OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE**

Agathe Grémare^{1,2}, Lisa Thibes¹, Maude Gluais¹, Yoann Torres¹, Diane Potart¹,
Nicolas Da Silva¹, Mathilde Fénelon^{1,2}, Loïc Sentilhes³, Sabrina Lacomme⁴, Isabelle Svahn⁴,
Etienne Gontier⁴, Jean-Christophe Fricain^{1,2}, Nicolas L'Heureux¹

¹ Univ. Bordeaux, INSERM, Tissue Bioengineering, U1026, F-33076 Bordeaux, France

² CHU Bordeaux, Odontology and Oral Health Department, F-33076 Bordeaux, France

³ CHU Bordeaux, Gynecology-Obstetrics Service, F-33076 Bordeaux, France

⁴ UMS 3420 CNRS, US4 INSERM, Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux,
F-33000 Bordeaux, France

En préparation pour :

« *Acta Biomaterialia* »

Title Page

Title

Development of a vascular substitute produced by weaving yarns of human amniotic membrane

Author names and affiliations

Agathe Grémare^{1,2}, Lisa Thibes¹, Maude Gluais¹, Yoann Torres¹, Diane Potart¹, Nicolas Da Silva¹, Mathilde Fénelon^{1,2}, Loïc Sentilhes³, Sabrina Lacomme⁴, Isabelle Svahn⁴, Etienne Gontier⁴, Jean-Christophe Fricain^{1,2}, Nicolas L'Heureux¹

¹ Univ. Bordeaux, INSERM, Tissue Bioengineering, U1026, F-33076 Bordeaux, France

² CHU Bordeaux, Odontology and Oral Health Department, F-33076 Bordeaux, France

³ CHU Bordeaux, Gynecology-Obstetrics Service, F-33076 Bordeaux, France

⁴ UMS 3420 CNRS, US4 INSERM, Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author

Nicolas L'Heureux

Laboratory for the Bioengineering of Tissues (BioTis), Inserm U1026 Campus Carreire

146 rue Léo Saignat, Zone Nord, Bat 4A, 2ème étage

33076 Bordeaux Cedex France

Contact telephone number: 33 (0)5 57 57 17 23

FAX number: 33 (0)5 56 90 05 17

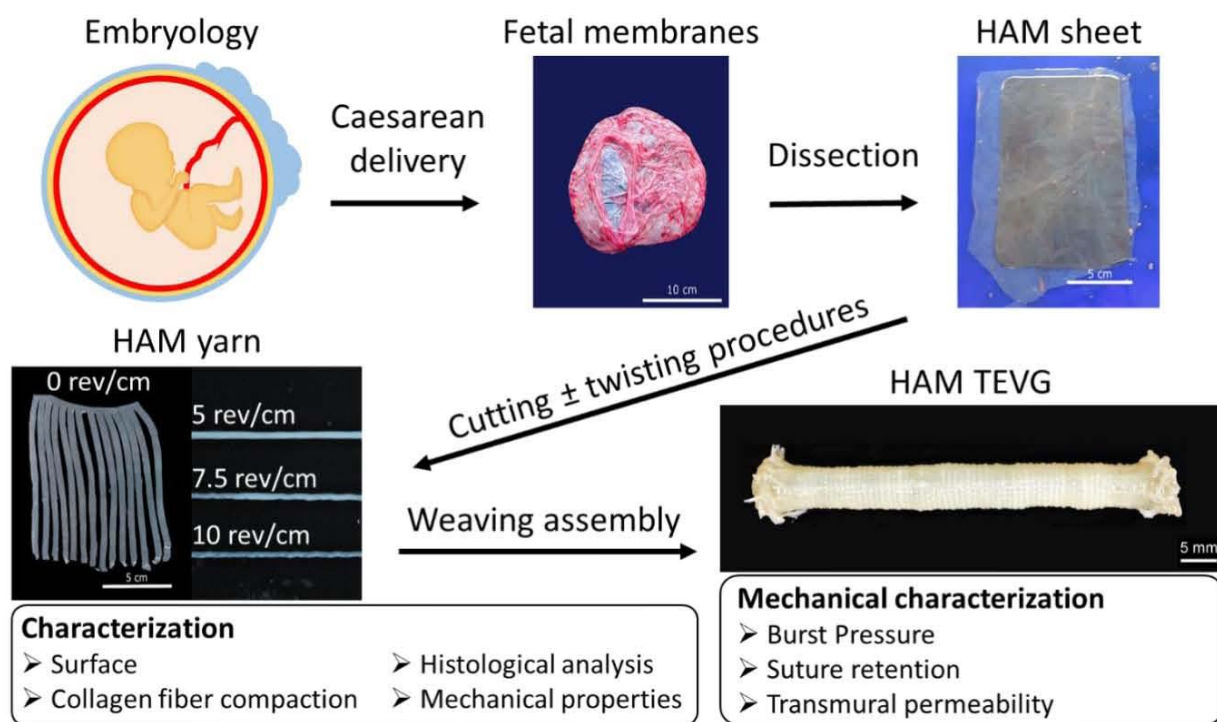
E-mail: nicolas.lheureux@inserm.fr

Abstract

Since synthetic vascular prosthesis perform poorly in small diameter revascularization, biological vascular substitutes are being developed as an alternative. Although their *in vivo* results are promising, their productions involve tissue engineering methods that are long, complex and expensive. To overcome these limitations, we propose an innovative approach that combines the human amniotic membrane (HAM), which is a widely available and cost-effective biological raw material, with a rapid and robust textile-inspired assembly strategy. Fetal membranes were collected after cesarean deliveries at term. Once isolated by dissection, HAM sheets were cut in ribbons that could be further processed, by twisting, into threads. Characterization of HAM yarns (both ribbons and threads) showed that their physical and mechanical properties could easily be tuned. Since our clinical strategy will be to provide an off-the-shelf, allogeneic implant, we studied the effects of decellularization and / or gamma sterilization on the histological and mechanical properties of HAM ribbons. Finally, our HAM woven tissue engineered vascular grafts (TEVGs) showed clinically relevant mechanical properties. Thus, this study demonstrates that human, completely biological, allogeneic, small diameter TEVGs can be produced without costly cell culture and bioreactors.

Key words: Human amnion, Tissue engineering, Yarn characterization, Blood vessel, Human textiles

Graphical abstract



Statement of significance

Since synthetic vascular prosthesis perform poorly in small diameter revascularization, biological vascular substitutes are being developed as an alternative. Although their results are promising, their productions involve tissue engineering methods that are long, complex and expensive. Here, to overcome these limitations, the HAM, which is a readily available surgical waste, is associated with a textile-inspired assembly strategy to produce woven, completely biological, human small diameter TEVGs. This innovative approach allows to quickly and inexpensively produce TEVGs whose *in vitro* mechanical properties favorably compare with native blood vessels and other biological TEVGs described in the literature.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide [1]. Among them, arterosclerosis causes vessel obstructions which can lead to myocardial infarction, leg amputation and stroke [2]. The “gold standard” surgical treatment is a procedure using a native artery (or vein) to bypass the blockage [3]. Yet, due to previous harvest, anatomical limitations or disease progression, these autologous vessels are unavailable in many cases [4]. Thus, synthetic vascular grafts made of Dacron® or ePTFE are used for distal small diameter revascularization procedures despite a high failure rates (< 6 mm) [5,6]. This poor performance is linked to short-term thrombosis, longer-term intimal hyperplasia as a result of chronic inflammatory in responses to the foreign materials, and an increased rate of infection [7].

To avoid limitations linked to the presence of a synthetic material, extracellular matrix synthesized by cultured cells has been proposed as an alternative to synthetic scaffolds [8,9]. This approach, which typically combines living cells seeded into synthetic biodegradable [10,11] or natural polymeric scaffolds [12–14], produced tissue engineered vascular grafts (TEVGs) with appropriate mechanical properties and promising *in vivo* outcomes. To avoid the use of exogenous materials, our group proposed to roll sheets of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) produced *in vitro* in order to form completely biological tubes. These human TEVGs (autologous [15,16] and allogenic [17]) were successfully used as vascular grafts in humans. Despite these very encouraging results, all these methods require extensive cell culture and a maturation phase in bioreactors making them long, complex and costly. For example, using the CAM sheet-based approach, TEVGs production exceeded 6 months and the treatment cost could be as high as 15 000 \$ [18].

In this study, we used human amniotic membranes (HAMs) instead of CAM sheets in order to produce completely biological and human TEVGs with a more cost-effective strategy. The HAM is the innermost layer of the fetal membranes which surrounds the fetus during its embryonic development [19]. This tissue is routinely discarded *post-partum* and, consequently, is a widely available and affordable raw material. Moreover, with low immunogenicity [20], anti-inflammatory properties [21], anti-microbial effects [22], blood compatibility [23], high mechanical strength [24] and suture-holding capacity, the HAM is an attractive biological scaffold for tissue engineering, especially in the vascular field. Not surprisingly, rolled HAMs were

previously used to produce allogeneic TEVGs and were implanted in animal models [25]. However, as described for the CAM sheet approach [26], the fusion between the rolled layers was obtained after additions of cultured cells and a maturation step in a bioreactor [25,27]. To avoid such a long and costly manufacturing process, our group recently proposed a new textile-inspired CAM assembly approach to produce woven TEVGs with high mechanical strength [28].

Thus, in this report, we show that a cost-effective, completely biological, allogeneic, human TEGV can be produced by combining the use of HAM with a textile-inspired assembly strategy. Firstly, HAM yarns were produced and characterized. Then, impacts of decellularization and/or gamma sterilization on their histological and mechanical features were investigated. Finally HAM yarn were assembled by weaving to produce TEVGs whose *in vitro* mechanical properties were assessed.

2. Materials and methods

2.1. HAM collection

Fetal membranes were collected from patients who had a caesarean delivery at term before the initiation of labor. Patients were recruited for this study with informed consent approved by the institutional review board. All patients had mono-fetal pregnancies and were seronegative for Human Immunodeficiency Virus (HIV) 1 or 2, and for Hepatitis B and C viruses. Tissues were kept in ice-cold transport solution containing phosphate buffered solution (PBS 1X, Gibco®) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco®). The next day, negative HIV 1 and 2 serologies were confirmed using a band immunochromatography test (ALERE®, ref: 7D2346) prior to yarn production.

2.2. Yarn production

First, the umbilical cord was cut off. Tissues were then rinsed with distilled water at least six times to remove as much blood as possible. The placenta and its membranes were placed on a large cutting board with the placental long axis oriented horizontally (figure 1A). Membranes were cut with a surgical blade to obtain sheets (figure 1B). The amnion and the chorion of each sheet were then separated manually. Wet HAM sheets were stored at -20°C until needed. After thawing at room temperature in distilled water for 30 min, HAM sheet (10 cm by 18 cm) from the peripheral region, i.e., not the placental region, was placed into a custom cutting device (figure 1C). Blades were pressed on the sheet and the device was pushed to rotate the blades and cut the HAM to obtain 5- or 10-mm-wide ribbons (figure 1D). To create threads (twisted ribbons), one extremity of a ribbon was attached on a rotating device, while the manipulator held the other extremity. The calibrated motor was turned on, for a set duration according to ribbon length, and the manipulator gently massaged the tissue during the twisting process to evenly distribute the torsion. Ribbons were twisted at 5, 7.5 and 10 revolutions per centimeter length (rev/cm) to form threads that were mechanically strong (figure 1E and F). Then, HAM yarns (both ribbons and threads) were devitalized. The devitalization process includes the following steps: (1) drying at room temperature under a biosafety cabinet, (2) storage at -80°C and (3) rehydration when needed (in distilled water during 30 min). As in a previous work we demonstrated that the placental HAM was significantly stronger and more stretchable than its peripheral counterpart [29], this area was used to produce our circumferential thread. Thus, 2 placental HAM sheets (10 cm by 10 cm) were dried

on a thin sacrificial plastic sheet with a printed pattern of a spiral on the opposite side (to avoid ink transfer). Both sheets were cut with a scissor following the spiral. Using this approach, two continuous 1.5 m-long and 5 mm-wide ribbons can be produced. For the production of the circumferential thread used to weave the TEVG, these two segments were twisted together at 5 rev/cm. The internal part of the spiral was twisted with the external part of the other spiral to even out any possible curvature-dependent weaknesses.

2.3. Yarn additional processing

Yarns were decellularized and/or gamma-sterilized. For decellularization, yarns were first incubated with trypsin (1.25 g/l) and ethylenediaminetetraacetic acid (0.625 g/l) for two minutes at 37°C. After rinsing steps in PBS (3x5 min) and distilled water (1x5 min), yarns were placed on an orbital shaker at room temperature for 7h with a decellularization solution (8 mM CHAPS, 25 mM EDTA, 0.12 M NaOH and 1 M NaCl in PBS), and then washed with PBS (1x5 min) and distilled water (3x30 min). Dry or hydrated (distilled water) yarns were sterilized with gamma irradiation of 25 kGy (BGS, Germany).

2.4. Cryo-electron microscopy

Yarns were fixed with 2.5 % glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer. Samples were mounted with a mixture of tissue freezing medium and colloidal graphite and rapidly transferred into liquid nitrogen, and then, into the preparation chamber (-140 °C). Samples were sublimated (-95 °C) and coated with platinum (30 s / 10 mA). Samples were then transferred to the microscope cryostage (CRYO-SEM PP3010T, Quorum Technologies, England). Observations were done at 3 kV with a GeminiSEM 300_FESEM (ZEISS, Germany).

2.5. Histological analysis

Yarns were fixed in a 4 % of paraformaldehyde-based solution (Antigenfix, Microm Microtech, France) overnight at room temperature. After rinses in PBS, yarns were put in cassettes and processed for paraffin embedding. Paraffin sections (5 µm) were deparaffinized in toluene, followed by a descending series of ethanol baths and stained with Masson's trichrome, which specifically stains collagen and cells in green and purple, respectively. Images were acquired using an Eclipse 80i microscope (Nikon, Japan).

2.6. Transmission electron microscopy

Yarns were fixed with 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 2 % glutaraldehyde, pH 7.5, at 4 °C overnight and post-fixed *en bloc* with 1 % osmium tetroxide. Tissues were stained with 0.5 % uranyl acetate for 1 h at 4 °C. After dehydration, the samples were embedded in Epon 812. Ultrathin sections were mounted on formvar-coated grids and stained with uranyl acetate (3 %) and lead citrate (1 %). Samples were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

2.7. Yarn characterization

Rehydrated yarn cross-section was approximated to a circle whose diameter was measured, under a constant tension, with a laser micrometer (Xactum, AEROEL). Then, yarns were clamped in the jaws of a tensile testing machine (Shimadzu, AGS-X, force sensor 100 N), pre-loaded at 20 mm/min until they reached 0.1 N, and then stretched until rupture at a speed of 1 % of loaded initial length per second. Samples remained hydrated throughout the test. Both maximal force (F_{max}) and strain at failure (S_{max}) were recorded. Ultimate Tensile Stress (UTS) was F_{max} divided by the cross-section area determined using laser micrometer measurement.

2.8. TEVGs production and mechanical properties

TEVGs were produced using a basic weaving technique (plain 1/1) with a custom-made circular loom. One circumferential yarn (forming the “weft”) was inserted between a movable and a fixed set of tensioned yarns (the “warp”) to create the woven tube. The two sets of the warp were then moved to cross over the weft, and the circumferential yarn was run again between the two sets, and so on. TEVGs were produced with 51 longitudinal ribbons and one double-ribbon thread (as described in section 2.2) as the circumferential thread. To measure transmural permeability, TEVGs were cannulated and pressurized with water at 120 mmHg. Leakage was collected for 1 minute and permeability was expressed as ml/min/cm². Suture retention and burst pressure were performed as previously described with some modifications [30]. Suture pull out was performed using 7-0 Prolene® with a bite of 2 mm at a speed of 150 mm/min and only one site per vessel could be tested because of the failure mode of the woven TEVG. For burst pressure, the TEVG was cannulated, on a testing device, over a thin latex balloon to avoid leakage at high pressure. The TEVG was pressurized until rupture using compressed air from a tank. The test lasted approximately 15 seconds. The pressure needed to dilate

the balloon alone to a diameter larger than that of the TEVG at failure (100 mmHg) was negligible compared to the burst pressure but was still subtracted from the latter.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. If data followed Gaussian distribution (D'Agostino and Pearson omnibus normality test), differences were assessed by two-tailed t-test (two groups compared) or by one-way analysis of variance (more than two groups compared). Otherwise, they were assessed by Mann and Whitney test (two groups compared) or by Kruskal-Wallis test (more than two groups compared). In all cases, differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) highlighted the smooth and homogenous surface of 5-mm-wide devitalized HAM yarn. No tissue damage (cracks, holes...) due to the dehydration/freezing/rehydration cycle (devitalization) was observed. Yarn diameter seemed to decrease with twisting until a plateau at 7.5 rev/cm (figure 2A to 2D). On supplementary figure 1, HAM trilaminar architecture (epithelium, basement membrane and conjunctive layer) described in the literature [31] was clearly visible. Figures 2E to 2H show cross-sections of HAM yarns after Masson's trichrome staining. We can note how the HAM ribbons spontaneously collapsed when taken out of distilled water to form a usable yarn and how twisting compacted the matrix to form threads. This compaction phenomenon was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) observations which revealed the increase in collagen fibril concentration as the result of twisting (figure 2I to 2L).

Cryo-SEM observations were consistent with laser measurements showing that yarn diameter was significantly decreased with twisting up to 7.5 rev/cm (figure 3A). Using uniaxial tensile tests, we then demonstrated that twisting had a tendency to increase both maximal force (F_{max}) and strain at failure (S_{max}) although differences between groups were not statistically significant (figures 3B and 3C). As expected, ultimate tensile stress (UTS) was increased with twisting, with effect becoming significant at 7.5 and 10 rev/cm (figure 3D). Taken together, these results highlighted that HAM yarn physical and mechanical properties could easily be tuned by twisting.

Since our clinical strategy will be to provide an off-the-shelf, allogeneic implant, effects of decellularization and sterilization on HAM ribbons were studied. In Figure 4, histological analysis showed that the decellularization process effectively removed cellular components that remained after devitalization (figure 4A, 4B). Removal of DNA was confirmed by DAPI staining (supplementary figure 2). Decellularized samples had a more compact global appearance (figure 4B). However, this diameter decrease did not reach statistical significance (figure 4E). HAM mechanical properties were unchanged (figures 4F and 4H) except the strain at failure which was significantly increased (figure 4G). HAM ribbons were sterilized using a standard method based on gamma radiations. Dry-sterilized samples had a denser and thinner collagen layer (figures 4C). This latter observation was confirmed by diameter measurement that showed a significant

decrease compared to devitalized ribbons (figure 4E). Mechanically, strength was unaffected (figure 4F) whereas stretchability was significantly reduced and ultimate tensile stress was significantly increased (figures 4G and 4H). Association of decellularization and dry sterilization led to an atypical histological coloration with purple staining on collagen fibers (figure 4D). This combined processing did not affect mechanical strength (figure 4F) but it appeared to further compact tissue (figures 4E) in an apparently additive manner. Gamma sterilization negated the effect of decellularization on stretchability while decellularization potentiated the effect of gamma sterilization on UTS (figures 4G, 4H).

Next, we hypothesized that the significant loss of tissue thickness caused by dry gamma sterilization was related to an inability to rehydrate after sterilization. Accordingly, we performed gamma sterilization on hydrated HAM ribbons and compared them to dry-sterilized ribbons. Dry-sterilized ribbons had cuboidal shape epithelial cells with condensed chromatin (figures 5A and 5C). Wet-sterilized ribbons were clearly thicker and had a collagen density as well as histological features that more closely resembled devitalized ribbons (figures 5B and 5D). Wet sterilization lead to significantly higher ribbon diameters (figure 5E). Ribbon strength was unaffected (figure 5F) whereas both strain at failure and ultimate tensile stress were significantly reduced by hydration at the time of irradiation (figures 5G and 5H).

Then, HAM devitalized yarns were assembled by manual weaving using a circular loom. For the first set of TEVGs, the weaving included 51 longitudinal ribbons (5 mm-wide) and one double-ribbon circumferential thread (twisted at 5 rev/cm). Thus, we obtained seven TEVGs (figure 6A). Their average internal diameter was 4.4 ± 0.2 mm (figure 6B). Their walls were tightly woven and homogenous while their ends were “finished” to stabilize the weave and to also providing a clear “collar” to ensure easy suturing (figures 6C, 6D and 6F). These woven TEVGs possessed robust mechanical strength as demonstrated by burst pressure (5628 ± 667 mmHg) and suture retention strength (5.30 ± 0.95 N) values that favorably compared to values of human internal mammary arteries (3196 ± 1264 mmHg and 1.38 ± 0.50 N respectively), the preferred vessel for heart bypass surgery (table 1) [1]. However, transmural permeability (47 ± 29 ml/min/cm²) was considered to be possibly too high to implant the graft without pre-clotting or some sort of sealing treatment. To improve this parameter, a second set of three TEVGs were woven with longitudinal ribbons twice as wide (10 mm) while the circumferential thread design was not modified. Theses TEVGs had a larger internal

diameter of 5.2 ± 0.4 mm. Nonetheless, their wall displayed an increased yarn density (figures 6E and 6G compared to figures 6D and 6F). As intended, transmural permeability was drastically reduced, to 1.0 ± 0.2 ml/min/cm², while burst pressure (8458 ± 671 mmHg) somewhat increased and suture retention strength (5.11 ± 1.18 N) remained unchanged.

4. Discussion

To drastically reduce the cost of tissue engineering methods typically used to produce TEVGs, we have described an innovative approach that combines the HAM with a textile-inspired assembly strategy. The resulting woven TEVGs showed supra-physiological burst pressure and suture retention strength, as well as low transmural permeability. Since the HAM is routinely discarded *post-partum*, it is a widely available and cost-effective biological raw material. Moreover, with low immunogenicity [20], anti-inflammatory properties [21], anti-microbial effects [22], blood compatibility [23], high mechanical strength [24], and suture-holding capacity, this tissue is an attractive biological scaffold, especially in the vascular field. Combining this promising material with a weaving assembly method further decreases production costs by avoiding the use of cells and bioreactors that are necessary in other methods in order to produce/fuse the extracellular matrix (ECM) to yield a cohesive TEVG [11,14,16,17,25]. Cost savings can come from a faster production time, reduced regulatory burden, reduced risk/cost related to bioreactors, the absence of tissue culture cost (serum/growth factor), and having a more reliable assembly process.

To our knowledge, two other groups have used the HAM to produce TEVGs. The model proposed by Niknejad *et al.*, that was a sutured HAM roll, was implanted in the jugular vein of sheep. After 48 weeks, the eight grafts were patent and showed a monolayer of endothelial cells on their luminal surfaces [32]. Although the method had a short production time, it is important to note that the TEVGs were implanted in a low pressure situation. Consequently, these promising results may not be transposable to an arterial implantation where the blood pressure is much higher. Moreover, no data on the mechanical properties of these TEVGs has been reported. McFetridge *et al.* have also developed a vascular graft by rolling the HAM. However, in this model, the fusion between the membrane layers was obtained by a seeding of smooth muscle cells that was followed by a maturation phase in a bioreactor for 4 weeks. After 1 month in the carotid artery of rabbits, the three grafts were patent and colonized by the host cells [25]. Despite these good short-term results, the main drawback of this approach is its high cost due to the cell culture steps. Thus, no assembly method allows to inexpensively produce of HAM TEVGs whose mechanical properties are compatible with an arterial implantation.

A textile-inspired assembly strategy has other advantages than simply avoiding the use of cultured cells. Weaving, as well as knitting and braiding, are fully automatable processes that are widely used to produce medical devices. There is no doubt that machines customized to handle HAM yarns could allow mass production of TEVGs once sufficient pre-clinical/clinical data is available to justify this development effort. Furthermore, yarn-based assembly methods have also the advantage of allowing fine control over the mechanical and dimensional properties of the construct [33,34]. For example, the mechanical properties of woven structures can be easily tuned by adjusting the yarns characteristics. In this study, we have shown that HAM ribbons could be twisted at various level to form more compact threads with varying mechanical properties. We can also easily and precisely control the width of the ribbons to control yarn diameter and mechanical strength. Although this is expected, and we did not formally show it here, we demonstrated these ribbon width-dependent properties when using CAM sheets [28]. In this study, we have shown that by the doubling the width of the longitudinal ribbons we effectively increased the yarn density in the wall of the vessel, as well as its diameter and burst pressure, while drastically decreasing the transmural permeability of the construct. This data illustrates the potential for tunability of this approach but also the complex relationship between yarn properties and vessel characteristics. Further studies will focus on understanding these relationships and the impact of circumferential thread properties as well as weaving patterns.

Our group has recently shown that biological yarns made of non-denatured ECM can also be produced from CAM synthesized by human dermal fibroblasts cultured *in vitro* [28]. These yarns have been assembled by weaving to produce a robust woven TEVG that was implanted as an interpositional graft in the carotid of sheep. When we compare CAM yarns with HAM yarns, we see that they are equally strong but the latter are twice as elastic (at the same width and twisting levels) [28]. This could be explained by the fact that the HAM contains significant amounts of elastin [35] and microfibrils of fibrillin [36] while CAM contains no organized elastic structures that are visible using histology stains [26]. CAM-based TEVGs (assembled by rolling) have shown very promising results in initial clinical use [15–17]. Considering that our HAM-based TEVG displays similarly impressive mechanical properties, that it is also made of non-denatured human ECM, but that it has the added advantage of being built from a more elastic material, one could expect that this more cost-effective TEVG will provide good *in vivo* outcomes.

Since our clinical strategy will be to provide an allogeneic and off-the-shelf implant, understanding the effects of decellularization and/or sterilization on HAM ribbons is critical. Despite its low immunogenicity [20], the HAM is often decellularized before being implanted to avoid any adverse host responses [37–40]. Therefore, many HAM decellularization methods have been described using various combinations of mechanical, chemical, and enzymatic treatments [39,41–43]. Our decellularization protocol has been validated on HAM, using DNA quantification, in a previous publication [39]. Based on histology, the decellularization treatment removed all cellular components that remained after devitalization of the yarn. Histological cross-sections suggested that decellularized ribbons folded much more compactly than devitalized ones, however, diameter decrease did not reach statistical significance when measured by bi-axial laser micrometry. This apparent discrepancy could be because ribbons are not under constant longitudinal tension throughout the histology processing, while they are during diameter measurements, and that unprocessed ribbons may “open up” more readily than decellularized ones during processing. Mechanically, HAM strength was unaffected and its stretchability was increased. Strength preservation was in agreement to results reported by Gholipourmalekabadi *et al.* [44] who associated chemical treatment (0.2% EDTA followed by 5 % ammonium chloride) with manual scraping to decellularize the HAM.

Although the HAM can be processed sterilely for clinical use, terminal sterilization methods are often used to simplify manufacturing and storage as well as to avoid the risk of infection transmission [41,45]. Among these methods, gamma irradiation presents many advantages (no toxic chemicals, no thermal effect, and easy sterilization in packaging) justifying its use at commercial scale to sterilize healthcare products [46]. A dose of gamma irradiation of 25 kGy is reported to sterilize biological tissue and to provide the microbiological safety mandated for clinical use [47,48]. When dry HAM ribbons were gamma-sterilized and then rehydrated, they were thinner, less stretchable and had higher ultimate tensile stress than their devitalized counterparts but their strength was not affected. These results were consistent to those obtained by other groups [49–51] and are indicative of modifications of the material such as collagen reticulation and damage of elastic fibers. The loss in ribbon diameter is problematic because this would cause holes in the wall of a TEVG when dry-sterilized, which would be our preferred manufacturing strategy. This could lead to

unacceptable transmural permeability. We hypothesized that this phenomenon was related to an inability of the irradiated tissue to fully rehydrate after sterilization. Therefore, we kept HAM ribbons hydrated during sterilization which resulted in thicker and more stretchable ribbons, apparently avoiding the effects of dry sterilization. While these results are encouraging, gamma irradiation of hydrated material is known to create free radicals that cause cross linking of collagen fibers [52]. Therefore, *in vivo* experiments will be needed to assess if the “denaturation” of the matrix was sufficient to trigger a degradative host response.

Achieving clinically relevant mechanical properties have long been a challenge for completely biological TEVGs. The woven TEVGs produced in this study displayed burst pressure and suture retention strength that equalized or surpassed values of both native vessels [30] and other biological TEVGs described in the literature [11,14,25,28]. Transmural permeability is an obvious concern for woven vascular grafts. The wall of vascular grafts made from synthetic textiles used to be sealed using a pre-clotting strategy when their transmural water permeability exceeded 350 ml/min/cm² [53,54]. Today, porous grafts are pre-sealed with proteins as part of the manufacturing process and some authors have suggested that an acceptable permeability threshold of 50 ml/min/cm² [55]. The permeability of our first TEVG design was near this threshold but we demonstrated that, by simply using wider ribbons, we could decrease this property by more than 40 folds to 1 ml/min/cm². This latter result clearly demonstrates the tunability of our assembly method.

5. Conclusions

Here, we demonstrate that, by combining the HAM and a weaving assembly approach, we could inexpensively produce completely biological human, small diameter TEVGs. We further demonstrated the tunability of the mechanical properties of the HAM yarn and of the woven TEVGs. The excellent mechanical properties of the grafts justify the transition towards implantation in animal models.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Patrick Guitton for his technical help.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest

None

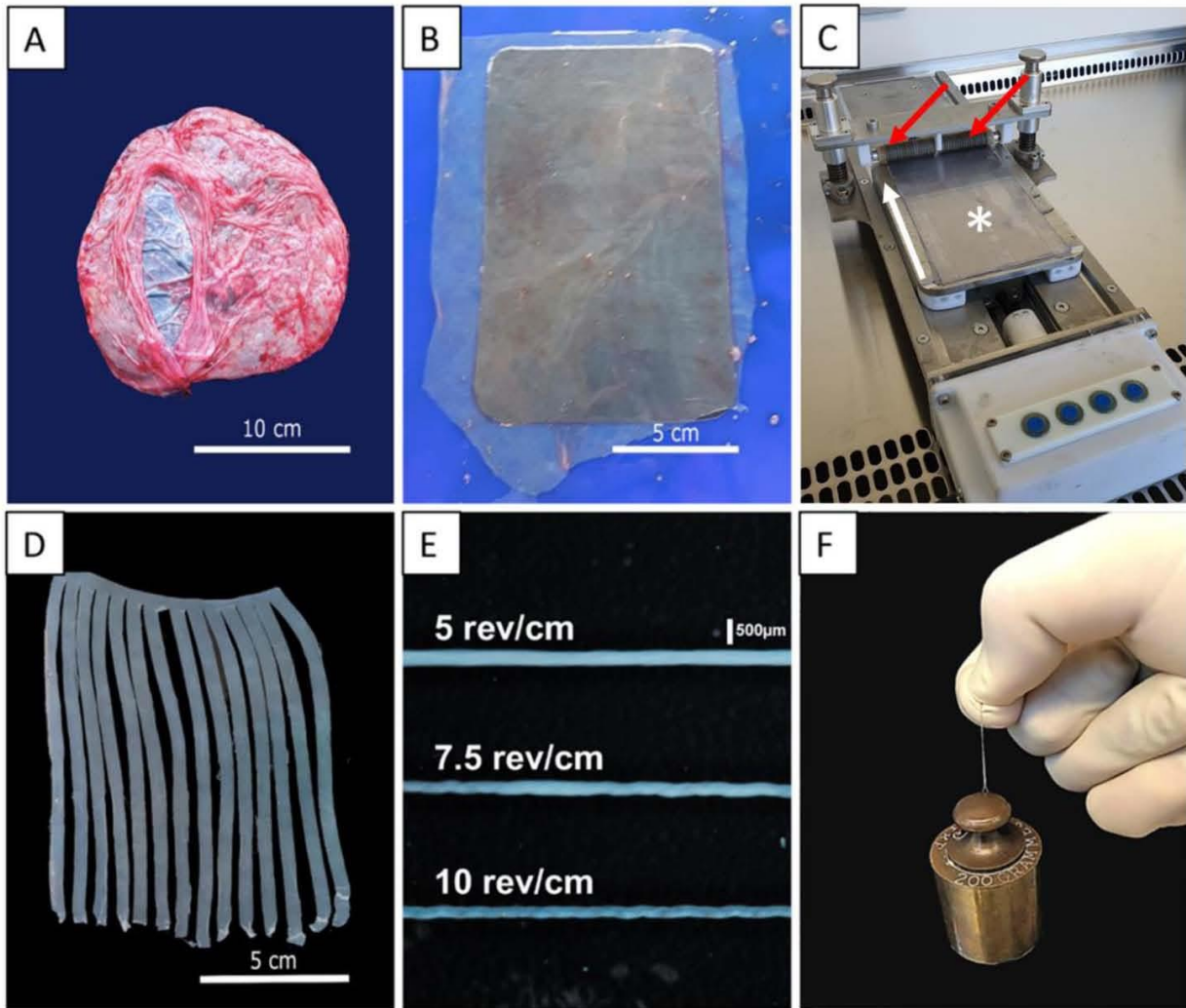


Figure 1: HAM yarn production. (A) The placenta, the umbilical cord and fetal membranes were collected from patients who had a caesarean delivery at term. The fetal bag (membranes) is seen on top of the placenta and a surgical incision is clearly visible. Scale bar = 10 cm. (B) Membranes were cut with a surgical blade to obtain rectangular sheets of 10 cm by 18 cm. Scale bar = 5 cm. (C) After manual elimination of the chorion, HAM sheets were placed into a mechanical cutting device with a series of blades (red arrows) which were pressed and rolled on the sheet in order to cut ribbons (white arrow shows direction of the mat supporting the sheet). * indicates the HAM sheet which is hardly visible on the transparent background. (D) Sixteen 5-mm-wide ribbons were obtained by longitudinally cutting the HAM sheet. Scale bar = 5 cm. (E) Ribbons could be twisted at 5, 7.5, or 10 revolutions per centimeter (rev/cm) to obtain threads. Scale bar = 500 μ m. (F) A thread (10 rev/cm) tied to, and lifting, a metal weight of 200 g.

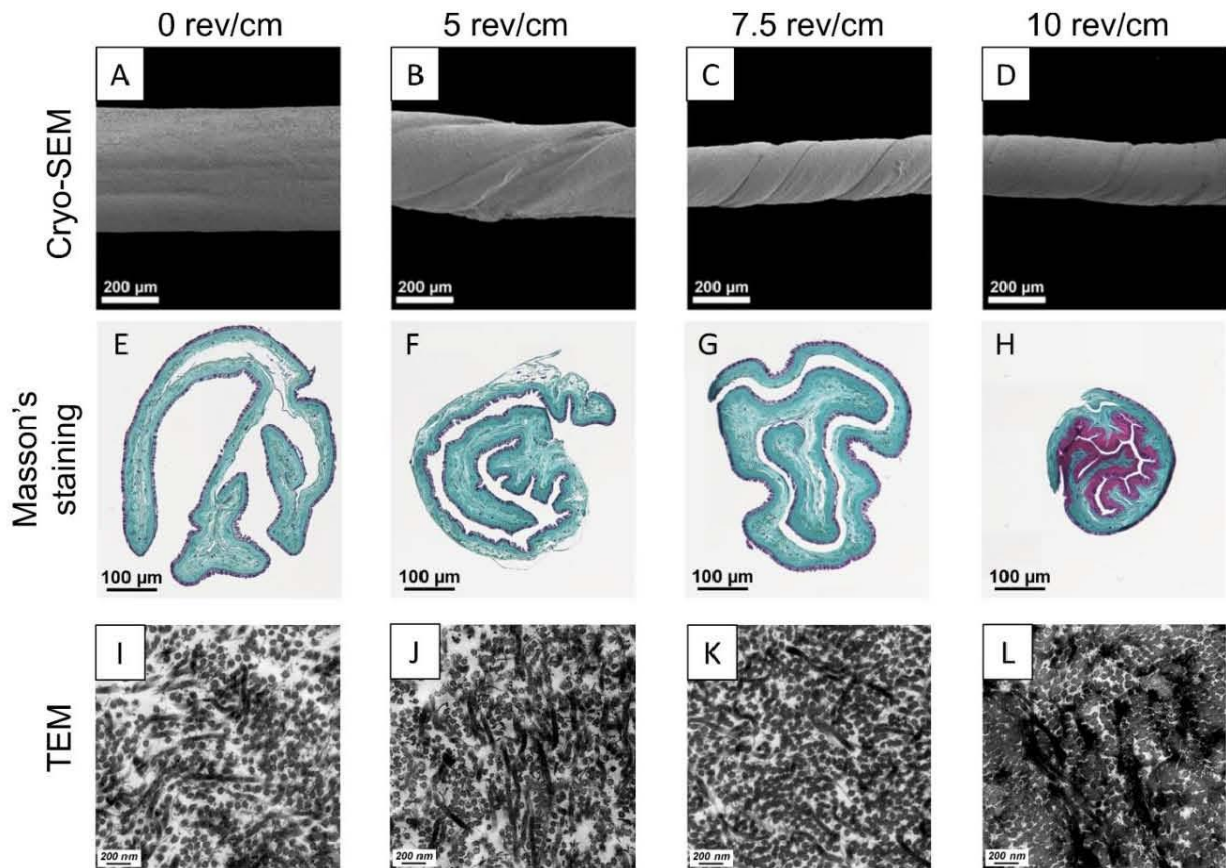


Figure 2: Microscopic aspects of HAM yarn. (A-D) are cryo-SEM images of the surface of a (A) ribbon and a thread twisted at (B) 5, (C) 7.5 and (D) 10 rev/cm. Cryo-SEM observations showed the smooth surface of the yarn and the changes in terms of diameter induced by twisting. Scale bar = 200 μm . (E-H) Cross-sections of paraffin-embedded yarn showed the tissue compaction induced by twisting. Masson's trichrome staining revealed the high collagen concentration in the material (green). Scale bar = 100 μm . (I-L) TEM of cross-sections of the dense conjunctive layer of the HAM yarn showed the increased density of collagen fibril induced by twisting. Scale bar = 200 nm. $n = 8$ samples, one representative experiment of three.

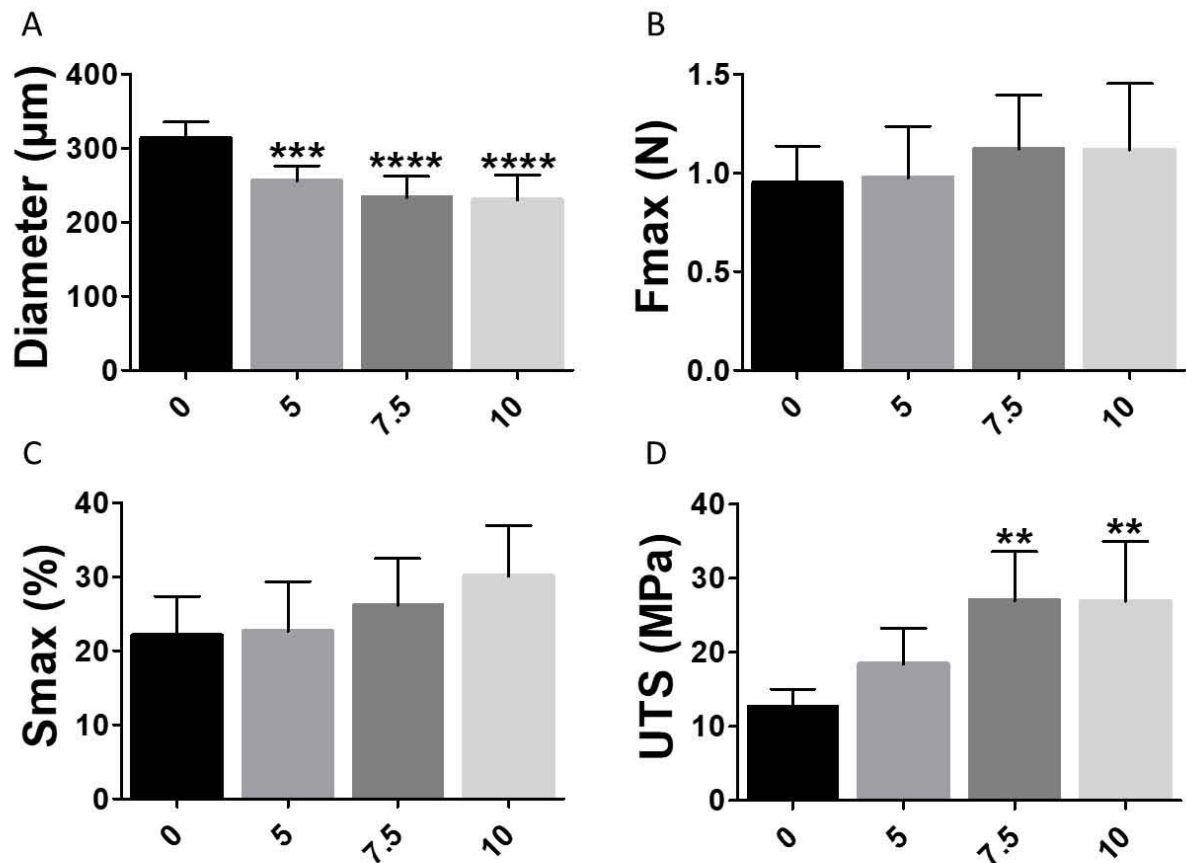


Figure 3: HAM yarn mechanical properties. (A) HAM yarn diameter significantly decreased as a function of twisting level (***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$ compared to 0). (B-C) Both maximal force (Fmax) and strain at failure (Smax) had tendency to increase with twisting. (D) Ultimate Tensile Stress (UTS) was significantly higher for threads twisted at 7.5 and 10 rev/cm compared to ribbons (**: $p < 0.01$ compared to 0). $n = 8$ samples, one representative experiment of three.

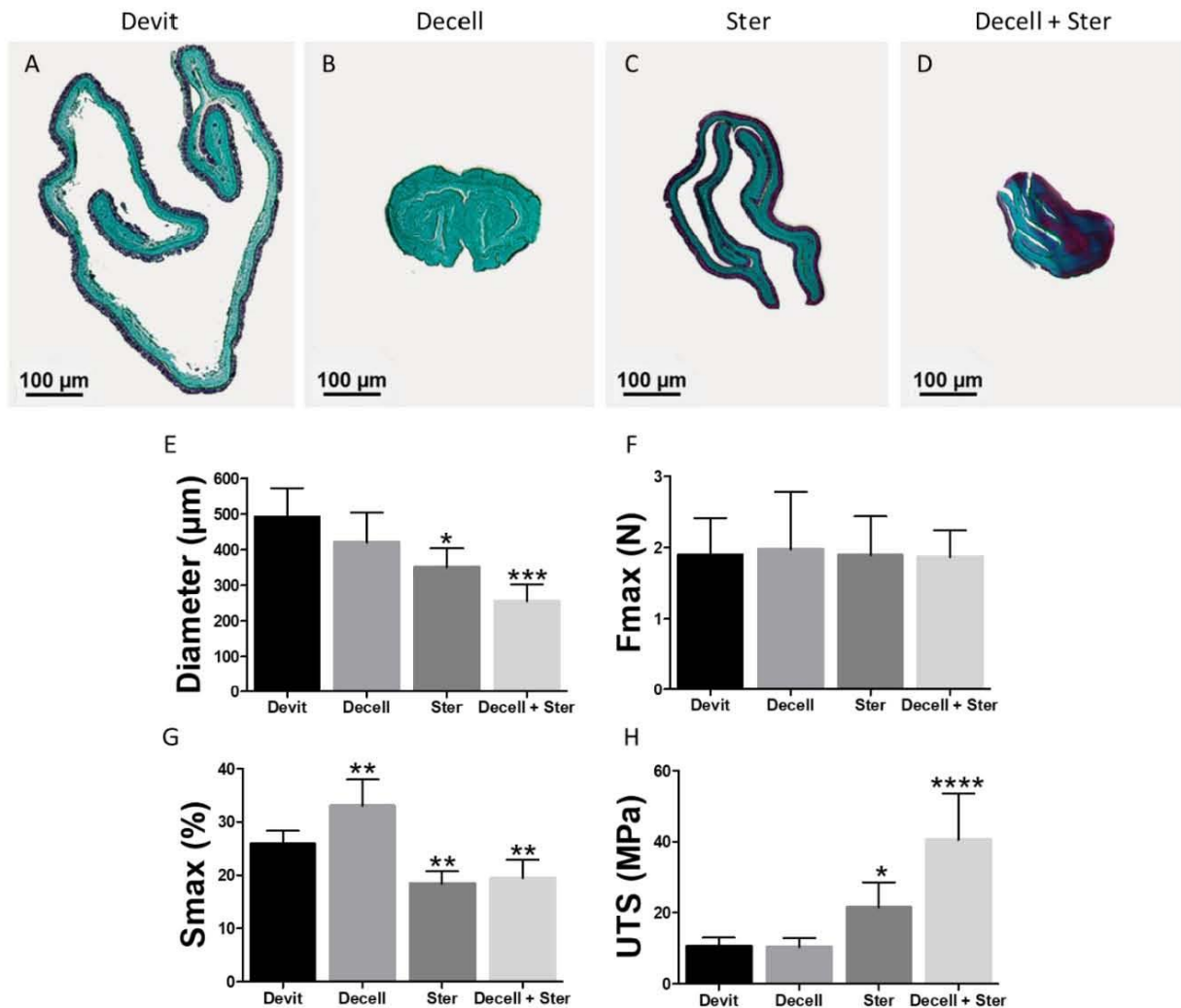


Figure 4: Effects of decellularization and/or gamma sterilization on HAM ribbons. (A-D) are cross-sections of paraffin-embedded (A) devitalized, (B) decellularized, (C) gamma-sterilized and (D) decellularized and gamma-sterilized ribbons. Masson's trichrome staining showed histological changes due to these treatments (cell removal for decellularization, compaction of conjunctive layer for gamma sterilization and atypical purple coloration on collagen fibers when both treatments were associated). Scale bar = 100 μm. (E) Ribbons diameter significantly decreased with dry sterilization whether or not associated with decellularization (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ compared to devitalization). (F) No change was observed for maximal force (Fmax). (G) Strain at failure (Smax) was significantly increased by decellularization whereas it was always reduced when sterilization was performed (**: $p < 0.01$ compared to devitalization). (H) Ultimate Tensile Stress (UTS) was significantly increased by sterilization whether or not associated with decellularization (*: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$ compared to devitalization). $n = 8$ samples.

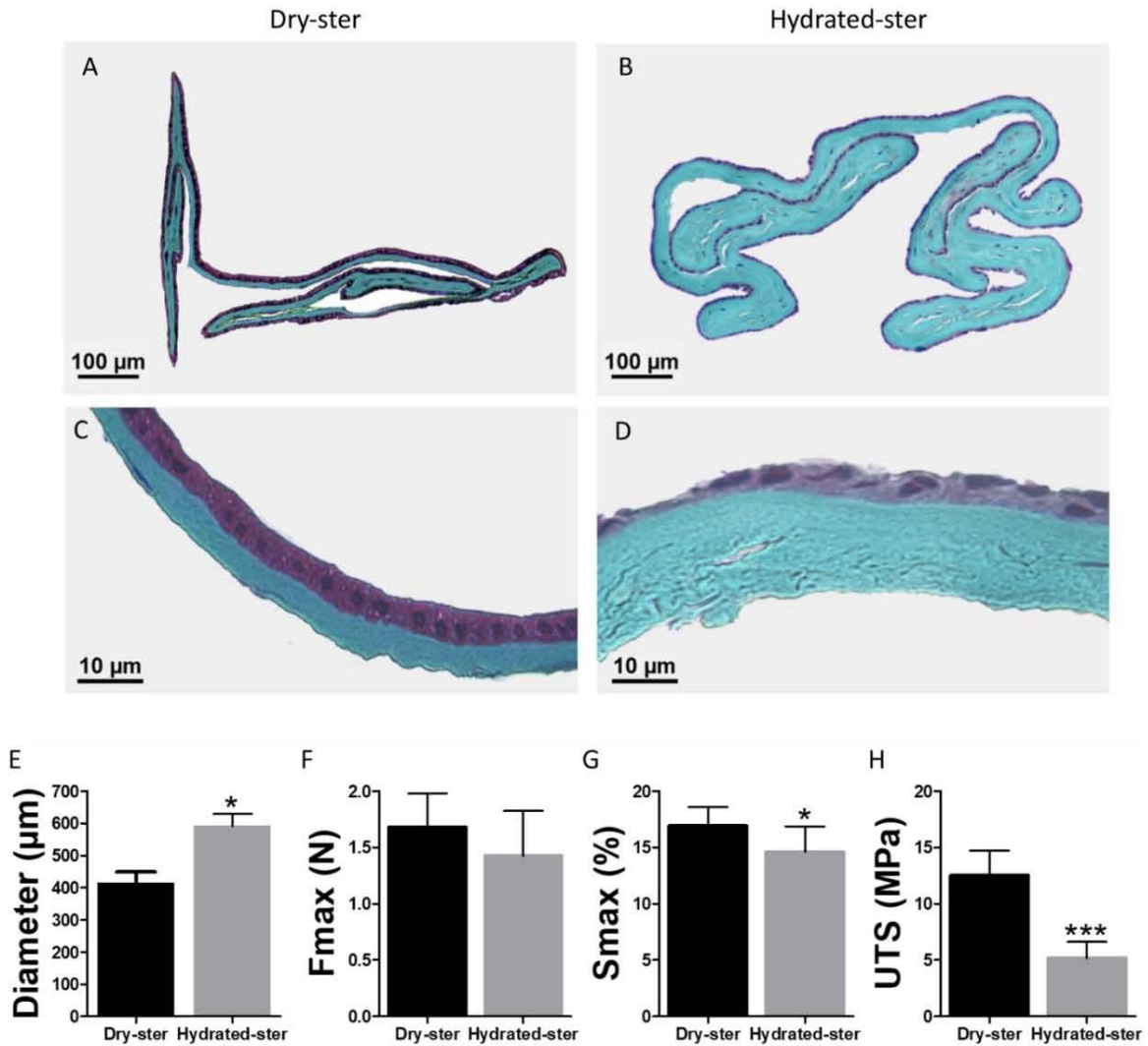


Figure 5: Comparison between dry and hydrated gamma sterilization on HAM ribbons. (A-B) are cross-sections of paraffin-embedded ribbon which was (A) dry- or (B) hydrated-gamma-sterilized. Scale bar = 100 μm. (C-D) were taken with a higher magnification. Scale bar = 10 μm. Masson's trichrome staining showed histological changes (increased tissue thickness, decreased collagen density, flat aspect of epithelial cells) due to hydrated sterilization. (E) Ribbons sterilized in distilled water had significantly higher diameter compared to those dry-sterilized (*: $p < 0.05$). (F-G-H) Mechanically, hydrated sterilization did not modify maximal force (F_{max}) while it significantly reduced both strain at failure (S_{max}) (*: $p < 0.05$) and Ultimate Tensile Stress (UTS) (***: $p < 0.001$). $n = 8$ samples.

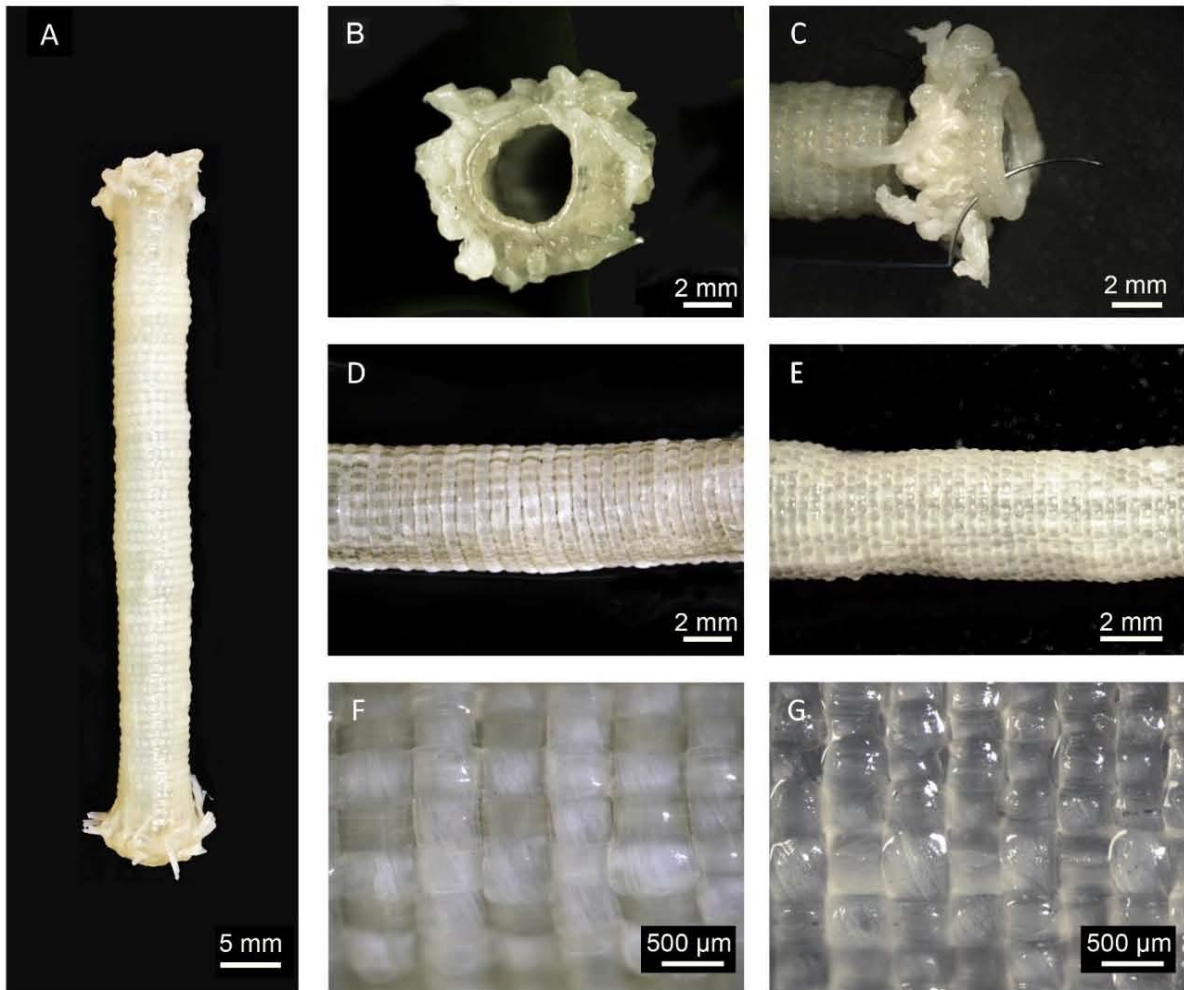


Figure 6: Structure of HAM woven TEVGs. (A-B) This HAM TEVG was 51 mm-long and had an internal diameter of 4.6 mm. Scale bar = 5 mm and 2 mm respectively. (C) The ends of the TEVG were “finished” to produce a clear and even ring for suturing. Scale bar = 2 mm. Weaving with (D) 5 and (E) 10 mm-wide longitudinal ribbons allowed the weaving of a homogenous wall. Scale bar = 2 mm. Compared to (F) 5 mm-wide ribbons, (G) weaving 10 mm-wide ribbons produced a denser wall. Scale bar = 500 μ m.

Table 1: Mechanical properties of HAM woven TEVGs compared to other biological TEVGs

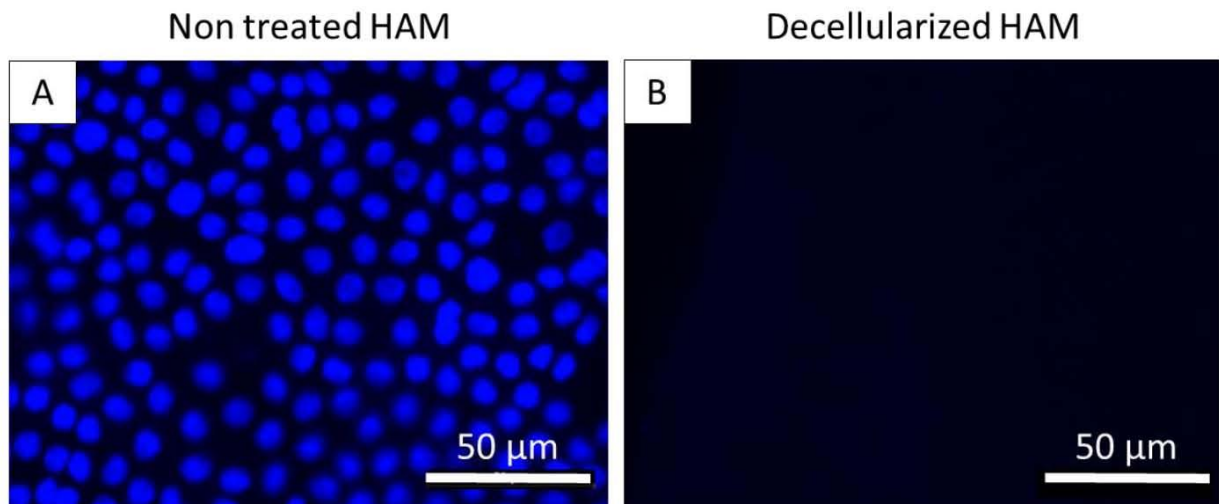
	Burst pressure (mmHg)	Suture retention (N)	Transmural permeability (ml/min/cm ²)
HAM TEVGs Ribbon width = 5mm	5628 ± 667 n = 7	5.30 ± 0.95 n = 7	47 ± 29 n = 7
HAM TEVGs Ribbon width = 10mm	8458 ± 671 n = 3 (p < 0.05)*	5.11 ± 1.18 n = 3 (p > 0.05)*	1.0 ± 0.2 n = 3 (p < 0.05)*
Human internal mammary artery [29]	3196 ± 1264 n = 16	1.38 ± 0.50 n = 6	N/A
CAM TEVGs [28]	5968 ± 732 n = 5	5.66 ± 0.17 n = 3	10 ± 8 n = 4
Rolled HAM TEVGs [25]	1430 ± 250 n = 3	-	N/A
TEVGs produced by Niklason <i>et al.</i> [11]	2914 ± 928 n = 5	2.10 ± 0.53 n = 109	N/A
TEVGs produced by Tranquillo <i>et al.</i> [14]	3164 ± 325 n = 6	1.99 ± 0.56 n = 6	N/A

* indicates comparison with TEVGs woven with 5 mm-wide ribbons. - indicates data which was not available.
N/A indicates data which was not applicable.

Supplementary material



Supplementary figure 1: Histology of devitalized HAM ribbon. Trichrome Masson's staining showed HAM trilaminar architecture with epithelium, basement membrane and conjunctive layer. Scale bar = 50 μm.



Supplementary figure 2: Validation of decellularization process. Fluorescence micrographs of *en face* views of HAM sheets stained with DAPI. (A) Nuclear material was strongly fluorescent on non treated HAM whereas no fluorescent labeling was observed on the decellularized HAM (B).

References

- [1] E.J. Benjamin, P. Muntner, A. Alonso, M.S. Bittencourt, C.W. Callaway, A.P. Carson, A.M. Chamberlain, A.R. Chang, S. Cheng, S.R. Das, F.N. Delling, L. Djousse, M.S.V. Elkind, J.F. Ferguson, M. Fornage, L.C. Jordan, S.S. Khan, B.M. Kissela, K.L. Knutson, T.W. Kwan, D.T. Lackland, T.T. Lewis, J.H. Lichtman, C.T. Longenecker, M.S. Loop, P.L. Lutsey, S.S. Martin, K. Matsushita, A.E. Moran, M.E. Mussolino, M. O'Flaherty, A. Pandey, A.M. Perak, W.D. Rosamond, G.A. Roth, U.K.A. Sampson, G.M. Satou, E.B. Schroeder, S.H. Shah, N.L. Spartano, A. Stokes, D.L. Tirschwell, C.W. Tsao, M.P. Turakhia, L.B. VanWagner, J.T. Wilkins, S.S. Wong, S.S. Virani, On behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation*. 139 (2019). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>.
- [2] W. Herrington, B. Lacey, P. Sherliker, J. Armitage, S. Lewington, Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease, *Circ. Res.* 118 (2016) 535–546. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>.
- [3] Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group, M.S. Conte, F.B. Pomposelli, D.G. Clair, P.J. Geraghty, J.F. McKinsey, J.L. Mills, G.L. Moneta, M.H. Murad, R.J. Powell, A.B. Reed, A. Schanzer, A.N. Sidawy, Society for Vascular Surgery, Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication, *J. Vasc. Surg.* 61 (2015) 2S-41S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.12.009>.
- [4] J. Chlupáč, E. Filová, L. Bacáková, Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery, *Physiol. Res.* 58 Suppl 2 (2009) S119-139.
- [5] C.E. Pereira, M. Albers, M. Romiti, F.C. Brochado-Neto, C.A.B. Pereira, Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency, *J. Vasc. Surg.* 44 (2006) 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.04.054>.
- [6] M. Sharrock, S.A. Antoniou, G.A. Antoniou, Vein Versus Prosthetic Graft for Femoropopliteal Bypass Above the Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *Angiology*. 70 (2019) 649–661. <https://doi.org/10.1177/0003319719826460>.
- [7] P. Zilla, D. Bezuidenhout, P. Human, Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing, *Biomaterials*. 28 (2007) 5009–5027. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.017>.
- [8] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens, The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future, *Tissue Eng. Part B Rev.* 22 (2016) 68–100. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0100>.
- [9] S. Dimitrievska, L.E. Niklason, Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8 (2018) a025742. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025742>.
- [10] S.L.M. Dahl, 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, L.E. Niklason, Readily available tissue-engineered vascular grafts, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 68ra9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001426>.
- [11] J.H. Lawson, M.H. Glickman, M. Ilzecki, T. Jakimowicz, A. Jaroszynski, E.K. Peden, A.J. Pilgrim, H.L. Prichard, M. Guziewicz, S. Przywara, J. Szmidt, J. Turek, W. Witkiewicz, N. Zapotoczny, T. Zubilewicz, L.E. Niklason, Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials, *The Lancet*. 387 (2016) 2026–2034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00557-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00557-2).
- [12] Z.H. Syedain, L.A. Meier, M.T. Lahti, S.L. Johnson, R.T. Tranquillo, Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery, *Tissue Eng. Part A*. 20 (2014) 1726–1734. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0550>.
- [13] Z. Syedain, J. Reimer, M. Lahti, J. Berry, S. Johnson, R.T. Tranquillo, Tissue engineering of acellular vascular grafts capable of somatic growth in young lambs, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12951. <https://doi.org/10.1038/ncomms12951>.
- [14] Z.H. Syedain, M.L. Graham, T.B. Dunn, T. O'Brien, S.L. Johnson, R.J. Schumacher, R.T. Tranquillo, A completely biological “off-the-shelf” arteriovenous graft that recellularizes in baboons, *Sci. Transl. Med.* 9 (2017). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4209>.

- [15] T.N. McAllister, M. Maruszewski, S.A. Garrido, W. Wystrychowski, N. Dusserre, A. Marini, K. Zagalski, A. Fiorillo, H. Avila, X. Mangano, J. Antonelli, A. Kocher, M. Zembala, L. Cierpka, L.M. de la Fuente, N. L'Heureux, Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study, *The Lancet*. 373 (2009) 1440–1446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60248-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60248-8).
- [16] W. Wystrychowski, L. Cierpka, K. Zagalski, S. Garrido, N. Dusserre, S. Radochonski, T.N. McAllister, N. L'heureux, Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access, *J. Vasc. Access*. 12 (2011) 67–70.
- [17] W. Wystrychowski, T.N. McAllister, K. Zagalski, N. Dusserre, L. Cierpka, N. L'Heureux, First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access, *J. Vasc. Surg.* 60 (2014) 1353–1357. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.018>.
- [18] T.N. McAllister, N. Dusserre, M. Maruszewski, N. L'Heureux, Cell-based therapeutics from an economic perspective: primed for a commercial success or a research sinkhole?, *Regen. Med.* 3 (2008) 925–937. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.6.925>.
- [19] M.P. Dobрева, P.N.G. Pereira, J. Deprest, A. Zwijsen, On the origin of amniotic stem cells: of mice and men, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 761–777. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092935md>.
- [20] M. Kubo, Y. Sonoda, R. Muramatsu, M. Usui, Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 1539–1546.
- [21] Y. Hao, D.H. Ma, D.G. Hwang, W.S. Kim, F. Zhang, Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane, *Cornea*. 19 (2000) 348–352.
- [22] N. Kjaergaard, M. Hein, L. Hyttel, R.B. Helmig, H.C. Schönheyder, N. Ulbjerg, H. Madsen, Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 94 (2001) 224–229.
- [23] M. Kakavand, G. Yazdanpanah, A. Ahmadiani, H. Niknejad, Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering: Haemocompatibility of amniotic membrane, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 1701–1709. <https://doi.org/10.1002/term.2064>.
- [24] H. Oxlund, R. Helmig, J.T. Halaburt, N. Ulbjerg, Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 34 (1990) 247–255.
- [25] S. Amensag, L. Goldberg, K.A. O'Malley, D.S. Rush, S.A. Berceci, P.S. McFetridge, Pilot assessment of a human extracellular matrix-based vascular graft in a rabbit model, *J. Vasc. Surg.* 65 (2017) 839–847.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.02.046>.
- [26] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins, T.N. McAllister, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat. Med.* 12 (2006) 361–365. <https://doi.org/10.1038/nm1364>.
- [27] S. Amensag, P.S. McFetridge, Rolling the Human Amnion to Engineer Laminated Vascular Tissues, *Tissue Eng. Part C Methods*. 18 (2012) 903–912. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0119>.
- [28] L. Magnan, G. Labrunie, M. Fénelon, N. Dusserre, M.-P. Foulc, M. Lafourcade, I. Svahn, E. Gontier, J.H. Vélez V, T.N. McAllister, N. L'Heureux, Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly “bio” material for tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 105 (2020) 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.037>.
- [29] A. Grémare, S. Jean-Gilles, P. Musqui, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, J.-C. Fricain, N. L'Heureux, Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 99 (2019) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.07.007>.
- [30] G. Konig, 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, N. L'Heureux, Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery, *Biomaterials*. 30 (2009) 1542–1550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.011>.
- [31] H. Niknejad, H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi, A.M. Seifalian, Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering, *Eur. Cell. Mater.* 15 (2008) 88–99.

- [32] H. Peirovi, N. Rezvani, M. Hajinasrollah, S.S. Mohammadi, H. Niknejad, Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep, *J. Vasc. Surg.* 56 (2012) 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.02.036>.
- [33] C. Singh, C. Wong, X. Wang, Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries, *J. Funct. Biomater.* 6 (2015) 500–525. <https://doi.org/10.3390/jfb6030500>.
- [34] R.M. Rossi, G. Fortunato, S. Nedjari, A. Morel, F. Heim, J.-F. Osselin, M.-A. Bueno, Mechanical properties of medical textiles, in: *Struct. Mech. Text. Fibre Assem.*, Elsevier, 2019: pp. 301–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102619-9.00009-2>.
- [35] M. Jabareen, A.S. Mallik, G. Bilic, A.H. Zisch, E. Mazza, Relation between mechanical properties and microstructure of human fetal membranes: an attempt towards a quantitative analysis, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 144 Suppl 1 (2009) S134–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.02.032>.
- [36] T.M. Malak, S.C. Bell, Distribution of fibrillin-containing microfibrils and elastin in human fetal membranes: a novel molecular basis for membrane elasticity, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171 (1994) 195–205. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(94\)90469-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(94)90469-3).
- [37] S.-P. Wilshaw, J. Kearney, J. Fisher, E. Ingham, Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells, *Tissue Eng. Part A.* 14 (2008) 463–472. <https://doi.org/10.1089/tea.2007.0145>.
- [38] R. Khorramirouz, S.M. Kameli, K. Fendereski, S.S. Daryabari, A.-M. Kajbafzadeh, Evaluating the efficacy of tissue-engineered human amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction, *Regen. Med.* 14 (2019) 113–126. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0024>.
- [39] M. Fenelon, D. B. Maurel, R. Siadous, A. Gremare, S. Delmond, M. Durand, S. Brun, S. Catros, F. Gindraux, N. L'Heureux, J.-C. Fricain, Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 104 (2019) 109903. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109903>.
- [40] M. Fenelon, M. Etchebarne, R. Siadous, A. Grémare, M. Durand, L. Sentilhes, Y. Torres, S. Catros, F. Gindraux, N. L'Heureux, J.-C. Fricain, Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice, *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2020). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36964>.
- [41] A.K. Riau, R.W. Beuerman, L.S. Lim, J.S. Mehta, Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction, *Biomaterials.* 31 (2010) 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.034>.
- [42] A. Shakouri-Motlagh, R. Khanabdali, D.E. Heath, B. Kalionis, The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM), *Placenta.* 59 (2017) 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.002>.
- [43] S. Khosravimelal, M. Momeni, M. Gholipur, S.C. Kundu, M. Gholipourmalekabadi, Protocols for decellularization of human amniotic membrane, *Methods Cell Biol.* 157 (2020) 37–47. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.004>.
- [44] M. Gholipourmalekabadi, M. Mozafari, M. Salehi, A. Seifalian, M. Bandehpour, H. Ghanbarian, A.M. Urbanska, M. Sameni, A. Samadikuchaksaraei, A.M. Seifalian, Development of a Cost-Effective and Simple Protocol for Decellularization and Preservation of Human Amniotic Membrane as a Soft Tissue Replacement and Delivery System for Bone Marrow Stromal Cells, *Adv. Healthc. Mater.* 4 (2015) 918–926. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400704>.
- [45] M. Gholipourmalekabadi, B. Farhadhosseinabadi, M. Faraji, M.R. Nourani, How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures?, *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>.
- [46] R. Singh, D. Singh, A. Singh, Radiation sterilization of tissue allografts: A review, *World J. Radiol.* 8 (2016) 355. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.355>.
- [47] International Atomic Energy Agency, Guidelines for industrial radiation sterilization of disposable medical products, (1990).
- [48] R. Singh, S. Purohit, M.P. Chacharkar, P.S. Bhandari, A.S. Bath, Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns, *Burns.* 33 (2007) 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.08.004>.
- [49] H. Mrázová, J. Koller, K. Kubišová, G. Fujeříková, E. Klincová, P. Babál, Comparison of structural changes in skin and amnion tissue grafts for transplantation induced by gamma and electron beam

- irradiation for sterilization, *Cell Tissue Bank*. 17 (2016) 255–260. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9536-3>.
- [50] F. von Versen-Höynck, C. Syring, S. Bachmann, D.E. Möller, The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts--light and scanning electron microscopic studies, *Cell Tissue Bank*. 5 (2004) 45–56.
- [51] F. von Versen-Hoeyneck, A.P. Steinfeld, J. Becker, M. Hermel, W. Rath, U. Hesselbarth, Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts, *Biologicals*. 36 (2008) 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.02.001>.
- [52] K.A. da Silva Aquino, Sterilization by Gamma Irradiation, in: F. Adrovic (Ed.), *Gamma Radiat., InTech*, 2012. <https://doi.org/10.5772/34901>.
- [53] M.W. King, R.G. Guidoin, K.R. Gunasekera, C. Gosselin, Designing polyester vascular prostheses for the future, *Med. Prog. Technol.* 9 (1983) 217–226.
- [54] S.J. Snooks, R.J. Croft, C. Wagner, How should we preclot knitted Dacron grafts?, *J. Vasc. Surg.* 7 (1988) 538–542. <https://doi.org/10.1067/mva.1988.av0070538>.
- [55] R.A. Jonas, F.J. Schoen, R.J. Levy, A.R. Castaneda, Biological sealants and knitted Dacron: porosity and histological comparisons of vascular graft materials with and without collagen and fibrin glue pretreatments, *Ann. Thorac. Surg.* 41 (1986) 657–663. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(10\)63083-4](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(10)63083-4).

2.3 Conclusions

Dans ce travail, des fils de MAH périphérique, qui constituent les plus nombreuses unités de construction de nos greffons, ont tout d'abord été produits, puis caractérisés grâce à différentes techniques. Le torsadage est alors apparu comme une façon simple de compacter le tissu et de modifier ses propriétés mécaniques. Notre objectif à long terme étant de fournir un substitut vasculaire allogénique prêt à l'emploi, les effets de différents traitements (décellularisation et/ou stérilisation aux rayons gamma) sur la structure histologique et les propriétés mécaniques de fils de MAH non torsadés (rubans) ont été étudiés. La préservation du diamètre des rubans était notre principale préoccupation. En effet, une diminution de diamètre entraînerait l'apparition d'espaces dans la paroi du substitut vasculaire conduisant à une perméabilité transmurale incompatible avec un usage clinique. Nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène était lié à une incapacité du tissu irradié à se réhydrater complètement après la stérilisation. Les rubans de MAH immergés dans l'eau distillée pendant la stérilisation étant plus épais, cette hypothèse a été validée. Ainsi, cette méthode semble prometteuse pour la stérilisation de nos greffons avant implantation.

Par la suite, les fils de MAH ont été assemblés par tissage manuel, sur un métier circulaire, pour produire des substituts vasculaires de petit diamètre. Les conclusions de la première partie de notre travail nous ont alors permis d'optimiser l'utilisation de la MAH. Ainsi, les rubans longitudinaux et le fil circonférentiel étaient respectivement prélevés au niveau de la MAH périphérique et placentaire. Afin d'obtenir une quantité de matériel suffisant, des MAHs provenant de plusieurs donneurs étaient nécessaires pour produire un seul greffon. Par ailleurs, pour éviter tous problèmes d'effilochage au niveau des extrémités, une technique de finition permettant l'obtention d'une collerette a été utilisée. Notre première série de greffons présentait une perméabilité transmurale élevée. La production d'une deuxième série de greffons, avec des rubans longitudinaux deux fois plus larges, a permis d'obtenir des parois plus denses et par conséquent d'atteindre un niveau de perméabilité compatible avec une utilisation clinique. Ces résultats démontrent l'adaptabilité de notre méthode d'assemblage qui permet, en modifiant les caractéristiques des fils, d'obtenir les propriétés mécaniques désirées. Finalement, les greffons produits présentaient des propriétés mécaniques (pression à l'éclatement, rétention à la suture et perméabilité transmurale) largement supérieures à celles des vaisseaux natifs [111] et à celles des autres modèles de substituts vasculaires biologiques décrits dans la littérature [24,25,171]. Les principales perspectives de ce travail s'ouvrent, par conséquent, sur l'implantation chez l'animal, de ces greffons tissés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En résumé, ce travail était composé de trois parties.

Dans la **première partie**, la pertinence de la force maximale et de l'allongement à la rupture pour évaluer les propriétés mécaniques de la MAH a été démontrée. Ensuite, grâce à huit cartographies détaillées, la MAH placentaire est apparue comme une zone particulièrement intéressante avec des propriétés mécaniques isotropiques et augmentées en termes de force et d'étirabilité par rapport à la MAH périphérique. Par conséquent, les rubans longitudinaux et le fil circonférentiel ont, dans la suite de ce travail, respectivement été prélevés au niveau de la MAH périphérique et placentaire. Par ailleurs, les résultats obtenus concernant la variabilité des propriétés mécaniques nous autorisaient raisonnablement à utiliser des MAHs provenant de différents donneurs pour produire un seul greffon.

Dans la **deuxième partie**, des fils de MAH périphérique, qui constituent les plus nombreuses unités de construction de nos greffons, ont été produits et caractérisés grâce à différentes techniques. Nous avons alors mis en évidence que le torsadage était une façon simple de compacter le tissu et de modifier ses propriétés mécaniques. Ensuite les effets de différents traitements (décellularisation et/ou stérilisation aux rayons gamma) sur la structure histologique et les propriétés mécaniques de fils de MAH non torsadés (rubans) ont été étudiés. Bien que la force des échantillons soit préservée, ces traitements modifiaient de manière significative le diamètre des rubans ce qui, à l'échelle du substitut vasculaire, pourrait avoir des conséquences non négligeables sur la perméabilité transmurale. Le diamètre étant préservé lorsque les rubans étaient stérilisés hydratés, cette méthode semble prometteuse pour stériliser nos greffons avant de les implanter.

Dans la **troisième partie**, les fils de MAH ont été assemblés par tissage manuel, sur un métier circulaire, pour produire des substituts vasculaires de petit diamètre. Afin d'éviter tous problèmes d'effilochage au niveau des extrémités, une technique de finition permettant l'obtention d'une collerette a été utilisée. Les résultats obtenus ont, par ailleurs, apporté la preuve de l'adaptabilité de notre méthode d'assemblage. En effet, lorsque la largeur des rubans longitudinaux était doublée, la pression à l'éclatement était significativement augmentée et la perméabilité transmurale significativement réduite. Finalement les greffons obtenus présentaient des propriétés mécaniques (pression à l'éclatement, rétention à la suture et perméabilité transmurale) largement supérieures à celles des vaisseaux natifs [111] et à celles des autres modèles de substituts vasculaires biologiques décrits dans la littérature [24,25,171].

Outre la réplication des expérimentations portant sur les effets des différents traitements sur les propriétés mécaniques des rubans de MAH, les perspectives de ce travail concernent (1) l'endothélialisation de la MAH, (2) l'implantation *in vivo* des greffons, (3) l'amélioration de la conception du substitut vasculaire et (4) l'automatisation de la technique d'assemblage.

Endothélialisation de la MAH

A ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur le comportement des cellules endothéliales selon que la face de la MAH ensemencée soit épithéliale ou conjonctive. La création et le maintien d'un endothélium fonctionnel étant des éléments cruciaux dans la réussite de la substitution vasculaire, il nous paraît, par conséquent, pertinent de réaliser une série d'expérimentations sur cette thématique. Afin de sélectionner le traitement des fils pour les futures implantations (dévitalisation seule ou précédée d'une décellularisation), nous avons également décidé d'étudier l'effet de la décellularisation sur la capacité de la MAH à être colonisée par des cellules endothéliales. Les échantillons prévus pour cette série d'expériences ont été gamma-stérilisés hydratés. Compte tenu des modèles cellulaires utilisés en routine au laboratoire, les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine seront utilisées. Leur marquage par une protéine fluorescente permettra un suivi facilité de leur prolifération sur les membranes jusqu'à obtention de la confluence. Grâce à plusieurs expériences préliminaires, la densité d'ensemencement a été déterminée. Les résultats obtenus, par la suite, compléteront ceux présentés dans le projet d'article n°2.

Implantation *in vivo* des greffons

Nos substituts vasculaires présentant des propriétés mécaniques supra physiologiques *in vitro*, leur implantation *in vivo* peut être légitimement envisagée. Ces expérimentations permettront de confirmer leur suturabilité lors de la chirurgie, d'évaluer leur hémocompatibilité, la réponse inflammatoire induite par l'implantation, ainsi que leur remodelage par les cellules de l'hôte.

Pour ce faire, l'implantation des greffons dans l'aorte abdominale de rats immunosupprimés est envisagée. En effet, nos substituts vasculaires étant d'origine humaine, le recours à un animal immunodéficient est nécessaire. De plus, afin d'éviter le recours à d'autres espèces, un modèle de petit animal est préférable, dans un premier temps.

D'après les données de la littérature [147], des substituts vasculaires de 1,5 mm de diamètre interne et de 8 mm de long devront être produits. Du fait de la réduction importante de ces dimensions par rapport à celles de notre modèle actuel, la largeur des fils et le nombre de rubans longitudinaux devront être adaptés.

Par ailleurs, avant l'implantation, les éventuels effets de la stérilisation aux rayons gamma sur les propriétés mécaniques de nos greffons devront être étudiés. Si ces propriétés n'étaient plus en adéquation avec les prérequis nécessaires, une autre méthode de stérilisation devrait être envisagée. Pour guider notre choix, nous pourrions alors nous appuyer sur les résultats d'une étude actuellement menée au laboratoire qui porte sur les effets de différentes méthodes de stérilisation sur la dégradation *in vivo* et les propriétés mécaniques de fils produits à partir de la culture de fibroblastes de derme humain.

Une fois ces différents éléments investigués, les greffons seront d'abord implantés dans un petit nombre d'animaux, suivis à court terme, afin de valider la procédure expérimentale. Ensuite, un suivi à plus long terme impliquant un plus grand nombre d'animaux pourra être réalisé. Ces expérimentations ont fait l'objet d'une saisine qui a été validée par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Amélioration de la conception du substitut vasculaire

A cause de l'assemblage par tissage, nos substituts vasculaires ne peuvent actuellement pas être coupés à la longueur désirée sans s'effiloche. Afin de pallier à cette limite, plusieurs solutions peuvent être envisagées. La plus simple, bien que peu satisfaisante, consiste en la production de greffons de différentes longueurs afin que le chirurgien puisse, au moment de l'intervention, choisir celle s'adaptant le mieux à la situation clinique.

Par ailleurs, d'autres techniques basées sur l'utilisation d'une colle biologique ou sur un traitement énergétique par radiofréquence pourront être étudiées. En effet, en fusionnant les mailles du tissage, elles permettraient aux greffons d'être coupés à la longueur optimale avec l'angle idéal.

Automatisation de la technique d'assemblage

Actuellement, avec notre métier à tisser manuel, cinq jours de travail pleins sont nécessaires pour obtenir un substitut vasculaire. A terme, ce procédé chronophage sera un frein à l'avancée des travaux. Avec l'automatisation de la technique de tissage, les greffons seraient produits plus rapidement, en plus grande quantité et de manière plus reproductible. Cependant, les propriétés mécaniques de nos fils biologiques étant plus faibles que celles des fils synthétiques, les métiers à tisser utilisés dans l'industrie devront être adaptés. L'acquisition de ce type d'équipement sera, par conséquent, extrêmement onéreuse. Ainsi, elle sera possible sous réserve d'avoir un ou plusieurs financements dont l'obtention sera en grande partie conditionnée par les résultats des expérimentations menées chez l'animal.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1. Publications

1.1 Issues du travail de thèse

Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane

A. Grémare, S. Jean-Gilles, P. Musqui, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, J-C. Fricain, N. L'Heureux.

J Mech Behav Biomed Mater. 2019 Nov;99:18-26. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.07.007. Epub 2019 Jul 13.

Development of vascular substitute produced by weaving yarns of human amniotic membrane

A. Grémare, L. Thibes, M. Gluais, Y. Torres, D. Potart, N. Da Silva, M. Fénelon, L. Sentilhes, S. Lacomme, I. Svahn, E. Gontier, J-C Fricain, N. L'Heureux.

En préparation

1.2 Issues de travaux antérieurs

Master 1 (Unité 1026 – Inserm, Bordeaux)

A Unique Triculture Model to Study Osteoblasts, Osteoclasts, and Endothelial Cells

A. Grémare, A. Aussel, R. Bareille, B. Paiva Dos Santos, J. Amédée, NB. Thébaud, D. Le Nihouannen.

Tissue Eng Part C Methods. 2019 Jul;25(7):421-432. doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0301.

Master 2 (Unité 1026 – Inserm, Bordeaux)

Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering

A. Grémare, V. Guduric, R. Bareille, V. Heroguez, S. Latour, N. L'Heureux, JC. Fricain, S. Catros, D. Le Nihouannen.

J Biomed Mater Res A. 2018 Apr;106(4):887-894. doi: 10.1002/jbm.a.36289. Epub 2017 Nov 20.

2. Communications orales

2.1 Internationales

Development of a new vascular substitute produced by weaving threads of human amniotic membrane: preliminary study

A. Grémare, S. Jean-Gilles, P. Musqui, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Termis / Rhodes, Mai 2019

2.2 Nationales

Cartographie des propriétés mécaniques de la membrane amniotique humaine

A. Grémare, S. Jean-Gilles, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Journée jeunes chercheurs de la Fédération de Recherche « TransBioMed » / Bordeaux, Juin 2018

Development of a new vascular substitute produced by weaving threads of human amniotic membrane: preliminary study

A. Grémare, L. Thibes, Y. Torres, N. Da Silva, D. Potart, M. Fénelon, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie / Marseille, Octobre 2019

[Sélectionnée pour participer à la session « jeunes chercheurs » du congrès de l'Association Dentaire Française en 2021]

3. Communications affichées

3.1 Internationales

Cartography of human amniotic membrane's mechanical properties

A. Grémare, L. Magnan L, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, N. L'Heureux.

European Society on Biomaterials / Maastricht, Septembre 2018

Development of a new vascular substitute produced by weaving threads of human amniotic membrane: preliminary study

A. Grémare, S. Jean-Gilles, P. Musqui, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, N. L'Heureux.

International Society of Applied Cardiovascular Biology / Bordeaux, Septembre 2018

3.2 Nationales

Amnion humain : mise au point d'un protocole de découpe standardisée

A. Grémare, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie / Bordeaux, Octobre 2017

Cartography of the human amniotic membrane's mechanical properties

A. Grémare, S. Jean-Gilles, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Journée scientifique de la Fédération de Recherche Technologies pour la santé / Bordeaux, Mai 2018

Cartography of the Human Amniotic Membrane's mechanical properties

A. Grémare, S. Jean-Gilles, P. Musqui, L. Magnan, Y. Torres, M. Fénelon, S. Brun, JC. Fricain, NB Thébaud, N. L'Heureux.

Congrès du Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques / Rennes, Octobre 2018

[Prix Poster]

Development of a vascular substitute produced by weaving yarns of human amniotic membrane

A. Grémare, L. Thibes, Y. Torres, D. Potart, M. Gluais, N. Da Silva, M. Fénelon, JC. Fricain, N. L'Heureux.

Journée scientifique du département Sciences et Technologies pour la Santé / Bordeaux, Octobre 2019

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. Herrington, B. Lacey, P. Sherliker, J. Armitage, S. Lewington, Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease, *Circ. Res.* 118 (2016) 535–546. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>.
- [2] E.J. Benjamin, P. Muntner, A. Alonso, M.S. Bittencourt, C.W. Callaway, A.P. Carson, A.M. Chamberlain, A.R. Chang, S. Cheng, S.R. Das, F.N. Delling, L. Djousse, M.S.V. Elkind, J.F. Ferguson, M. Fornage, L.C. Jordan, S.S. Khan, B.M. Kissela, K.L. Knutson, T.W. Kwan, D.T. Lackland, T.T. Lewis, J.H. Lichtman, C.T. Longenecker, M.S. Loop, P.L. Lutsey, S.S. Martin, K. Matsushita, A.E. Moran, M.E. Mussolino, M. O’Flaherty, A. Pandey, A.M. Perak, W.D. Rosamond, G.A. Roth, U.K.A. Sampson, G.M. Satou, E.B. Schroeder, S.H. Shah, N.L. Spartano, A. Stokes, D.L. Tirschwell, C.W. Tsao, M.P. Turakhia, L.B. VanWagner, J.T. Wilkins, S.S. Wong, S.S. Virani, On behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation*. 139 (2019). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>.
- [3] Agence de la biomédecine, Rapport rein, (2017).
- [4] R. Saran, B. Robinson, K.C. Abbott, J. Bragg-Gresham, X. Chen, D. Gipson, H. Gu, R.A. Hirth, D. Hutton, Y. Jin, A. Kapke, V. Kurtz, Y. Li, K. McCullough, Z. Modi, H. Morgenstern, P. Mukhopadhyay, J. Pearson, R. Pisoni, K. Repeck, D.E. Schaubel, R. Shamraj, D. Steffick, M. Turf, K.J. Woodside, J. Xiang, M. Yin, X. Zhang, V. Shahinian, US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States, *Am. J. Kidney Dis.* 75 (2020) A6–A7. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.09.003>.
- [5] N.G. Baikoussis, N.A. Papakonstantinou, E. Apostolakis, Radial artery as graft for coronary artery bypass surgery: Advantages and disadvantages for its usage focused on structural and biological characteristics, *J. Cardiol.* 63 (2014) 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2013.11.016>.
- [6] N. Chakfé, F. Dieval, F. Thaveau, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand, J.-G. Kretz, Substituts vasculaires, *Ann. Chir.* 129 (2004) 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.anchir.2004.05.002>.
- [7] S. Ketenciler, K. Boyacıoğlu, İ. Akdemir, G. Kömürçü, A. Polat, Autologous Saphenous Vein Panel Graft for Vascular Reconstruction, *Ann. Vasc. Surg.* 53 (2018) 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2018.05.037>.
- [8] M. Allon, M.L. Robbin, Increasing arteriovenous fistulas in hemodialysis patients: problems and solutions, *Kidney Int.* 62 (2002) 1109–1124. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid551.x>.
- [9] S.Q. Lew, B.-N. Nguyen, T.S. Ing, Hemodialysis vascular access construction in the upper extremity: a review, *J. Vasc. Access.* 16 (2015) 87–92. <https://doi.org/10.5301/jva.5000299>.
- [10] P.A. Stone, A.Y. Mousa, J.E. Campbell, A.F. AbuRahma, Dialysis access, *Ann. Vasc. Surg.* 26 (2012) 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2011.11.004>.
- [11] N. Mackman, Triggers, targets and treatments for thrombosis, *Nature*. 451 (2008) 914–918. <https://doi.org/10.1038/nature06797>.
- [12] M.S. Lemson, J.H. Tordoir, M.J. Daemen, P.J. Kitslaar, Intimal hyperplasia in vascular grafts, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 19 (2000) 336–350. <https://doi.org/10.1053/ejvs.1999.1040>.
- [13] M.H. Young, G.R. Upchurch, P.N. Malani, Vascular graft infections, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26 (2012) 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2011.09.004>.

- [14] L. Davidovic, D. Vasic, R. Maksimovic, D. Kostic, D. Markovic, M. Markovic, Aortobifemoral grafting: factors influencing long-term results, *Vascular*. 12 (2004) 171–178. <https://doi.org/10.1258/rsmvasc.12.3.171>.
- [15] J. Almasri, J. Adusumalli, N. Asi, S. Lakis, M. Alsawas, L.J. Prokop, A. Bradbury, P. Kolh, M.S. Conte, M.H. Murad, A systematic review and meta-analysis of revascularization outcomes of infrainguinal chronic limb-threatening ischemia, *J. Vasc. Surg.* 68 (2018) 624–633. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.01.066>.
- [16] M. Albers, V.M. Battistella, M. Romiti, A.A.E. Rodrigues, C.A.B. Pereira, Meta-analysis of polytetrafluoroethylene bypass grafts to infrapopliteal arteries, *J. Vasc. Surg.* 37 (2003) 1263–1269. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(02\)75332-9](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(02)75332-9).
- [17] T.S. Huber, J.W. Carter, R.L. Carter, J.M. Seeger, Patency of autogenous and polytetrafluoroethylene upper extremity arteriovenous hemodialysis accesses: a systematic review, *J. Vasc. Surg.* 38 (2003) 1005–1011. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(03)00426-9).
- [18] J. Almasri, M. Alsawas, M. Mainou, R.A. Mustafa, Z. Wang, K. Woo, D.L. Cull, M.H. Murad, Outcomes of vascular access for hemodialysis: A systematic review and meta-analysis, *J. Vasc. Surg.* 64 (2016) 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.01.053>.
- [19] B. Tschoeke, T.C. Flanagan, S. Koch, M.S. Harwoko, T. Deichmann, V. Ellå, J.S. Sachweh, M. Kellomäki, T. Gries, T. Schmitz-Rode, S. Jockenhoevel, Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold, *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 1909–1918. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0499>.
- [20] M. Deutsch, J. Meinhart, P. Zilla, N. Howanietz, M. Gorlitzer, A. Froeschl, A. Stuempflen, D. Bezuidenhout, M. Grabenwoeger, Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts, *J. Vasc. Surg.* 49 (2009) 352–362; discussion 362. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.08.101>.
- [21] T. Sugiura, G. Matsumura, S. Miyamoto, H. Miyachi, C.K. Breuer, T. Shinoka, Tissue-engineered Vascular Grafts in Children With Congenital Heart Disease: Intermediate Term Follow-up, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 30 (2018) 175–179. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2018.02.002>.
- [22] X. Kong, B. Han, H. Li, Y. Liang, K. Shao, W. Liu, New biodegradable small-diameter artificial vascular prosthesis: a feasibility study, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 100 (2012) 1494–1504. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33298>.
- [23] S. Koch, T.C. Flanagan, J.S. Sachweh, F. Tanios, H. Schnoering, T. Deichmann, V. Ellå, M. Kellomäki, N. Gronloh, T. Gries, R. Tolba, T. Schmitz-Rode, S. Jockenhoevel, Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation, *Biomaterials*. 31 (2010) 4731–4739. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.051>.
- [24] J.H. Lawson, M.H. Glickman, M. Ilzecki, T. Jakimowicz, A. Jaroszynski, E.K. Peden, A.J. Pilgrim, H.L. Prichard, M. Guzewicz, S. Przywara, J. Szmidt, J. Turek, W. Witkiewicz, N. Zapotoczny, T. Zubilewicz, L.E. Niklason, Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials, *The Lancet*. 387 (2016) 2026–2034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00557-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00557-2).
- [25] Z.H. Syedain, M.L. Graham, T.B. Dunn, T. O’Brien, S.L. Johnson, R.J. Schumacher, R.T. Tranquillo, A completely biological “off-the-shelf” arteriovenous graft that recellularizes in baboons, *Sci. Transl. Med.* 9 (2017) eaan4209. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4209>.
- [26] W. Wystrychowski, T.N. McAllister, K. Zagalski, N. Dusserre, L. Cierpka, N. L’Heureux, First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for

- hemodialysis access, *J. Vasc. Surg.* 60 (2014) 1353–1357. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.018>.
- [27] S. Amensag, L. Goldberg, K.A. O'Malley, D.S. Rush, S.A. Berceli, P.S. McFetridge, Pilot assessment of a human extracellular matrix-based vascular graft in a rabbit model, *J. Vasc. Surg.* 65 (2017) 839–847.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.02.046>.
- [28] Y. Nakayama, Y. Kaneko, N. Okumura, T. Terazawa, Initial 3-year results of first human use of an in-body tissue-engineered autologous “Biotube” vascular graft for hemodialysis, *J. Vasc. Access.* 21 (2020) 110–115. <https://doi.org/10.1177/1129729819852550>.
- [29] M. Kubo, Y. Sonoda, R. Muramatsu, M. Usui, Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 1539–1546.
- [30] N. Kjaergaard, M. Hein, L. Hyttel, R.B. Helmig, H.C. Schønheyder, N. Uldbjerg, H. Madsen, Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 94 (2001) 224–229.
- [31] M.P. Dobрева, P.N.G. Pereira, J. Deprest, A. Zwijsen, On the origin of amniotic stem cells: of mice and men, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 761–777. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092935md>.
- [32] H. Niknejad, H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi, A.M. Seifalian, Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering, *Eur. Cell. Mater.* 15 (2008) 88–99.
- [33] C. Singh, C. Wong, X. Wang, Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries, *J. Funct. Biomater.* 6 (2015) 500–525. <https://doi.org/10.3390/jfb6030500>.
- [34] R. Mazurek, J.M. Dave, R.R. Chandran, A. Misra, A.Q. Sheikh, D.M. Greif, Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease, in: *Adv. Pharmacol.*, Elsevier, 2017: pp. 323–350. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.001>.
- [35] M.K. Pugsley, R. Tabrizchi, The vascular system, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44 (2000) 333–340. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8).
- [36] M.A. Traore, S.C. George, Tissue Engineering the Vascular Tree, *Tissue Eng. Part B Rev.* 23 (2017) 505–514. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0010>.
- [37] J.A. Eble, S. Niland, The extracellular matrix of blood vessels, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 1385–1400. <https://doi.org/10.2174/138161209787846757>.
- [38] K.R. Stenmark, M.E. Yeager, K.C. El Kasmi, E. Nozik-Grayck, E.V. Gerasimovskaya, M. Li, S.R. Riddle, M.G. Frid, The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 23–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>.
- [39] M. Tennant, J.K. McGeachie, BLOOD VESSEL STRUCTURE AND FUNCTION: A BRIEF UPDATE ON RECENT ADVANCES, *ANZ J. Surg.* 60 (1990) 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1990.tb07468.x>.
- [40] J. Halper, Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix, in: *Adv. Pharmacol.*, Elsevier, 2018: pp. 95–127. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.012>.
- [41] P.L. Gross, W.C. Aird, The Endothelium and Thrombosis, *Semin. Thromb. Hemost.* 26 (2000) 463–478. <https://doi.org/10.1055/s-2000-13202>.
- [42] M. Sato, T. Ohashi, Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli, *Biorheology.* 42 (2005) 421–441.
- [43] J.J. Paszkowiak, A. Dardik, Arterial Wall Shear Stress: Observations from the Bench to the Bedside, *Vasc. Endovascular Surg.* 37 (2003) 47–57. <https://doi.org/10.1177/153857440303700107>.

- [44] CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group, World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 57 (1958) 1–20.
- [45] K. Kobiyama, K. Ley, Atherosclerosis, *Circ. Res.* 123 (2018) 1118–1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816>.
- [46] G.K. Hansson, A. Hermansson, The immune system in atherosclerosis, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 204–212. <https://doi.org/10.1038/ni.2001>.
- [47] F. Schaftenaar, V. Frodermann, J. Kuiper, E. Lutgens, Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells, *Curr. Opin. Lipidol.* 27 (2016) 209–215. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000302>.
- [48] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature.* 473 (2011) 317–325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>.
- [49] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature.* 407 (2000) 233–241. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- [50] HAS, Evaluation médico-économique des stratégies de prise en charge de l'insuffisance rénale chronique terminale en France, (2014).
- [51] R.T. Krediet, A.C. Abrahams, C.W.H. de Fijter, M.G.H. Betjes, W.H. Boer, B.C. van Jaarsveld, C.J. a. M. Konings, F.W. Dekker, The truth on current peritoneal dialysis: state of the art, *Neth. J. Med.* 75 (2017) 179–189.
- [52] D. Santoro, F. Benedetto, P. Mondello, N. Pipitò, D. Barillà, F. Spinelli, C.A. Ricciardi, V. Cernaro, M. Buemi, Vascular access for hemodialysis: current perspectives, *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* 7 (2014) 281–294. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S46643>.
- [53] R. Hayashi, E. Huang, A.R. Nissenson, Vascular access for hemodialysis, *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2 (2006) 504–513. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0239>.
- [54] S. Kitamura, Physiological and metabolic effects of grafts in coronary artery bypass surgery, *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 75 (2011) 766–772. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-10-1302>.
- [55] S.-W. Chen, Y. Chu, V.C.-C. Wu, F.-C. Tsai, Y.-Y. Nan, H.-F. Lee, C.-H. Chang, P.-H. Chu, S. Wu, P.-J. Lin, Microenvironment of saphenous vein graft preservation prior to coronary artery bypass grafting, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 28 (2019) 71–78. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivy201>.
- [56] J. Chlupáč, E. Filová, L. Bacáková, Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery, *Physiol. Res.* 58 Suppl 2 (2009) S119-139.
- [57] D. Shemesh, I. Goldin, J. Hijazi, I. Zagal, D. Berelowitz, A. Verstandig, O. Olsha, A prospective randomized study of heparin-bonded graft (Propaten) versus standard graft in prosthetic arteriovenous access, *J. Vasc. Surg.* 62 (2015) 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.01.056>.
- [58] H. Dardik, I.M. Ibrahim, I. Dardik, Modified and unmodified umbilical vein allografts and xenografts as arterial substitutes: morphologic assessment, *Surg. Forum.* 26 (1975) 286–287.
- [59] C.G. Björck, D. Bergqvist, P. Dougan, C. Esquivel, B. Nilsson, In vivo evaluation of the acute thrombogenicity of the modified human umbilical vein and autologous artery, *J. Vasc. Surg.* 2 (1985) 434–442.
- [60] F. Gill, R. Guzman, R. Guidoin, G. Avril, J. Charara, M. Batt, P.E. Roy, M. Marois, A.M. Graham, J.F. Symes, An histo-morphological evaluation of ninety surgically excised human umbilical vein grafts, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 363–380. <https://doi.org/10.1002/jbm.820231410>.
- [61] R. Guidoin, Y. Gagnon, P.E. Roy, M. Marois, K.W. Johnston, M. Batt, Pathologic features of surgically excised human umbilical vein grafts, *J. Vasc. Surg.* 3 (1986) 146–154.

- [62] A.N. Sidawy, B.A. Perler, Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy, E-Book, Elsevier Health Sciences, 2018.
- [63] C.H. Sparks, Autogenous grafts made to order, *Ann. Thorac. Surg.* 8 (1969) 104–113. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(10\)66217-0](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(10)66217-0).
- [64] R.W. Hallin, Complications with the mandril-grown (Sparks) dacron arterial graft, *Am. Surg.* 41 (1975) 550–554.
- [65] N.R. McLean, Gore-tex replacement of a Sparks mandril false aneurysm, *Br. J. Clin. Pract.* 36 (1982) 326.
- [66] J.H. Campbell, J.L. Efendy, G.R. Campbell, Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity, *Circ. Res.* 85 (1999) 1173–1178. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.12.1173>.
- [67] W.J. Geelhoed, K.E.A. van der Bogt, T.C. Rothuizen, F.F.R. Damanik, J.F. Hamming, C.D. Mota, M.S. van Agen, H.C. de Boer, M.T. Restrepo, B. Hinz, A. Kislaya, C. Poelma, A.J. van Zonneveld, T.J. Rabelink, L. Moroni, J.I. Rotmans, A novel method for engineering autologous non-thrombogenic in situ tissue-engineered blood vessels for arteriovenous grafting, *Biomaterials.* 229 (2020) 119577. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119577>.
- [68] A. Hatzibaloglou, I. Velissaris, D. Kaitzis, D. Grekas, A. Avdelidou, D. Kiskinis, ProCol vascular bioprosthesis for vascular access: midterm results, *J. Vasc. Access.* 5 (2004) 16–18. <https://doi.org/10.1177/112972980400500104>.
- [69] A.J. Kovalic, D.K. Beattie, A.H. Davies, Outcome of ProCol, a bovine mesenteric vein graft, in infrainguinal reconstruction, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 24 (2002) 533–534. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1710>.
- [70] D.M. Pineda, M.J. Dougherty, M.C. Wismer, C. Carroll, S. Tyagi, D.A. Troutman, K.D. Calligaro, Bovine carotid artery xenografts for hemodialysis access, *J. Vasc. Surg.* 65 (2017) 1729–1734. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.12.109>.
- [71] P. Lindsey, A. Echeverria, M. Cheung, E. Kfoury, C.F. Bechara, P.H. Lin, Lower Extremity Bypass Using Bovine Carotid Artery Graft (Artegraft): An Analysis of 124 Cases with Long-Term Results, *World J. Surg.* 42 (2018) 295–301. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4161-x>.
- [72] S. Dimitrievska, L.E. Niklason, Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8 (2018) a025742. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025742>.
- [73] S. Manduz, N. Katrancioglu, E. Ozker, K. Dogan, Early thrombosis in bovine mesenteric vein grafts after infrainguinal reconstruction, *Int. J. Angiol. Off. Publ. Int. Coll. Angiol. Inc.* 17 (2008) 37–39. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1278278>.
- [74] T. Walles, C. Puschmann, A. Haverich, H. Mertsching, Acellular scaffold implantation—no alternative to tissue engineering, *Int. J. Artif. Organs.* 26 (2003) 225–234. <https://doi.org/10.1177/039139880302600308>.
- [75] HAS, Rapport d'évaluation des implants de pontage, (2013).
- [76] Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group, M.S. Conte, F.B. Pomposelli, D.G. Clair, P.J. Geraghty, J.F. McKinsey, J.L. Mills, G.L. Moneta, M.H. Murad, R.J. Powell, A.B. Reed, A. Schanzer, A.N. Sidawy, Society for Vascular Surgery, Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication, *J. Vasc. Surg.* 61 (2015) 2S–41S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.12.009>.
- [77] A.N. Sidawy, L.M. Spergel, A. Besarab, M. Allon, W.C. Jennings, F.T. Padberg, M.H. Murad, V.M. Montori, A.M. O'Hare, K.D. Calligaro, R.A. Macsata, A.B. Lumsden, E. Ascher, Society for Vascular Surgery, The Society for Vascular Surgery: clinical practice

- guidelines for the surgical placement and maintenance of arteriovenous hemodialysis access, *J. Vasc. Surg.* 48 (2008) 2S-25S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.08.042>.
- [78] C.E. Pereira, M. Albers, M. Romiti, F.C. Brochado-Neto, C.A.B. Pereira, Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency, *J. Vasc. Surg.* 44 (2006) 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.04.054>.
- [79] M. Sharrock, S.A. Antoniou, G.A. Antoniou, Vein Versus Prosthetic Graft for Femoropopliteal Bypass Above the Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *Angiology.* 70 (2019) 649–661. <https://doi.org/10.1177/0003319719826460>.
- [80] S. Roll, J. Müller-Nordhorn, T. Keil, H. Scholz, D. Eidt, W. Greiner, S.N. Willich, Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis, *BMC Surg.* 8 (2008) 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2482-8-22>.
- [81] H. Takagi, S.-N. Goto, M. Matsui, H. Manabe, T. Umemoto, A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting, *J. Vasc. Surg.* 52 (2010) 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.02.010>.
- [82] L.-C. Xu, J.W. Bauer, C.A. Siedlecki, Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 124 (2014) 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.040>.
- [83] C.F. Scott, Mechanism of the participation of the contact system in the Vroman effect. Review and summary, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2 (1991) 173–181. <https://doi.org/10.1080/09205063.1991.9756658>.
- [84] K. Berger, L.R. Sauvage, A.M. Rao, S.J. Wood, Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness, *Ann. Surg.* 175 (1972) 118–127. <https://doi.org/10.1097/00000658-197201000-00018>.
- [85] C.N. Chesterman, Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis, *Blood Rev.* 2 (1988) 88–94. [https://doi.org/10.1016/0268-960x\(88\)90029-x](https://doi.org/10.1016/0268-960x(88)90029-x).
- [86] R.H. Samson, R. Morales, D.P. Showalter, M.R. Lepore, D.G. Nair, Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison, *J. Vasc. Surg.* 64 (2016) 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.03.414>.
- [87] M.K. Lazarides, C. Argyriou, G.A. Antoniou, E. Georgakarakos, G.S. Georgiadis, Lack of evidence for use of heparin-bonded grafts in access surgery: a meta-analysis, *Semin. Vasc. Surg.* 29 (2016) 192–197. <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2016.08.003>.
- [88] M.R. de Vries, K.H. Simons, J.W. Jukema, J. Braun, P.H.A. Quax, Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (2016) 451–470. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.76>.
- [89] C.D. Owens, W.J. Gasper, A.S. Rahman, M.S. Conte, Vein graft failure, *J. Vasc. Surg.* 61 (2015) 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.019>.
- [90] N.R. Tai, H.J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton, A.M. Seifalian, Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction, *Br. J. Surg.* 87 (2000) 1516–1524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2000.01566.x>.
- [91] M. Heise, U. Krüger, R. Rückert, R. Pfitzner, P. Neuhaus, U. Settmacher, Correlation of intimal hyperplasia development and shear stress distribution at the distal end-side-anastomosis, in vitro study using particle image velocimetry, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 26 (2003) 357–366. [https://doi.org/10.1016/s1078-5884\(02\)00567-1](https://doi.org/10.1016/s1078-5884(02)00567-1).
- [92] V.M. Subbotin, Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis, *Theor. Biol. Med. Model.* 4 (2007) 41. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-4-41>.
- [93] P.A. Stone, M.R. Back, P.A. Armstrong, R.S. Brumberg, S.K. Flaherty, B.L. Johnson, M.L. Shames, D.F. Bandyk, Evolving microbiology and treatment of extracavitary

- prosthetic graft infections, *Vasc. Endovascular Surg.* 42 (2008) 537–544. <https://doi.org/10.1177/1538574408322658>.
- [94] A. Gharamti, Z.A. Kanafani, *Vascular Graft Infections: An update*, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 32 (2018) 789–809. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.06.003>.
- [95] B. Hasse, L. Husmann, A. Zinkernagel, R. Weber, M. Lachat, D. Mayer, *Vascular graft infections*, *Swiss Med. Wkly.* 143 (2013) w13754. <https://doi.org/10.4414/smw.2013.13754>.
- [96] O. Goëau-Brissonnière, I. Javerliat, F. Koskas, M. Coggia, J.-C. Pechère, *Rifampin-bonded vascular grafts and postoperative infections*, *Ann. Vasc. Surg.* 25 (2011) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2010.09.002>.
- [97] I.J. Rychlik, P. Davey, J. Murphy, M.E. O'Donnell, *A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass*, *J. Vasc. Surg.* 60 (2014) 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.05.049>.
- [98] M. Albers, M. Romiti, F.C. Brochado-Neto, C.A.B. Pereira, *Meta-analysis of alternate autologous vein bypass grafts to infrapopliteal arteries*, *J. Vasc. Surg.* 42 (2005) 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.05.031>.
- [99] A.A. Al-Jaishi, M.J. Oliver, S.M. Thomas, C.E. Lok, J.C. Zhang, A.X. Garg, S.D. Kosa, R.R. Quinn, L.M. Moist, *Patency rates of the arteriovenous fistula for hemodialysis: a systematic review and meta-analysis*, *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 63 (2014) 464–478. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.08.023>.
- [100] C. Randon, B. Jacobs, F. De Ryck, H. Beele, F. Vermassen, *Fifteen years of infrapopliteal arterial reconstructions with cryopreserved venous allografts for limb salvage*, *J. Vasc. Surg.* 51 (2010) 869–877. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.11.062>.
- [101] M.P. Harlander-Locke, P.F. Lawrence, A. Ali, E. Bae, J. Kohn, C. Abularrage, M. Ricci, G.W. Lemmon, S. Peralta, J. Hsu, *Vascular Low-Frequency Disease Consortium, Cryopreserved venous allograft is an acceptable conduit in patients with current or prior angioaccess graft infection*, *J. Vasc. Surg.* 66 (2017) 1157–1162. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2017.03.450>.
- [102] J. Al Shakarchi, D. McGrogan, P.J. Yates, N. Inston, *Use of biosynthetic grafts (Omniflow II) for high infection risk haemodialysis vascular access*, *J. Vasc. Access.* 17 (2016) 151–154. <https://doi.org/10.5301/jva.5000462>.
- [103] M. Herring, A. Gardner, J. Glover, *A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium*, *Surgery.* 84 (1978) 498–504.
- [104] R. Langer, J.P. Vacanti, *Tissue engineering*, *Science.* 260 (1993) 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- [105] T. Simon-Yarza, I. Bataille, D. Letourneur, *Cardiovascular Bio-Engineering: Current State of the Art*, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 10 (2017) 180–193. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9740-6>.
- [106] Van Blitterswijk, *Tissue Engineering*, Joseph Bronzino series Editor: Hartford, Connecticut USA, 2008.
- [107] O.E. Teebken, A. Haverich, *Tissue engineering of small diameter vascular grafts*, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 23 (2002) 475–485. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1654>.
- [108] R.T. Tranquillo, *The tissue-engineered small-diameter artery*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961 (2002) 251–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03094.x>.
- [109] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens, *The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future*, *Tissue Eng. Part B Rev.* 22 (2016) 68–100. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0100>.
- [110] J.E. McBane, S. Sharifpoor, R.S. Labow, M. Ruel, E.J. Suuronen, J.P. Santerre, *Tissue engineering a small diameter vessel substitute: engineering constructs with select*

- biomaterials and cells, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10 (2012) 347–360. <https://doi.org/10.2174/157016112799959378>.
- [111] G. Konig, 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, N. L’Heureux, Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery, *Biomaterials*. 30 (2009) 1542–1550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.011>.
- [112] S.L.M. Dahl, 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, L.E. Niklason, Readily available tissue-engineered vascular grafts, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 68ra9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001426>.
- [113] P. Zilla, M. Deutsch, J. Meinhart, R. Puschmann, T. Eberl, E. Minar, R. Dudczak, H. Lugmaier, P. Schmidt, I. Noszian, Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years, *J. Vasc. Surg.* 19 (1994) 540–548. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(94\)70083-4](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(94)70083-4).
- [114] M. Deutsch, J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss, P. Zilla, Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience, *Surgery*. 126 (1999) 847–855.
- [115] J.G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Fröschl, P. Zilla, Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts, *Ann. Thorac. Surg.* 71 (2001) S327–331. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(01\)02555-3](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(01)02555-3).
- [116] M. Carrabba, P. Madeddu, Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6 (2018) 41. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00041>.
- [117] N. Thottappillil, P.D. Nair, Scaffolds in vascular regeneration: current status, *Vasc. Health Risk Manag.* 11 (2015) 79–91. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S50536>.
- [118] T. Shin’oka, Y. Imai, Y. Ikada, Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 532–533. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440717>.
- [119] T. Shin’oka, G. Matsumura, N. Hibino, Y. Naito, M. Watanabe, T. Konuma, T. Sakamoto, M. Nagatsu, H. Kurosawa, Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129 (2005) 1330–1338. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.12.047>.
- [120] N. Hibino, E. McGillicuddy, G. Matsumura, Y. Ichihara, Y. Naito, C. Breuer, T. Shinoka, Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 139 (2010) 431–436, 436.e1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.09.057>.
- [121] T. Shoji, T. Shinoka, Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery, *Transl. Pediatr.* 7 (2018) 188–195. <https://doi.org/10.21037/tp.2018.02.01>.
- [122] T. Fukunishi, C.A. Best, T. Sugiura, J. Opfermann, C.S. Ong, T. Shinoka, C.K. Breuer, A. Krieger, J. Johnson, N. Hibino, Preclinical study of patient-specific cell-free nanofiber tissue-engineered vascular grafts using 3-dimensional printing in a sheep model, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 153 (2017) 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.10.066>.
- [123] C. Best, R. Strouse, K. Hor, V. Pepper, A. Tipton, J. Kelly, T. Shinoka, C. Breuer, Toward a patient-specific tissue engineered vascular graft, *J. Tissue Eng.* 9 (2018) 2041731418764709. <https://doi.org/10.1177/2041731418764709>.
- [124] A.J. Melchiorri, N. Hibino, T. Yi, Y.U. Lee, T. Sugiura, S. Tara, T. Shinoka, C. Breuer, J.P. Fisher, Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts, *Biomacromolecules*. 16 (2015) 437–446. <https://doi.org/10.1021/bm501853s>.

- [125] X. Jin, X. Geng, L. Jia, Z. Xu, L. Ye, Y. Gu, A.-Y. Zhang, Z.-G. Feng, Preparation of Small-Diameter Tissue-Engineered Vascular Grafts Electrospun from Heparin End-Capped PCL and Evaluation in a Rabbit Carotid Artery Replacement Model, *Macromol. Biosci.* 19 (2019) e1900114. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900114>.
- [126] S. Wang, X.M. Mo, B.J. Jiang, C.J. Gao, H.S. Wang, Y.G. Zhuang, L.J. Qiu, Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 2131–2139. <https://doi.org/10.2147/IJN.S44956>.
- [127] P.C. Caracciolo, M.I. Rial-Hermida, F. Montini-Ballarín, G.A. Abraham, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Surface-modified bioresorbable electrospun scaffolds for improving hemocompatibility of vascular grafts, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 75 (2017) 1115–1127. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.151>.
- [128] H.-F. Guo, W.-W. Dai, D.-H. Qian, Z.-X. Qin, Y. Lei, X.-Y. Hou, C. Wen, A simply prepared small-diameter artificial blood vessel that promotes in situ endothelialization, *Acta Biomater.* 54 (2017) 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.038>.
- [129] L.V. Antonova, A.M. Seifalian, A.G. Kutikhin, V.V. Sevostyanova, V.G. Matveeva, E.A. Velikanova, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, T.V. Glushkova, E.A. Senokosova, G.Y. Vasyukov, E.O. Krivkina, A.Y. Burago, Y.A. Kudryavtseva, O.L. Barbarash, L.S. Barbarash, Conjugation with RGD Peptides and Incorporation of Vascular Endothelial Growth Factor Are Equally Efficient for Biofunctionalization of Tissue-Engineered Vascular Grafts, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17111920>.
- [130] R.H. Schmedlen, W.M. Elbjairami, A.S. Gobin, J.L. West, Tissue engineered small-diameter vascular grafts, *Clin. Plast. Surg.* 30 (2003) 507–517. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(03\)00069-5](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(03)00069-5).
- [131] C.B. Weinberg, E. Bell, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science.* 231 (1986) 397–400. <https://doi.org/10.1126/science.2934816>.
- [132] J. Hirai, T. Matsuda, Self-organized, tubular hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen for low-pressure-loaded venous system, *Cell Transplant.* 4 (1995) 597–608.
- [133] J. Hirai, T. Matsuda, Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: tissue regeneration process, *Cell Transplant.* 5 (1996) 93–105. [https://doi.org/10.1016/0963-6897\(95\)02002-0](https://doi.org/10.1016/0963-6897(95)02002-0).
- [134] X. Li, J. Xu, C.T. Nicolescu, J.T. Marinelli, J. Tien, Generation, Endothelialization, and Microsurgical Suture Anastomosis of Strong 1-mm-Diameter Collagen Tubes, *Tissue Eng. Part A.* 23 (2017) 335–344. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0339>.
- [135] A. Aussel, A. Montembault, S. Malaise, M.P. Foulc, W. Faure, S. Cornet, R. Aid, M. Chaouat, T. Delair, D. Letourneur, L. David, L. Bordenave, In Vitro Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development, *J Cardiovasc. Transl. Res.* 10 (2017) 480–488. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9763-z>.
- [136] A. Aussel, N.B. Thébaud, X. Bérard, V. Brizzi, S. Delmond, R. Bareille, R. Siadous, C. James, J. Ripoché, M. Durand, A. Montembault, B. Burdin, D. Letourneur, N. L’Heureux, L. David, L. Bordenave, Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: in vitro and in vivo evaluation, *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 12 (2017) 065003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa78d0>.
- [137] E.C. Filipe, M. Santos, J. Hung, B.S.L. Lee, N. Yang, A.H.P. Chan, M.K.C. Ng, J. Rnjak-Kovacina, S.G. Wise, Rapid Endothelialization of Off-the-Shelf Small Diameter Silk Vascular Grafts, *JACC Basic Transl. Sci.* 3 (2018) 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.12.003>.
- [138] P. Gupta, K.L. Lorentz, D.G. Haskett, E.M. Cunnane, A.K. Ramaswamy, J.S. Weinbaum, D.A. Vorp, B.B. Mandal, Bioresorbable silk grafts for small diameter vascular

- tissue engineering applications: In vitro and in vivo functional analysis, *Acta Biomater.* 105 (2020) 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.020>.
- [139] B. Marelli, A. Alessandrino, S. Farè, G. Freddi, D. Mantovani, M.C. Tanzi, Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4019–4026. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.008>.
- [140] V. Catto, S. Farè, I. Cattaneo, M. Figliuzzi, A. Alessandrino, G. Freddi, A. Remuzzi, M.C. Tanzi, Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 54 (2015) 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.003>.
- [141] L. Soffer, X. Wang, X. Zhang, J. Kluge, L. Dorfmann, D.L. Kaplan, G. Leisk, Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 19 (2008) 653–664. <https://doi.org/10.1163/156856208784089607>.
- [142] S. Enomoto, M. Sumi, K. Kajimoto, Y. Nakazawa, R. Takahashi, C. Takabayashi, T. Asakura, M. Sata, Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material, *J. Vasc. Surg.* 51 (2010) 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.09.005>.
- [143] K. Tanaka, D. Fukuda, Y. Higashikuni, Y. Hirata, I. Komuro, T. Saotome, Y. Yamashita, T. Asakura, M. Sata, Biodegradable Extremely-Small-Diameter Vascular Graft Made of Silk Fibroin can be Implanted in Mice, *J. Atheroscler. Thromb.* (2020). <https://doi.org/10.5551/jat.52720>.
- [144] E.P. Azevedo, R. Retarekar, M.L. Raghavan, V. Kumar, Mechanical properties of cellulose: chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24 (2013) 239–252. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.690273>.
- [145] L. Khait, R.K. Birla, Bypassing the patient: comparison of biocompatible models for the future of vascular tissue engineering, *Cell Transplant.* 21 (2012) 269–283. <https://doi.org/10.3727/096368910X564535>.
- [146] C. Marcolin, L. Draghi, M. Tanzi, S. Faré, Electrospun silk fibroin-gelatin composite tubular matrices as scaffolds for small diameter blood vessel regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28 (2017) 80. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5884-9>.
- [147] M.J. Byrom, P.G. Bannon, G.H. White, M.K.C. Ng, Animal models for the assessment of novel vascular conduits, *J. Vasc. Surg.* 52 (2010) 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.10.080>.
- [148] T. Fukayama, K. Takagi, R. Tanaka, Y. Hatakeyama, D. Aytemiz, Y. Suzuki, T. Asakura, Biological reaction to small-diameter vascular grafts made of silk fibroin implanted in the abdominal aortae of rats, *Ann. Vasc. Surg.* 29 (2015) 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2014.10.008>.
- [149] E. Yu, H.-Y. Mi, J. Zhang, J.A. Thomson, L.-S. Turng, Development of biomimetic thermoplastic polyurethane/fibroin small-diameter vascular grafts via a novel electrospinning approach, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 106 (2018) 985–996. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36297>.
- [150] J. Zhang, H. Huang, R. Ju, K. Chen, S. Li, W. Wang, Y. Yan, In vivo biocompatibility and hemocompatibility of a polytetrafluoroethylene small diameter vascular graft modified with sulfonated silk fibroin, *Am. J. Surg.* 213 (2017) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2016.04.005>.
- [151] B. Tschoeke, T.C. Flanagan, A. Cornelissen, S. Koch, A. Roehl, M. Sriharwoko, J.S. Sachweh, T. Gries, T. Schmitz-Rode, S. Jockenhoewel, Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft, *Artif. Organs.* 32 (2008) 800–809. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00601.x>.

- [152] M.J. McClure, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 10 (2012) 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.026>.
- [153] P. Kim, A. Yuan, K.-H. Nam, A. Jiao, D.-H. Kim, Fabrication of poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite nanostructures with tunable stiffness and degradation for vascular tissue engineering, *Biofabrication.* 6 (2014) 024112. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/2/024112>.
- [154] X. Guo, J. Zhu, H. Zhang, Z. You, Y. Morsi, X. Mo, T. Zhu, Facile preparation of a controlled-release tubular scaffold for blood vessel implantation, *J. Colloid Interface Sci.* 539 (2019) 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.086>.
- [155] Y. Wang, C. He, Y. Feng, Y. Yang, Z. Wei, W. Zhao, C. Zhao, A chitosan modified asymmetric small-diameter vascular graft with anti-thrombotic and anti-bacterial functions for vascular tissue engineering, *J. Mater. Chem. B.* 8 (2020) 568–577. <https://doi.org/10.1039/c9tb01755k>.
- [156] C. Quint, M. Arief, A. Muto, A. Dardik, L.E. Niklason, Allogeneic human tissue-engineered blood vessel, *J. Vasc. Surg.* 55 (2012) 790–798. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.098>.
- [157] R.D. Kirkton, M. Santiago-Maysonet, J.H. Lawson, W.E. Tente, S.L.M. Dahl, L.E. Niklason, H.L. Prichard, Bioengineered human acellular vessels recellularize and evolve into living blood vessels after human implantation, *Sci. Transl. Med.* 11 (2019). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6934>.
- [158] S. Sundaram, J. One, J. Siewert, S. Teodosescu, L. Zhao, S. Dimitrievska, H. Qian, A.H. Huang, L. Niklason, Tissue-engineered vascular grafts created from human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Transl. Med.* 3 (2014) 1535–1543. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0065>.
- [159] L. Gui, B.C. Dash, J. Luo, L. Qin, L. Zhao, K. Yamamoto, T. Hashimoto, H. Wu, A. Dardik, G. Tellides, L.E. Niklason, Y. Qyang, Implantable tissue-engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells, *Biomaterials.* 102 (2016) 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.010>.
- [160] Z.H. Syedain, L.A. Meier, J.W. Bjork, A. Lee, R.T. Tranquillo, Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring, *Biomaterials.* 32 (2011) 714–722. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.019>.
- [161] Z.H. Syedain, L.A. Meier, M.T. Lahti, S.L. Johnson, R.T. Tranquillo, Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 1726–1734. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0550>.
- [162] Z. Syedain, J. Reimer, M. Lahti, J. Berry, S. Johnson, R.T. Tranquillo, Tissue engineering of acellular vascular grafts capable of somatic growth in young lambs, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12951. <https://doi.org/10.1038/ncomms12951>.
- [163] J. Zhao, L. Liu, J. Wei, D. Ma, W. Geng, X. Yan, J. Zhu, H. Du, Y. Liu, L. Li, F. Chen, A novel strategy to engineer small-diameter vascular grafts from marrow-derived mesenchymal stem cells, *Artif. Organs.* 36 (2012) 93–101. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01231.x>.
- [164] K. Vallières, V. Laterreur, M.Y. Tondreau, J. Ruel, L. Germain, J. Fradette, F.A. Auger, Human adipose-derived stromal cells for the production of completely autologous self-assembled tissue-engineered vascular substitutes, *Acta Biomater.* 24 (2015) 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.011>.
- [165] J.-M. Bourget, V. Laterreur, R. Gauvin, M.D. Guillemette, C. Miville-Godin, M. Mounier, M.Y. Tondreau, C. Tremblay, R. Labbé, J. Ruel, F.A. Auger, T. Veres, L.

- Germain, Microstructured human fibroblast-derived extracellular matrix scaffold for vascular media fabrication, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 2479–2489. <https://doi.org/10.1002/term.2146>.
- [166] N. L’Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins, T.N. McAllister, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat. Med.* 12 (2006) 361–365. <https://doi.org/10.1038/nm1364>.
- [167] N. L’heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, F.A. Auger, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J.* 12 (1998) 47–56. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.1.47>.
- [168] T.N. McAllister, M. Maruszewski, S.A. Garrido, W. Wystrychowski, N. Dusserre, A. Marini, K. Zagalski, A. Fiorillo, H. Avila, X. Manglano, J. Antonelli, A. Kocher, M. Zembala, L. Cierpka, L.M. de la Fuente, N. L’heureux, Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study, *Lancet Lond. Engl.* 373 (2009) 1440–1446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60248-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60248-8).
- [169] L. Magnan, G. Labrunie, S. Marais, S. Rey, N. Dusserre, M. Bonneu, S. Lacomme, E. Gontier, N. L’Heureux, Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process, *Acta Biomater.* 82 (2018) 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.006>.
- [170] W. Wystrychowski, L. Cierpka, K. Zagalski, S. Garrido, N. Dusserre, S. Radochonski, T.N. McAllister, N. L’heureux, Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access, *J. Vasc. Access.* 12 (2011) 67–70.
- [171] L. Magnan, G. Labrunie, M. Fénelon, N. Dusserre, M.-P. Foulc, M. Lafourcade, I. Svahn, E. Gontier, J.H. Vélez V, T.N. McAllister, N. L’Heureux, Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly “bio” material for tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 105 (2020) 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.037>.
- [172] A.-M. Kajbafzadeh, R. Khorramirouz, S.M. Kameli, K. Fendereski, S.S. Daryabari, S.M. Tavangar, B. Azizi Garajegayeh, Three-year efficacy and patency follow-up of decellularized human internal mammary artery as a novel vascular graft in animal models, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 157 (2019) 1494–1502. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.08.106>.
- [173] L. Gui, A. Muto, S.A. Chan, C.K. Breuer, L.E. Niklason, Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts, *Tissue Eng. Part A.* 15 (2009) 2665–2676. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0526>.
- [174] P. Mallis, M. Katsimpoulas, A. Kostakis, D. Dipresa, S. Korossis, A. Papapanagiotou, E. Kassi, C. Stavropoulos-Giokas, E. Michalopoulos, Vitri-fied Human Umbilical Arteries as Potential Grafts for Vascular Tissue Engineering, *Tissue Eng. Regen. Med.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00243-x>.
- [175] K.H. Schneider, P. Aigner, W. Holnthoner, X. Monforte, S. Nürnberger, D. Rünzler, H. Redl, A.H. Teuschl, Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts, *Acta Biomater.* 29 (2016) 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.038>.
- [176] K.H. Schneider, M. Enayati, C. Grasl, I. Walter, L. Budinsky, G. Zebic, C. Kaun, A. Wagner, K. Kratochwill, H. Redl, A.H. Teuschl, B.K. Podesser, H. Bergmeister, Acellular vascular matrix grafts from human placenta chorion: Impact of ECM preservation on graft characteristics, protein composition and in vivo performance, *Biomaterials.* 177 (2018) 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.045>.

- [177] S. Ilanlou, M. Khakbiz, G. Amoabediny, J. Mohammadi, Preclinical studies of acellular extracellular matrices as small-caliber vascular grafts, *Tissue Cell.* 60 (2019) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.07.008>.
- [178] S.F. Badylak, G.C. Lantz, A. Coffey, L.A. Geddes, Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog, *J. Surg. Res.* 47 (1989) 74–80. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(89\)90050-4](https://doi.org/10.1016/0022-4804(89)90050-4).
- [179] M.T. Hinds, R.C. Rowe, Z. Ren, J. Teach, P.-C. Wu, S.J. Kirkpatrick, K.D. Breneman, K.W. Gregory, D.W. Courtman, Development of a reinforced porcine elastin composite vascular scaffold, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 77 (2006) 458–469. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30571>.
- [180] J. Jaramillo, K.T. Valencia-Rivero, F.J. Cedano-Serrano, R. López, N. Sandoval, J.C. Briceño, Design and Evaluation of a Structural Reinforced Small Intestinal Submucosa Vascular Graft for Hemodialysis Access in a Porcine Model, *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992. 64 (2018) 270–277. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000618>.
- [181] Q. Fang, T. Gu, J. Fan, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Zhao, P. Zhao, Evaluation of a hybrid small caliber vascular graft in a rabbit model, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.02.083>.
- [182] M.T. Koobatian, S. Row, R.J. Smith, C. Koenigsnecht, S.T. Andreadis, D.D. Swartz, Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model, *Biomaterials.* 76 (2016) 344–358. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.020>.
- [183] S. Amensag, P.S. McFetridge, Rolling the Human Amnion to Engineer Laminated Vascular Tissues, *Tissue Eng. Part C Methods.* 18 (2012) 903–912. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0119>.
- [184] P.-H. Lee, S.-H. Tsai, L. Kuo, C.-Y. Hwang, C.-Y. Kuo, V.C. Yang, J.-K. Chen, A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3342–3348. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.012>.
- [185] H. Peirovi, N. Rezvani, M. Hajinasrollah, S.S. Mohammadi, H. Niknejad, Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep, *J. Vasc. Surg.* 56 (2012) 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.02.036>.
- [186] J. Günter, P. Wolint, A. Bopp, J. Steiger, E. Cambria, S.P. Hoerstrup, M.Y. Emmert, Microtissues in Cardiovascular Medicine: Regenerative Potential Based on a 3D Microenvironment, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 9098523. <https://doi.org/10.1155/2016/9098523>.
- [187] J.M. Kelm, V. Lorber, J.G. Snedeker, D. Schmidt, A. Broggini-Tenzer, M. Weisstanner, B. Odermatt, A. Mol, G. Zünd, S.P. Hoerstrup, A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks, *J. Biotechnol.* 148 (2010) 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.002>.
- [188] C. Norotte, F.S. Marga, L.E. Niklason, G. Forgacs, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting, *Biomaterials.* 30 (2009) 5910–5917. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.034>.
- [189] M. Itoh, K. Nakayama, R. Noguchi, K. Kamohara, K. Furukawa, K. Uchihashi, S. Toda, J.-I. Oyama, K. Node, S. Morita, Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae, *PloS One.* 10 (2015) e0136681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136681>.
- [190] W.J. Geelhoed, L. Moroni, J.I. Rotmans, Utilizing the Foreign Body Response to Grow Tissue Engineered Blood Vessels in Vivo, *J Cardiovasc. Transl. Res.* 10 (2017) 167–179. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9731-7>.

- [191] F.F.R. Damanik, T.C. Rothuizen, C. van Blitterswijk, J.I. Rotmans, L. Moroni, Towards an in vitro model mimicking the foreign body response: tailoring the surface properties of biomaterials to modulate extracellular matrix, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6325. <https://doi.org/10.1038/srep06325>.
- [192] T.C. Rothuizen, F.F.R. Damanik, T. Lavrijsen, M.J.T. Visser, J.F. Hamming, R.A. Lalai, J.M.G.J. Duijs, A.J. van Zonneveld, I.E. Hoefler, C.A. van Blitterswijk, T.J. Rabelink, L. Moroni, J.I. Rotmans, Development and evaluation of in vivo tissue engineered blood vessels in a porcine model, *Biomaterials.* 75 (2016) 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.023>.
- [193] Y. Nakayama, H. Ishibashi-Ueda, K. Takamizawa, In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube), *Cell Transplant.* 13 (2004) 439–449. <https://doi.org/10.3727/000000004783983828>.
- [194] T. Watanabe, K. Kanda, H. Ishibashi-Ueda, H. Yaku, Y. Nakayama, Autologous small-caliber “biotube” vascular grafts with argatroban loading: a histomorphological examination after implantation to rabbits, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 92 (2010) 236–242. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31510>.
- [195] T. Watanabe, K. Kanda, M. Yamanami, H. Ishibashi-Ueda, H. Yaku, Y. Nakayama, Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 98 (2011) 120–126. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31841>.
- [196] M. Furukoshi, T. Moriwaki, Y. Nakayama, Development of an in vivo tissue-engineered vascular graft with designed wall thickness (biotube type C) based on a novel caged mold, *J. Artif. Organs Off. J. Jpn. Soc. Artif. Organs.* 19 (2016) 54–61. <https://doi.org/10.1007/s10047-015-0859-4>.
- [197] M. Furukoshi, E. Tatsumi, Y. Nakayama, Application of in-body tissue architecture-induced Biotube vascular grafts for vascular access: Proof of concept in a beagle dog model, *J. Vasc. Access.* (2019) 1129729819874318. <https://doi.org/10.1177/1129729819874318>.
- [198] M. Yamanami, K. Kanda, T. Kawasaki, D. Kami, T. Watanabe, S. Gojo, H. Yaku, Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications, *Artif. Organs.* 43 (2019) 773–779. <https://doi.org/10.1111/aor.13432>.
- [199] A.C. Mamede, M.J. Carvalho, A.M. Abrantes, M. Laranjo, C.J. Maia, M.F. Botelho, Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications, *Cell Tissue Res.* 349 (2012) 447–458. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1424-6>.
- [200] S.W. Kauma, T.F. Huff, N. Hayes, A. Nilkaeo, Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 2188–2194. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5730>.
- [201] A.E. King, A. Paltoo, R.W. Kelly, J.-M. Sallenave, A.D. Bocking, J.R.G. Challis, Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes, *Placenta.* 28 (2007) 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.006>.
- [202] Y. Hao, D.H. Ma, D.G. Hwang, W.S. Kim, F. Zhang, Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane, *Cornea.* 19 (2000) 348–352.
- [203] M. Magatti, E. Vertua, S. De Munari, M. Caro, M. Caruso, A. Silini, M. Delgado, O. Parolini, Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features: Amnion affects both M1 and M2 polarization, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 2895–2911. <https://doi.org/10.1002/term.2193>.
- [204] Y. Jamilloux, E. Bourdonnay, M. Gerfaud-Valentin, B.F. Py, L. Lefevre, T. Barba, C. Broussolle, T. Henry, P. Sève, [Interleukin-1, inflammasome and autoinflammatory diseases], *Rev. Med. Interne.* 39 (2018) 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.07.007>.

- [205] N.J. Koizumi, T.J. Inatomi, C.J. Sotozono, N.J. Fullwood, A.J. Quantock, S. Kinoshita, Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane, *Curr. Eye Res.* 20 (2000) 173–177.
- [206] Z. Grzywocz, E. Pius-Sadowska, P. Klos, M. Gryzik, D. Wasilewska, B. Aleksandrowicz, M. Dworzynska, S. Sabalinska, G. Hoser, B. Machalinski, J. Kawiak, Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro, *Folia Histochem. Cytobiol.* 52 (2014) 163–170. <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0019>.
- [207] H. Niknejad, G. Paeini-Vayghan, F.A. Tehrani, M. Khayat-Khoei, H. Peirovi, Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis, *Placenta.* 34 (2013) 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.02.001>.
- [208] S.-H. Tsai, Y.-W. Liu, W.-C. Tang, Z.-W. Zhou, C.-Y. Hwang, G.-Y. Hwang, B.-R. Ou, C.-P. Hu, V.C. Yang, J.-K. Chen, Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (2007) 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.047>.
- [209] H. Niknejad, T. Deihim, M. Solati-Hashjin, H. Peirovi, The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells, *Cryobiology.* 63 (2011) 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.08.003>.
- [210] H. Oxlund, R. Helmig, J.T. Halaburt, N. Uldbjerg, Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 34 (1990) 247–255.
- [211] W. Buerzle, E. Mazza, On the deformation behavior of human amnion, *J. Biomech.* 46 (2013) 1777–1783. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.05.018>.
- [212] M. El Khwad, B. Stetzer, R.M. Moore, D. Kumar, B. Mercer, S. Arikat, R.W. Redline, J.M. Mansour, J.J. Moore, Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor, *Biol. Reprod.* 72 (2005) 720–726. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.033647>.
- [213] T.M. Malak, S.C. Bell, Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 101 (1994) 375–386.
- [214] J. McLaren, T.M. Malak, S.C. Bell, Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix, *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14 (1999) 237–241.
- [215] P.C. McParland, D.J. Taylor, S.C. Bell, Mapping of zones of altered morphology and chorionic connective tissue cellular phenotype in human fetal membranes (amniochorion and decidua) overlying the lower uterine pole and cervix before labor at term, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189 (2003) 1481–1488.
- [216] M.L. Oyen, R.F. Cook, S.E. Calvin, Mechanical failure of human fetal membrane tissues, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 651–658. <https://doi.org/10.1023/b:jmsm.0000030205.62668.90>.
- [217] E.M. Joyce, J.J. Moore, M.S. Sacks, Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 144 Suppl 1 (2009) S121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.02.014>.
- [218] A. Mauri, A.E. Ehret, M. Perrini, C. Maake, N. Ochsenbein-Kölble, M. Ehrbar, M.L. Oyen, E. Mazza, Deformation mechanisms of human amnion: Quantitative studies based on second harmonic generation microscopy, *J. Biomech.* 48 (2015) 1606–1613. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.01.045>.
- [219] A.K. Riau, R.W. Beuerman, L.S. Lim, J.S. Mehta, Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction, *Biomaterials.* 31 (2010) 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.034>.

- [220] M. Gholipourmalekabadi, B. Farhadhosseinabadi, M. Faraji, M.R. Nourani, How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures?, *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>.
- [221] P.B. Milan, N. Amini, M.T. Joghataei, L. Ebrahimi, M. Amoupour, A. Sarveazad, S. Kargozar, M. Mozafari, Decellularized human amniotic membrane: From animal models to clinical trials, *Methods San Diego Calif.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.018>.
- [222] S.-P. Wilshaw, J.N. Kearney, J. Fisher, E. Ingham, Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering, *Tissue Eng.* 12 (2006) 2117–2129. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2117>.
- [223] R. Sripriya, R. Kumar, Denudation of human amniotic membrane by a novel process and its characterisations for biomedical applications, *Prog. Biomater.* 5 (2016) 161–172. <https://doi.org/10.1007/s40204-016-0053-7>.
- [224] A.J. Shortt, G.A. Secker, R.J. Lomas, S.P. Wilshaw, J.N. Kearney, S.J. Tuft, J.T. Daniels, The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells, *Biomaterials.* 30 (2009) 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.048>.
- [225] M. Fenelon, D. B Maurel, R. Siadous, A. Gremare, S. Delmond, M. Durand, S. Brun, S. Catros, F. Gindraux, N. L’Heureux, J.-C. Fricain, Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 104 (2019) 109903. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109903>.
- [226] F.A. Tehrani, A. Ahmadiani, H. Niknejad, The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane, *Cryobiology.* 67 (2013) 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.08.010>.
- [227] R. Laurent, A. Nallet, L. Obert, L. Nicod, F. Gindraux, Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank, *Cell Tissue Bank.* 15 (2014) 267–275. <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9437-x>.
- [228] M.T. Rodríguez-Ares, M.J. López-Valladares, R. Touriño, B. Vieites, F. Gude, M.T. Silva, J. Couceiro, Effects of lyophilization on human amniotic membrane, *Acta Ophthalmol. (Copenh.).* 87 (2009) 396–403. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01261.x>.
- [229] A. Russo, P. Bonci, P. Bonci, The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane, *Cell Tissue Bank.* 13 (2012) 353–361. <https://doi.org/10.1007/s10561-011-9261-5>.
- [230] R. Singh, D. Singh, A. Singh, Radiation sterilization of tissue allografts: A review, *World J. Radiol.* 8 (2016) 355. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.355>.
- [231] International Atomic Energy Agency, Guidelines for industrial radiation sterilization of disposable medical products, (1990).
- [232] R. Singh, S. Purohit, M.P. Chacharkar, P.S. Bhandari, A.S. Bath, Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns, *Burns.* 33 (2007) 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.08.004>.
- [233] F. von Versen-Höynck, C. Syring, S. Bachmann, D.E. Möller, The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts--light and scanning electron microscopic studies, *Cell Tissue Bank.* 5 (2004) 45–56.
- [234] H. Mrázová, J. Koller, K. Kubišová, G. Fújeríková, E. Klincová, P. Babál, Comparison of structural changes in skin and amnion tissue grafts for transplantation induced by gamma and electron beam irradiation for sterilization, *Cell Tissue Bank.* 17 (2016) 255–260. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9536-3>.

- [235] S. Mohd, M.I. Ghazali, N. Yusof, S. Sulaiman, S. Ramalingam, T. Kamarul, A. Mansor, Quantifying the ultrastructure changes of air-dried and irradiated human amniotic membrane using atomic force microscopy: a preliminary study, *Cell Tissue Bank*. 19 (2018) 613–622. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9711-4>.
- [236] S.S. Ab Hamid, N.K. Zahari, N. Yusof, A. Hassan, Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation, *Cell Tissue Bank*. 15 (2014) 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10561-012-9353-x>.
- [237] M.G. Baldry, The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid, *J. Appl. Bacteriol.* 54 (1983) 417–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02637.x>.
- [238] R.S. Sikka, D.A. Fischer, M.F. Swiontkowski, Reprocessing single-use devices: an orthopaedic perspective, *J. Bone Joint Surg. Am.* 87 (2005) 450–457. <https://doi.org/10.2106/JBJS.D.02501>.
- [239] De Roth, Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes, *Arch. Ophthalmol.* (1940) 522–525.
- [240] K. Jirsova, G.L.A. Jones, Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting—a review, *Cell Tissue Bank*. 18 (2017) 193–204. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9618-5>.
- [241] D. Ilic, L. Vicovac, M. Nikolic, E. Lazic Ilic, Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds: Table 1, *Br. Med. Bull.* 117 (2016) 59–67. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv053>.
- [242] V. Lo, E. Pope, Amniotic membrane use in dermatology, *Int. J. Dermatol.* 48 (2009) 935–940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04173.x>.
- [243] W. Li, G. Ma, B. Brazile, N. Li, W. Dai, J.R. Butler, A.A. Claude, J.A. Wertheim, J. Liao, B. Wang, Investigating the Potential of Amnion-Based Scaffolds as a Barrier Membrane for Guided Bone Regeneration, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*. 31 (2015) 8642–8653. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02362>.
- [244] M. Fénelon, O. Chassande, J. Kalisky, F. Gindraux, S. Brun, R. Bareille, Z. Ivanovic, J.-C. Fricain, C. Boiziau, Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (2018) 78. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6086-9>.
- [245] M. Fénelon, M. Etchebarne, R. Siadous, A. Grémare, M. Durand, L. Sentilhes, Y. Torres, S. Catros, F. Gindraux, N. L’Heureux, J.-C. Fricain, Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice, *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2020). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36964>.
- [246] S. Díaz-Prado, M.E. Rendal-Vázquez, E. Muiños-López, T. Hermida-Gómez, M. Rodríguez-Cabarcos, I. Fuentes-Boquete, F.J. de Toro, F.J. Blanco, Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair, *Cell Tissue Bank*. 11 (2010) 183–195. <https://doi.org/10.1007/s10561-009-9144-1>.
- [247] M. Fénelon, S. Catros, J.C. Fricain, What is the benefit of using amniotic membrane in oral surgery? A comprehensive review of clinical studies, *Clin. Oral Investig.* 22 (2018) 1881–1891. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2457-3>.
- [248] M. Bourgeois, F. Loisel, L. Obert, I. Pluvy, F. Gindraux, Can the amniotic membrane be used to treat peripheral nerve defects? A review of literature, *Hand Surg. Rehabil.* 38 (2019) 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.hansur.2019.05.006>.
- [249] A. Liberski, N. Ayad, D. Wojciechowska, R. Kot, D.M.P. Vo, D. Aibibu, G. Hoffmann, C. Cherif, K. Grobelny-Mayer, M. Snyckerski, H. Goldmann, Weaving for heart valve tissue engineering, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 633–656. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.012>.

- [250] S. van Rooij, M.E. Sprengers, J.P. Peluso, J. Daams, D. Verbaan, W.J. van Rooij, C.B. Majoie, A systematic review and meta-analysis of Woven EndoBridge single layer for treatment of intracranial aneurysms, *Interv. Neuroradiol. J. Peritherapeutic Neuroradiol. Surg. Proced. Relat. Neurosci.* (2020) 1591019920904421. <https://doi.org/10.1177/1591019920904421>.
- [251] R. Vaishya, A.K. Agarwal, M. Tiwari, A. Vaish, V. Vijay, Y. Nigam, Medical textiles in orthopedics: An overview, *J. Clin. Orthop. Trauma.* 9 (2018) S26–S33. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2017.10.016>.
- [252] M. Akbari, A. Tamayol, S. Bagherifard, L. Serex, P. Mostafalu, N. Faramarzi, M.H. Mohammadi, A. Khademhosseini, *Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving*, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 751–766. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500517>.
- [253] R.M. Rossi, G. Fortunato, S. Nedjari, A. Morel, F. Heim, J.-F. Osselin, M.-A. Bueno, Mechanical properties of medical textiles, in: *Struct. Mech. Text. Fibre Assem.*, Elsevier, 2019: pp. 301–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102619-9.00009-2>.
- [254] M. Hasegawa, T. Azuma, Mechanical properties of synthetic arterial grafts, *J. Biomech.* 12 (1979) 509–517. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(79\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0021-9290(79)90039-3).
- [255] R. Hajjaji, S.B. Abdessalem, J.F. Ganghoffer, The influence of textile vascular prosthesis crimping on graft longitudinal elasticity and flexibility, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 16 (2012) 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.06.017>.
- [256] H. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: Design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 266–276. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010605\)55:3<266::aid-jbm1014>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010605)55:3<266::aid-jbm1014>3.0.co;2-c).
- [257] Y. Chen, X. Ding, Y. Li, M.W. King, J. Gao, X. Zhao, A bilayer prototype woven vascular prosthesis with improved radial compliance, *J. Text. Inst.* 103 (2012) 106–111. <https://doi.org/10.1080/00405000.2011.552956>.
- [258] A.B. Voorhees, A. Jaretzki, A.H. Blakemore, The use of tubes constructed from vinyon “N” cloth in bridging arterial defects, *Ann. Surg.* 135 (1952) 332–336. <https://doi.org/10.1097/00000658-195203000-00006>.
- [259] R.J. Zdrahala, Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art, *J. Biomater. Appl.* 10 (1996) 309–329. <https://doi.org/10.1177/088532829601000402>.
- [260] T. Yokota, H. Ichikawa, G. Matsumiya, T. Kuratani, T. Sakaguchi, S. Iwai, Y. Shirakawa, K. Torikai, A. Saito, E. Uchimura, N. Kawaguchi, N. Matsuura, Y. Sawa, In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136 (2008) 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.02.058>.