



HAL
open science

Développement, par ingénierie tissulaire, d'un substitut vasculaire entièrement biologique et humain grâce à l'utilisation d'une approche textile

Laure Magnan

► To cite this version:

Laure Magnan. Développement, par ingénierie tissulaire, d'un substitut vasculaire entièrement biologique et humain grâce à l'utilisation d'une approche textile. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0284 . tel-03038532

HAL Id: tel-03038532

<https://theses.hal.science/tel-03038532>

Submitted on 3 Dec 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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Laure MAGNAN

**Développement, par ingénierie tissulaire, d'un substitut
vasculaire entièrement biologique et humain grâce à
l'utilisation d'une approche textile**

Sous la direction de : Nicolas L'HEUREUX

Soutenue le 30 Novembre 2018

Membres du jury :

Mme. BORDENAVE Laurence PU-PH	Université de Bordeaux	Invitée
M. MENU Patrick PU	Université de Lorraine	Rapporteur et Président
M. SAUCY François PU-PH	Université de Lausanne	Rapporteur
M. BLANCHEMAIN Nicolas MCU	Université de Lille	Examineur
M. L'HEUREUX Nicolas DR2	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

DÉVELOPPEMENT, PAR INGÉNIERIE TISSULAIRE, D'UN SUBSTITUT VASCULAIRE ENTIÈREMENT BIOLOGIQUE ET HUMAIN GRÂCE À L'UTILISATION D'UNE APPROCHE TEXTILE

Lorsque des vaisseaux autologues ne sont pas disponibles pour faire un pontage, des greffons synthétiques sont utilisés mais avec des taux d'échec élevés. En effet, malgré leurs bonnes propriétés mécaniques, la surface synthétique de ces greffons entraîne de la thrombose et de l'hyperplasie intimale ayant pour conséquence une mauvaise perméabilité du substitut à long terme pour de nombreuses applications. Par ingénierie tissulaire, des greffons vasculaires entièrement biologiques et humains ont déjà été produits par roulage de feuillets de matrice extracellulaire synthétisée par des fibroblastes dermiques humains *in vitro*. Grâce à une nouvelle méthode d'assemblage basée sur une approche textile, des greffons ont été produits trois fois plus rapidement. Pour ce faire, le feuillet a été découpé en fils afin de permettre la construction d'un substitut vasculaire par tissage. Cette thèse comporte trois articles. Le premier visait à montrer la composition riche de la matrice, décrire l'organisation de son réseau complexe de collagènes et démontrer que la dévitalisation par séchage de la matrice n'a pas affecté significativement cette organisation. Le deuxième avait pour but de décrire les propriétés mécaniques des fils en fonction du torsadage et/ou de l'âge de la matrice ainsi que l'effet sur la force de différents traitements nécessaires au processus de fabrication. Les différentes applications de l'approche textile dans la construction de structures complexes ainsi que les propriétés mécaniques des substituts tissés ont également été évaluées. Le troisième article a montré la faible réponse inflammatoire ainsi que le potentiel d'intégration et de remodelage de la matrice *in vivo*. Par ailleurs, la décellularisation n'a pas montré de résultats supérieurs à la dévitalisation, permettant ainsi de s'affranchir d'une étape de fabrication supplémentaire et potentiellement délétère à l'organisation biologique de cette matrice. En conclusion, cette thèse constitue la première démonstration de la fabrication de textiles humains mécaniquement très forts mais sans utilisation de matériel exogène. La dévitalisation couplée à l'approche textile ont permis de créer un modèle allogénique plus simple, plus rapide et moins coûteux mais avec un potentiel d'intégration *in vivo* intact. Ce modèle sera très prochainement étudié par implantation à long terme dans la circulation sanguine.

Mots-clés : ingénierie tissulaire vasculaire, matrice extracellulaire synthétisée *in vitro*, textiles humains.

DEVELOPMENT OF A COMPLETELY BIOLOGICAL AND HUMAN TISSUE-ENGINEERED VASCULAR GRAFT USING A TEXTILE APPROACH

When autologous blood vessels are not available for bypass surgery, synthetic grafts are used but display high failure rates. Indeed, despite their good mechanical properties, their synthetic surface lead to thrombosis and intimal hyperplasia, which cause poor long-term patency in many applications. Using tissue engineering, completely biological and human vascular grafts have been produced by rolling sheets of extracellular matrix synthesized by dermal human fibroblasts *in vitro*. Using a new assembly technique based on a textile approach, grafts were produced three-time faster. To do so, sheets were cut into yarns to construct vascular substitute by weaving. This manuscript includes three articles. The first one aimed at showing the rich composition of the matrix, describing the organization of its complex network of collagens and demonstrating that the devitalization by drying the matrix did not significantly affect this organization. The second one described the mechanical properties of the yarns depending on the twisting, matrix age or different treatments useful for the manufacturing process. It also demonstrated some of the assembly techniques possible with this human yarn, as well as its possible use as a suture or to build a vascular graft. The third article showed the survival of the yarns subcutaneously implanted for 6 month in nude rats. The implants created little inflammatory response, were mildly remodeled and kept a significant mechanical strength. Decellularization did not show results improvement compared to the simple devitalization, demonstrating that the remaining cellular fragments were not a meaningful activator of the innate immune system. To conclude, this thesis is the first demonstration of the production of human textiles, without using any exogenous material and that are mechanically very strong. Both the devitalization and the textile approach have allowed to create a simpler allogeneic model, faster and cheaper but with an intact potential of integration *in vivo*, that will be studied very soon with a long-term implantation of the textile in the bloodstream.

Key words: vascular tissue engineering, cell-assembled extracellular matrix, human textiles.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Pr. Laurence Bordenave, Pr. Patrick Menu, Pr. François Saucy et Dr. Nicolas Blanchemain, membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté de juger mes travaux.

Merci au Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour la bourse qu'il m'a attribuée pour réaliser ces travaux de recherche.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire BioTis pour ces 3 années passées à vos côtés. Merci pour les très bons moments partagés (pique-nique chez Joëlle, repas de Noël, repas chez Reine, séminaire, *etc.*) et merci pour vos précieux conseils et votre aide au quotidien. Un grand merci à tous les doctorants avec qui j'ai partagé cette aventure.

Merci à Jean-Christophe Fricain et Joëlle Amédée pour leur accueil au sein de l'unité BioTis. Je vous remercie de m'avoir donné la chance de mener à bien ce doctorat.

Merci à toi Tiftouf, Yoann, mon petit protégé, d'être un super collègue qui dégage une énergie incroyable ! Tu as toujours le sourire, quoi qu'il arrive et même très tôt le matin, et un peu trop tôt pour moi Haha ! Mais après mon café, ta positivité et ta bonne humeur ont été un réel bonheur pendant ces 3 ans ! Je te souhaite une très belle fin de thèse et tu vas devenir un excellent chercheur, j'en suis certaine. Merci d'avoir été un ami fidèle, toujours présent et toujours à l'écoute. Tu es une très belle personne.

Un immense merci à toi Gaëlle, mon rayon de soleil quotidien, d'avoir été une collègue fantastique et une amie incroyable. Cette 3^{ème} année de thèse a été tellement plus agréable à tes côtés. Comme je l'ai souvent dit, ma thèse n'aurait pas été la même sans toi, que ce soit grâce à ton immense aide pour mes manips, dans la réflexion et la mise en place, mais aussi grâce à ton sourire, tes blagues et toutes nos petites histoires de campagnardes. Travailler avec une personne comme toi à mes côtés a été une véritable chance. Je souhaite à tout le monde de connaître le bonheur de travailler avec toi. Tu vas énormément me manquer et j'espère qu'un jour on pourra retravailler ensemble. En attendant, je sais que tu resteras une super amie. Et rappelle-toi, tu es belle, forte, intelligente et indépendante !

Merci l'enfant, le CM2, Baptiste, de m'avoir permis de garder le sourire pendant les derniers mois de manip malgré la difficulté. Le tissage était beaucoup plus passionnant en ta compagnie. Tu as souvent trouvé les mots justes pour me redonner confiance en moi, merci. Il y a des rencontres coups de cœur, qui comptent plus que d'autres, tu en fais partie. Tu es quelqu'un de brillant et je sais que tu iras très loin. Mais n'oublie pas de prendre tes responsabilités !!! Hahaha.

Merci aux copines dentistes du labo que j'admire énormément (Olivia, Mathilde, Audrey et Agathe) pour tout le travail que vous fournissez tout en gardant une joie de vivre incroyable ! Merci Audrey pour ton sourire, ta bonne humeur et ton soutien. Je te souhaite tout le bonheur du monde. Merci Agathe pour ton énergie et ta joie de vivre ! J'ai été ravie de travailler à tes côtés et je suis persuadée que ta thèse va être une grande réussite. Merci Olivia, ma copine bretonne, d'avoir pris le temps de m'écouter quand je venais t'embêter au troisième étage ! Je fais également un gros bisou à Eva, ta petite princesse. Mathilde, tu es une personne géniale, crois-en toi, je suis persuadée que ta thèse sera parfaite, ça a été un bonheur d'être à tes côtés au quotidien. Par contre, attention Mathilde et Olivia, parce que, paraît-il qu'il y aurait du rhum dans la sangria !!! Hahaha. Et encore toutes mes félicitations les M&Ms pour votre magnifique union.

Thank you Sindhu for all these exciting discussions about our thesis. I wish you the best and I am sure that you will succeed!

Grazie mille Mattia ! Ton passage au labo a été super, je suis heureuse d'avoir pu partager tous ces bons moments avec toi et merci pour ces vacances en Sicile ! Je te souhaite beaucoup de réussite pour ton doctorat mais tu es talentueux donc je ne me fais aucun souci pour toi.

Merci à la Team NLH au complet, travailler dans cette bonne humeur, cette entraide et ces encouragements m'ont permis de garder la motivation jour après jour. Je suis fière de vous et de nous !

Diane, je te souhaite beaucoup de réussite et d'épanouissement dans cette thèse.

Merci à mes stagiaires pour leur aide précieuse et leur bonne humeur : Elisa, Niki, Néstor et Nicolas Da. (héhé non officiel). Travailler à vos côtés a été très enrichissant pour moi et j'espère que vous garderez un bon souvenir de cette expérience. Nico, je suis très heureuse que tu puisses rejoindre notre équipe, tu as fait preuve de beaucoup de volonté et je sais que tu seras très largement à la hauteur. Néstor, je suis très fière de ton parcours, tu vas être un doctorant brillant. Et merci à tous les stagiaires qui sont venus travailler au laboratoire au cours de ma thèse et qui ont apporté beaucoup de bonne humeur !

Un merci tout particulier à Hugo, mon parrain, mon confident, mon exemple au laboratoire. Tu as toujours été là pour écouter mes plaintes (Noooooon c'est pas vrai, je ne me plains jamais !!!), mes soucis du quotidien et mes craintes quant à l'avenir. Merci beaucoup pour ton sourire, ta bonne humeur et d'avoir des parents géniaux !!! Obrigada !

Merci à mes petits étrangers Francesca et Bruno d'avoir été de vrais bisounours remplis d'amour ! Mes journées auraient été beaucoup plus tristes sans traverser le couloir et se faire kidnapper par vos câlins ! La Bretagne a hâte de vous revoir, ai, meu coração !!!

Merci à Sébastien qui a été un super collaborateur. Travailler avec toi a été un réel plaisir, merci pour ton aide précieuse, ton efficacité à toute épreuve et ta bonne humeur (même les jours de mosaïque Haha).

Merci à Julien et à tous les membres de l'animalerie A2 pour votre gentillesse. Merci Julien de nous avoir aidé avec mes petits ratons ! C'était un plaisir de travailler dans la bonne humeur et souvent en chansons Haha !

Merci à Marc, Stéphanie, Nathalie C., Marina et à toute l'équipe AquiDoc de m'avoir fait vivre cette super aventure associative. Cette expérience a été très enrichissante et m'a permis de grandir. Un grand merci à toi Marc d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée à accomplir l'autre partie de ma thèse m'ayant permis d'acquérir des compétences insoupçonnées au départ.

Merci Nathalie D. pour tes nombreux conseils et encouragements tout au long de cette thèse. Merci également pour le temps que tu as consacré à la relecture de mes travaux.

Merci Patrick, le super héros du labo (c'est normal, tu es breton Héhé), pour ton aide au quotidien. Tu nous rends tellement de service et toujours avec le sourire !

Merci à ma famille bordelaise, ceux qui m'ont permis de m'évader et de garder les pieds sur terre à la fois : Emilie R., Matthieu, Néstor, Josselin, Nicolas De., Thibaud, Emilie I. et Adrien, Camille et Joaquim, Elodie, les vieux copains présents depuis le début de l'aventure bordelaise pour certains. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre présence dans les bons et les mauvais moments. Mon foie s'associe également à moi pour vous remercier des innombrables soirées passées à vos côtés Haha ! Emilie R., merci pour ta présence, pour tes conseils, et pour tous nos petits moments partagés pendant ces 3 ans dans le même bateau ! Tu es rayonnante, le bonheur te va si bien ! Matthieu, merci pour ces 6 mois de stage de M2 passés en ta compagnie, c'était un bonheur quotidien et merci pour les moments partagés pendant la thèse ! Je te souhaite beaucoup de réussite. Néstor, merci pour tout. Merci d'être toi, d'être aussi solaire, d'être toujours présent. Tu as un grand cœur et ta réussite professionnelle ne fait aucun doute. Josselin (ou RGEEK Hahaha), merci d'être là pour moi, ton amitié est très précieuse à mes yeux, tu es quelqu'un d'extraordinaire et je suis très heureuse d'avoir partagé ces vacances à Lisbonne avec toi. Nico, tu comptes beaucoup pour moi et c'est toujours un immense plaisir d'échanger avec toi. Thibaud (tu veux un sarouel et une carte papier ? Hahaha), merci pour ton sourire, ta joie de vivre et ton écoute. Tu es un ami précieux et je te souhaite de t'épanouir. Mais merci aussi à ceux qui sont partis en cours de route : Emilie I. et Adrien (je fais un énorme câlin à Soan, Tata Poche n°1 est complètement folle de ce petit <3), Joaquim et Camille (Minou et Oh !), Elodie. Je vous souhaite beaucoup de bonheur dans vos nouvelles vies et vous me manquez beaucoup.

J'aimerais adresser un merci tout particulier à Léo, mon mentor de M2 ! Merci pour tout ce que tu m'as appris pendant cette période et pour tous les conseils que tu me donnes. C'est grâce à des personnes comme toi que l'on peut trouver sa voie. Merci à toi et Emilie I. de m'avoir remotivée dans les moments de doutes, vous avez été mes anges gardiens pendant l'écriture et vous avoir comme amis est très précieux pour moi. Merci également à toutes les personnes du GREF (à l'époque). Et oui, ces 6 mois de stage parmi vous ont été incroyables et resteront un souvenir inoubliable. Merci Valérie de m'avoir fait confiance tout au long de ce stage et merci Violaine et Fred pour votre soutien sans faille. Vous avez toujours cru en moi et c'est grâce à vous que j'ai pu avoir confiance en moi.

Merci à mes copines bretonnes qui ont aussi participé à cette aventure malgré la distance. Charlotte et Cindy, vous avez été des personnes très importantes dans ma vie, merci d'avoir été mes coups de cœur pendant la L3 et le Master, vous êtes des personnes fantastiques.

Merci au Laboratoire de Cytogénétique et Biologie cellulaire du CHU de Rennes. Ma passion pour la Recherche a commencé avec vous et c'est grâce à votre confiance au cours de mes stages et de mes remplacements estivaux que j'ai pu prendre confiance en moi. Alors merci à tous, Marc-Antoine, l'ensemble des Biologistes et tou(te)s mes supers collègues !!! Et vive la FISH ! Haha.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Nicolas. Je suis très fière d'avoir partagé ton aventure française dès le début avec toi (et d'avoir été ton cochon d'Inde Hahaha !). Bien qu'une thèse soit difficile à gérer des deux côtés, tu as toujours été à l'écoute quand j'avais des difficultés. Je te souhaite l'épanouissement dans ta nouvelle carrière avec beaucoup de positivité (Héhé !). Travailler aux côtés d'un grand chercheur comme toi a été un immense privilège, j'ai énormément appris et grandi pendant ces 3 ans et je t'en suis très reconnaissante.

Merci à ma belle-sœur Aurélie et mon frère Julien, non seulement pour m'avoir soutenue depuis le début en croyant en moi mais aussi en participant largement à mon alcoolémie durant tous ces très bons moments (Haha !!!). Merci d'avoir donné vie à deux magnifiques petits bouts d'humanité, Rose et Hugo, qui font mon bonheur.

Et enfin merci à mes parents pour leur confiance aveugle depuis le début de mes études supérieures. Vous avez toujours cru en moi et c'est grâce à votre soutien que j'ai pu gravir les marches petit à petit. Je vous remercie pour l'éducation que vous m'avez donnée et les valeurs précieuses que vous m'avez inculquées.

Cette thèse est un travail collaboratif qui n'aurait jamais pu voir le jour sans vous tous. Je n'aurai pas pu venir à bout de cette aventure sans votre aide et votre soutien. Alors merci du fond du cœur.

« Breizh, bro gozh ma zadoù »

“Gant ar boan hag an amzer a-benn a bep tra e teuer.”

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES	16
ABRÉVIATIONS	19
I. PROBLÉMATIQUE	22
II. SYSTÈME VASCULAIRE ET PATHOLOGIES ASSOCIÉES	24
1. SYSTÈME VASCULAIRE	24
1.1. ARBRE VASCULAIRE	24
1.2. ARTÈRES	25
1.2.1. Structure et fonction	25
1.2.2. Propriétés mécaniques	27
2. PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES ET TROUBLES CIRCULATOIRES	28
2.1. ÉPIDÉMIOLOGIE	28
2.2. PATHOLOGIES VASCULAIRES LES PLUS FRÉQUENTES	29
2.2.1. Athérosclérose, hyperplasie intimale et thrombose	29
2.2.2. Anévrisme	31
2.2.3. Dissection aortique	31
2.3. THÉRAPIES DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES	32
3. CAS PARTICULIER : FISTULE ARTÉRIO-VEINEUSE	33
III. SUBSTITUTS VASCULAIRES	35
1. SUBSTITUTS BIOLOGIQUES	35
1.1. GREFFONS AUTOLOGUES	35
1.2. ALLOGREFFONS ET XÉNOGREFFONS	36
2. SUBSTITUTS SYNTHÉTIQUES PERMANENTS	38
2.1. PTFE : POLYTETRAFLUOROETHYLENE	38
2.2. PET : POLYETHYLENE TEREPHTALATE	38
2.3. GROS VS PETIT CALIBRES	39
IV. SUBSTITUTS VASCULAIRES ISSUS DE L'INGÉNIERIE TISSULAIRE	43
1. INTRODUCTION DE L'INGÉNIERIE TISSULAIRE	43
2. UTILISATION D'UN ÉCHAFAUDAGE EXOGENE	44
2.1. ÉCHAFAUDAGE SYNTHÉTIQUE BIODÉGRADABLE	44
2.2. ÉCHAFAUDAGE NATUREL	48
2.3. ÉCHAFAUDAGE HYBRIDE	51
3. MATRICES BIOLOGIQUES DÉCELLULARISÉES	53
4. TECHNIQUES D'AUTO-ASSEMBLAGE	55
4.1. MATRICE EXTRACELLULAIRE SYNTHÉTISÉE PAR DES CELLULES IN VITRO	55
4.2. AGRÉGATS CELLULAIRES DE MICRO-TISSU	58

4.3.	BIO-IMPRESSION	58
5.	UTILISATION DU CORPS COMME BIORÉACTEUR	59
6.	CONCLUSION	63
V.	MATRICE EXTRACELLULAIRE	65
1.	STRUCTURE	65
2.	COMPOSITION ET FONCTION	66
3.	MATRICE EXTRACELLULAIRE VASCULAIRE	70
4.	CAS PARTICULIER DU COLLAGÈNE	71
5.	SYNTHÈSE IN VITRO DE LA MEC POUR L'INGÉNIERIE TISSULAIRE	77
5.1.	UTILISATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	77
5.2.	UTILISATION DES FIBROBLASTES	78
VI.	PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES REQUISES POUR UN SUBSTITUT VASCULAIRE	81
1.	COMPLIANCE	83
2.	PRESSION À L'ÉCLATEMENT	84
3.	RÉSISTANCE À L'ARRACHEMENT DES SUTURES	85
4.	POROSITÉ ET ÉTANCHÉITÉ	85
VII.	RÉPONSE DE L'HÔTE À L'IMPLANTATION D'UN PRODUIT D'INGÉNIERIE TISSULAIRE	86
1.	RÉPONSE À UN CORPS ÉTRANGER	86
2.	RÉPONSE À UNE MATRICE NATURELLE OU SYNTHÉTISÉE <i>IN VITRO</i>	90
VIII.	APPROCHE TEXTILE	96
IX.	OBJECTIFS	98
X.	RÉSULTATS	101
XI.	DISCUSSION	162
XII.	CONCLUSION	165
XIII.	PERSPECTIVES	167
XIV.	COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS	172
1.	COMMUNICATIONS ORALES NATIONALES	172
2.	COMMUNICATIONS ORALES INTERNATIONALES	172
3.	PUBLICATIONS	173

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la paroi artérielle	25
Figure 2 : Composition cellulaire complexe de la tunique externe de la paroi artérielle, l'adventice .	26
Figure 3 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi vasculaire	27
Figure 4 : Développement d'une plaque athéromateuse	29
Figure 5 : Thrombose : rupture de la plaque athéromateuse et formation du thrombus	30
Figure 6 : Formation d'un anévrisme	31
Figure 7 : Dissection aortique par déchirure de l'intima (a) ou rupture du vasa vasorum (b)	31
Figure 8 : Angioplastie et mise en place d'une endoprothèse métallique (<i>stent</i>)	32
Figure 9 : Création d'une fistule artério-veineuse avec ou sans greffon	34
Figure 10 : Design structurel de Dacron® tricoté	38
Figure 11 : Taux de perméabilité de substituts vasculaires biologiques et synthétiques.....	42
Figure 12 : Composantes de l'ingénierie tissulaire	43
Figure 13 : Principe schématisé du remodelage par infiltration cellulaire des cellules de l'hôte.....	45
Figure 14 : Approche de Niklason.	47
Figure 15 : Substitut vasculaire obtenu par Tranquillo	50
Figure 16 : Substitut vasculaire entièrement biologique et humain synthétisé par des fibroblastes dermiques allogéniques	57
Figure 17 : Construction d'un substitut vasculaire in vivo grâce à la réponse à un corps étranger (<i>FBR</i>)	59
Figure 18 : Amélioration du biotube développé par Nakayama.....	61
Figure 19 : Tissu fibrocellulaire encapsulé autour du tube de polymère après 4 semaines d'implantation en site sous-cutané chez le porc.....	62
Figure 20 : Formation des fibres élastiques	66
Figure 21 : Structure des protéoglycanes et liaison avec des glycosaminoglycanes	68
Figure 22 : Domaines d'interaction de la laminine	68
Figure 23 : Domaines d'interaction de la fibronectine	69
Figure 24 : Composition des différentes couches de la paroi vasculaire.....	71
Figure 25 : Domaines collagéniques de la triple hélice et domaines non-collagéniques	72
Figure 26 : Structure du procollagène.....	73
Figure 27 : Schéma d'assemblage des fibrilles.....	74
Figure 28 : Assemblage des fibrilles en faisceaux parallèles pour former des fibres de collagène	74
Figure 29 : Rôles des fibroblastes dans la paroi vasculaire	80
Figure 30 : Pression à l'éclatement, résistance à l'arrachement de sutures et compliance de substituts vasculaires obtenus par ingénierie tissulaire	81
Figure 31 : Courbe contrainte-déformation (pression-diamètre) d'une artère nativ.....	82
Figure 32 : Formation d'une matrice provisoire à la surface du biomatériau	86
Figure 33 : Recrutement de neutrophiles et mastocytes pendant la phase aiguë de l'inflammation..	87
Figure 34 : Phase chronique de l'inflammation avec recrutement de lymphocytes et de macrophages qui fusionnent en cas d'échec de phagocytose pour former des cellules géantes.....	88
Figure 35 : Formation d'un granulome, capsule fibrotique, qui entoure le matériau.....	90
Figure 36 : Réponse normale du corps lors de la cicatrisation vs réponse immunomodulatrice lors de l'implantation d'un biomatériau	91
Figure 37 : Principe du tissage	97

Table 1 : Substituts vasculaires utilisés en clinique.....	40
Table 2 : Substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire ayant atteint les essais cliniques.....	64
Table 3 : Collagènes présents dans la paroi vasculaire et interactions avec les cellules et les autres protéines de la MEC.....	75
Table 4 : Comparaison de compliance entre du Dacron et des vaisseaux natifs.....	83

ABRÉVIATIONS

AH : acide hyaluronique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

CAM : cell-assembled extracellular matrix

CD : cluster differentiation

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : cellules musculaires lisses

CS : chondroïtine-sulfate

DAMP : damage-associated molecular patterns

DG : α -dystroglycan

DNAse : deoxyribonuclease

DS : dermatane-sulfate

EEL : external elastic lamina

EGF : epidermal growth factor

EMILIN : elastin microfibril interfacier

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

ePTFE : expanded polytetrafluoroethylene

FACITs : fibril-associated collagens with interrupted triple helices

FAP : fibroblast activation protein

FBGC : foreign body giant cells

FBR : foreign body response

FGF : fibroblast growth factor

FSP-1 : fibroblast-specific protein-1

GAG : glycosaminoglycanes

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor

GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor

HGF : hepatocyte growth factor

HMBG1 : high mobility box group 1

HS : héparane-sulfate

HSP : heat shock proteins

IEL : internal elastic lamina

IFN- γ : interféron- γ

IgG : immunoglobuline

IL-1 : interleukine-1

IL-4 : interleukine-4

IL-6 : interleukine-6

IL-8 : interleukine-8

IL-10 : interleukine-10

IL-13 : interleukine-13

LPS : lipopolysaccharide

KS : kératane-sulfate

MAGP1 : microfibril-associated glycoprotein 1

MEC : matrice extracellulaire

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MIP-1 β : macrophage inflammatory protein-1 β

MSC : mesenchymal stem cells

NO : nitric oxide

PCL : polycaprolactone

PDGF : platelet-derived growth factor

PET : polyethylene tetraptalate

PEUU : poly(ester urethane) urea

PF4 : facteur plaquettaire 4

PG : protéoglycanes

PGA : polyglycolic acid

PGS : poly(glycérol-sebacate)

PLA : poly-lactic acid

PLGA : poly(lactide-co-glycolide)

PLLA : poly-l-lactic acid

PRA : panel reactive antibody

PU : polyuréthanes

ROS : reactive oxygene species

SDS : sodium dodecyl sulfate

TGF- β : transforming growth factor-beta

TLR : toll-like receptors

TNF- α : tumor necrosis factor α

VEGF : vascular endothelial growth factor

vWF : facteur von Willebrand

WSS : wall shear stress

I. PROBLÉMATIQUE

Les maladies cardiovasculaires sont la cause de décès la plus fréquente au niveau mondial. En 2010, l'étude *Global Burden of Disease* estimait que les maladies cardiovasculaires étaient la cause de 15,6 millions de morts à travers le monde, représentant 29,6% de tous les décès (1). Aux Etats-Unis, en 2013, le taux de décès attribué aux maladies cardiovasculaires était de 222,9 pour 100 000 Américains (2).

Une des maladies cardiovasculaires la plus commune est l'athérosclérose. C'est une maladie chronique, progressive et systémique qui entraîne le dépôt d'une plaque d'athérome sur la paroi des artères par l'accumulation de lipides et de cellules inflammatoires (3). Cette maladie cause de l'inflammation chronique, la formation d'une plaque calcifiée, menant à une sténose partielle du vaisseau qui induit une ischémie partielle des tissus et peut aboutir en thrombose (4). L'athérosclérose peut affecter plusieurs types d'artères dans le corps telles que celles du cœur, du cerveau, des membres inférieurs et supérieurs, du pelvis et des reins. Selon le type d'artère obstruée, cette maladie peut entraîner un infarctus du myocarde, une ischémie/amputation des membres inférieurs, un accident vasculaire cérébral (AVC), etc.

Bien que des changements dans le mode de vie et des traitements pharmacologiques soient des options possibles pour des stades précoces de la maladie, une intervention mécanique est nécessaire pour les stades plus avancés. L'angioplastie percutanée consiste à dilater l'artère à l'endroit de l'obstruction à l'aide d'un petit ballonnet gonflable puis une endoprothèse métallique, un *stent*, est déposée à l'intérieur de l'artère afin de la maintenir ouverte. Bien que relativement peu coûteuse et associée à peu de risques, cette technique a ses limites : un nouveau rétrécissement de la paroi artérielle va fréquemment avoir lieu (resténose due à un remodelage prolifératif) malgré les différentes stratégies mises en place pour pallier ce problème (5). A plus long terme, un pontage peut être réalisé afin de contourner le blocage. Cette procédure consiste à prélever une veine ou préférentiellement une artère native dans le corps du patient, où les vaisseaux sanguins sont moins affectés, pour l'anastomoser en amont et en aval de l'obstruction (6).

Bien que ce pontage autologue soit considéré comme la procédure standard (*gold standard*) pour la revascularisation, la disponibilité en greffons autologues adaptés est limitée à cause de la progression de la maladie et du nombre répété de procédures. Face à ce manque de vaisseaux autologues, les greffons synthétiques ont été proposés pour le pontage.

Les matériaux les plus utilisés pour une greffe synthétique sont le polytétrafluoroéthylène expansé (*ePTFE, expanded polytetrafluoroethylene*), connu également sous le nom de Gore-Tex® et le polyéthylène tétraphthalate tissé (*PET*), plus connu sous le nom de Dacron®. Traditionnellement, l'*ePTFE* est largement utilisé pour des greffes de vaisseaux de petits diamètres (<6 mm) tandis que les chirurgiens ont recours au *PET* pour des greffons de plus gros diamètre (>8 mm) (7). Ces conduits synthétiques sont également largement utilisés comme abords vasculaires d'hémodialyse (voir II.3. Cas particulier de la fistule artérioveineuse) (8).

Malgré leurs bonnes propriétés mécaniques, les greffons synthétiques pour des applications de petit diamètre échouent à cause de leur mauvaise perméabilité à long terme. En effet, la surface synthétique de tels greffons peut entraîner directement une thrombose ou, à plus long terme, une hyperplasie intimale qui sera à l'origine de la diminution du diamètre interne du vaisseau et qui aura pour conséquence une thrombose plus tardive. Ces complications sont très fréquentes malgré les nouvelles stratégies mises en place visant à résoudre ce problème (9) (10). Par ailleurs, une des raisons d'échec des greffons synthétiques, notamment pour une greffe artérioveineuse lors de dialyse, est la colonisation bactérienne entraînant une infection. En effet, dans une étude de 2012, 28% des greffons vasculaires synthétiques ont dû être révisés ou explantés à cause d'infection (11). Ces infections pourraient partiellement expliquer l'augmentation de la mortalité d'environ 15% entre des patients ayant un greffon synthétique et ceux ayant une fistule artérioveineuse (12).

La faible disponibilité en greffons autologues couplée à la mauvaise perméabilité à long terme des substituts synthétiques se traduit par un manque criant de solutions pour l'implantation de substituts vasculaires de petit diamètre. Il est donc absolument nécessaire de développer rapidement de nouveaux types de greffons vasculaires adaptés aux applications requérant l'utilisation de petit diamètre. Cette thèse apporte des éléments de réponse innovants grâce au développement d'un vaisseau sanguin issu de l'ingénierie tissulaire entièrement biologique et humain, construit par une approche textile.

II. SYSTÈME VASCULAIRE ET PATHOLOGIES ASSOCIÉES

1. Système vasculaire

1.1. *Arbre vasculaire*

Le système vasculaire est constitué du cœur et des vaisseaux et a pour fonction de distribuer aux organes, par le sang, et grâce à différents stimuli, l'oxygène et les nutriments indispensables à leur fonctionnement, tout en éliminant leurs déchets. Il joue aussi un rôle de communication. En effet, les hormones sécrétées par les cellules endocrines sont transportées vers leurs cellules cibles par le sang. Il permet également le transport des cellules souches ainsi que des éléments cellulaires et protéiques du système immunitaire et les éléments figurés du sang. Le cœur pompe le sang à travers l'arbre vasculaire avec un certain rythme donnant ainsi un flux pulsatile (13) et permettant de contrôler sa vitesse et sa quantité apportée à travers les vaisseaux. Le cœur et les vaisseaux travaillent ensemble pour apporter un flux sanguin adéquat à toutes les parties du corps. Le système cardiovasculaire se compose de deux types de circulation : la circulation pulmonaire qui permet l'oxygénation du sang et la circulation systémique qui transporte le sang oxygéné et les nutriments au reste du corps.

L'arbre vasculaire est composé de trois compartiments vasculaires connectés en série : les artères, les capillaires et les veines. Les artères apportent le sang oxygéné loin du cœur et sont divisées en larges et petites artères. Les artères larges reçoivent la plus haute pression du flux sanguin et sont donc plus épaisses et plus élastiques. Les petites artères, comme les artérioles, possèdent des cellules musculaires lisses qui ont la capacité de se contracter ou de se relâcher pour réguler le flux sanguin en fonction des différentes pressions sanguines qui règnent dans le corps. Elles sont moins élastiques et plus rigides que les grosses artères car elles reçoivent une pression sanguine plus faible. Les capillaires sont très fins (diamètre de 8 à 10 μm), permettent la liaison entre les artérioles et les veinules et sont exclusivement constitués de cellules endothéliales. Les veines ont pour rôle de ramener le sang pauvre en oxygène au cœur. Leur paroi est plus fine que celle des artères car elles subissent des pressions sanguines beaucoup plus faibles. Elles contiennent des valves afin de prévenir le refoulement du sang.

C'est grâce à ce réseau très étendu d'artères, de capillaires et de veines que les fonctions cellulaires (croissance et métabolisme), l'absorption de nutriments (comme le glucose, les vitamines et les minéraux), l'élimination des produits de déchets cellulaires et métaboliques (homéostasie cellulaire) et la communication entre les organes (via les hormones, les cellules souches, les cellules de l'immunité, etc.) sont maintenues (14).

1.2. Artères

1.2.1. Structure et fonction

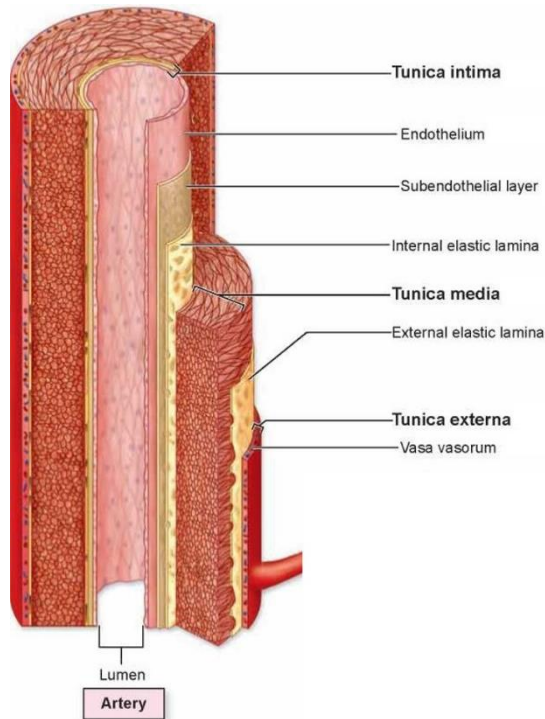


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle (D'après *Anatomy and Physiology*, 2013)

La paroi artérielle est constituée de trois couches de tissus concentriques appelées tuniques : l'intima (au contact direct du sang), la media et l'adventice (la tunique externe) (*Figure 1*) (15) (16). Chacune de ces tuniques contribue au maintien de l'homéostasie vasculaire et régule la réponse vasculaire aux stress ou blessures.

La tunique interne, l'intima, est composée d'une monocouche de cellules endothéliales (formant l'endothélium) qui sont en contact direct avec le sang. L'endothélium ainsi formé repose sur une membrane basale (autrement appelée lame basale), une fine couche de tissu subendothélial. Ce tissu sert à la fois d'ancrage aux cellules endothéliales et permet le lien entre l'endothélium et le tissu conjonctif vasculaire (14). L'endothélium joue un rôle clef dans la régulation de l'hémostase, de la coagulation, de l'inflammation, de la vasorégulation et de l'angiogenèse. Il est également responsable du tonus vasculaire grâce à l'interaction des cellules endothéliales avec des composants du système nerveux périphérique et surtout avec les cellules musculaires lisses qui ont un état contractile. La lamina élastique interne (*IEL*, *internal elastic lamina*) représente une barrière flexible entre l'endothélium et la média (17).

La média est la plus épaisse des trois couches et elle contient les cellules musculaires lisses (CML). On distingue deux types d'artères : les artères musculaires et les artères élastiques. Les artères musculaires ont plusieurs couches concentriques de CML. C'est également le cas des artères élastiques qui possèdent, en plus, une média épaisse particulièrement riche en protéines de la matrice extracellulaire (MEC) qui ont des propriétés élastiques telles que l'élastine et la fibrilline afin de maintenir la pression sanguine grâce à leur dilatation et leur contraction. Les artères élastiques, près du cœur, conduisent le sang fortement pulsatile, alors que les artères musculaires distribuent le sang aux différents organes et tissus (18). Une couche élastique intermédiaire sépare la média de l'adventice : la lamina élastique externe (EEL, *external elastic lamina*). Elle apporte un soutien structurel et permet la régulation de l'élasticité (19).

L'adventice permet de lier le vaisseau sanguin avec le tissu environnant. Le tissu conjonctif fibroélastique de l'adventice est constitué d'un échafaudage de matrice extracellulaire contenant des fibroblastes, des vaisseaux sanguins (*vasa vasorum*) et lymphatiques, des nerfs, des cellules progénitrices, des cellules immunitaires, faisant ainsi de l'adventice le compartiment le plus complexe et hétérogène de la paroi artérielle (Figure 2) (20).

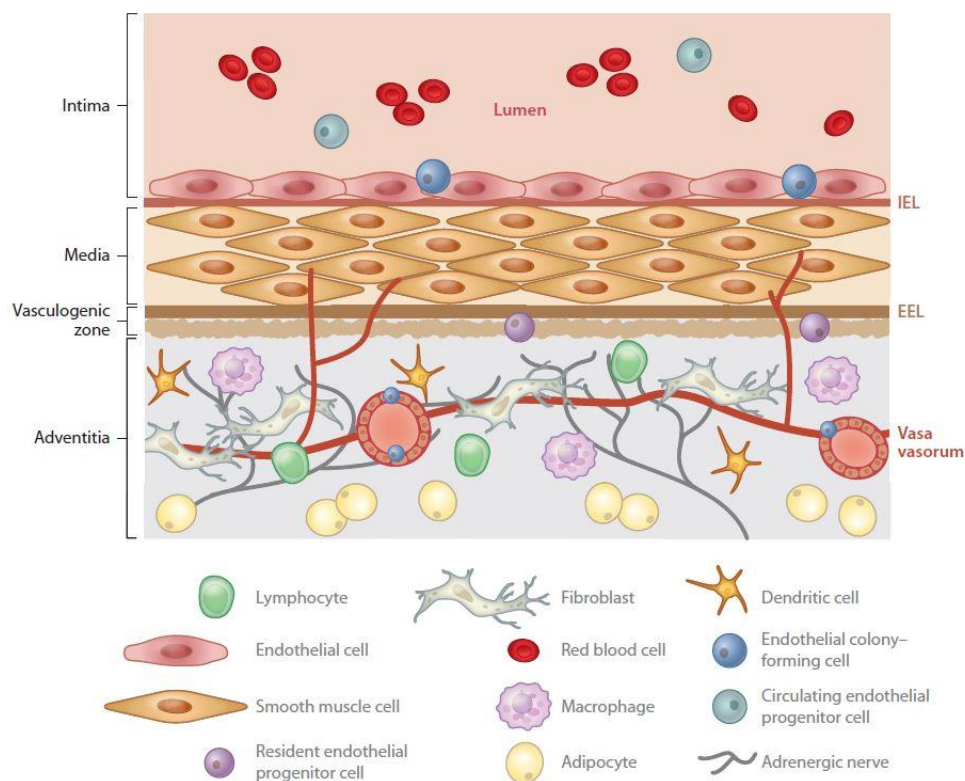


Figure 2 : Composition cellulaire complexe de la tunique externe de la paroi artérielle, l'adventice (Stenmark et al., 2013)

Les fibroblastes sont le type cellulaire le plus abondant de l'adventice et ont des origines variées : le mésenchyme primaire, la transition épithélio-mésenchymateuse locale et les précurseurs dérivés de la moelle osseuse (21). Ils jouent un rôle clef dans la force mécanique des tissus puisqu'ils produisent la MEC qui forme un réseau structural très dense. Ils font également partie des senseurs de la paroi artérielle répondant à différents stimuli de stress qui permettent leur activation (20).

1.2.2. Propriétés mécaniques

Les cellules présentes dans la paroi artérielle, et notamment les cellules endothéliales, ont un rôle majeur dans la réponse aux forces mécaniques créées par le flux sanguin pendant le cycle cardiaque. Ces forces mécaniques sont la pression transmurale, l'étirement circonférentiel et les contraintes de cisaillement (*Figure 3*) (22) (23).

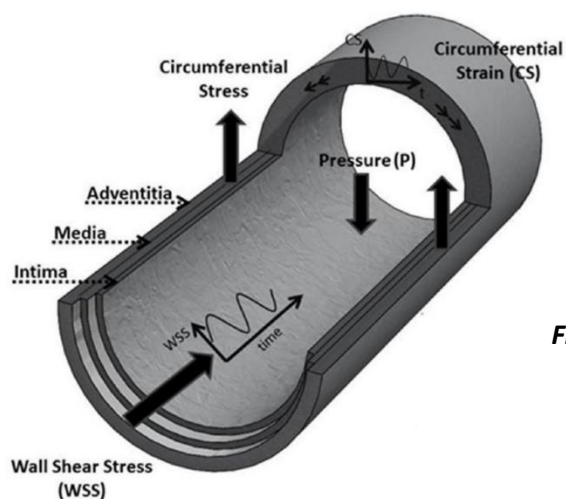


Figure 3 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi vasculaire (D'après Amaya et al., 2015)

La pression transmurale (P) est créée par les contractions cardiaques qui entraînent des forces hydrostatiques dans le vaisseau sanguin. C'est une force perpendiculaire à la paroi du vaisseau (15).

L'étirement circonférentiel (CS) est dû à la pression et à la pulsativité du sang et est entraîné par les forces circonférentielles qui conduisent à l'augmentation du diamètre de la paroi vasculaire, notamment dans la circulation pulmonaire, où la pulsativité du sang est très importante. L'étirement des cellules et de la matrice résulte d'une augmentation de la tension pariétale appliquée sur le vaisseau en réponse à une augmentation de la pression transmurale (différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du vaisseau).

Les contraintes de cisaillement sont créées à la surface des cellules endothéliales par le flux sanguin et affectent grandement leur comportement, qui, entre autre, influence le tonus vasculaire (24). Ces contraintes résultent des forces de friction latérales dues à l'écoulement du sang (loi de Poiseuille). Elles sont calculées par l'équation suivante : contraintes de cisaillement (*wall shear stress*) = $4\mu Q/\pi r^3$ où μ est la viscosité du fluide, Q est le flux du fluide et r est le rayon du vaisseau. Ainsi, ces contraintes augmentent au cube du diamètre et seulement proportionnellement au flux sanguin. En réponse à ces contraintes, l'endothélium synthétise et relargue différentes substances vasoactives, notamment l'oxyde nitrique (*NO, nitric oxide*). Ce gaz est synthétisé par l'eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*, et diffuse jusqu'aux CML adjacentes entraînant ainsi une vasodilatation (24).

2. Pathologies cardiovasculaires et troubles circulatoires

2.1. Épidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. On estime qu'en 2012, 17,5 millions de personnes en sont mortes, soit 30% de l'ensemble des décès dans le monde. Selon les estimations, 7,5 millions de ces décès sont dus aux cardiopathies coronariennes (affectant les artères coronaires) et 6,7 millions à l'AVC. On prévoit que, d'ici 2030, près de 23,6 millions de personnes mourront de maladies cardiovasculaires, principalement de cardiopathies et d'AVC (2). Selon les projections, ces affections resteront la première des causes de mortalité, malgré le déclin encourageant du taux de mortalité de ces maladies qui a été observé entre le 20^{ème} et le 21^{ème} siècle (70 à 75% de réduction dans des pays comme l'Australie, le Canada, la Finlande, la Suisse et la France) (25).

En Europe, plus de 4 millions de personnes décèdent de maladies cardiovasculaires chaque année (45% des décès totaux). Bien que le taux de mortalité de ces maladies augmente avec l'âge, 1,4 million des personnes âgées de moins de 75 ans en meurent (700 000 personnes pour les moins de 65 ans) (26).

2.2. Pathologies vasculaires les plus fréquentes

2.2.1. Athérosclérose, hyperplasie intimale et thrombose

L'athérogénèse est le développement d'une plaque athéromateuse au sein d'un vaisseau sanguin (Figure 4). L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique et systémique des artères qui est le plus souvent détectée trop tard car le rétrécissement des vaisseaux peut être asymptomatique (27). Tout d'abord, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion qui capturent des leucocytes (monocytes, lymphocytes T, mastocytes, etc.) et des plaquettes à leur surface. Ces molécules sont exprimées suite à des stimuli tels qu'une concentration trop importante en lipides (causée par de l'hypertension) qui va entraîner la présence de médiateurs pro-inflammatoires. Parallèlement, les changements dans l'endothélium permettent l'entrée et la rétention de particules additionnelles de cholestérol dans la paroi artérielle. Des médiateurs chimioattractants entraînent la migration des leucocytes surnuméraires dans l'intima et c'est alors que ces monocytes (globules blancs les plus nombreux dans les plaques athéromateuses) se différencient en macrophages qui absorbent les lipides (comme le cholestérol) pour devenir des cellules spumeuses (*foam cells*).

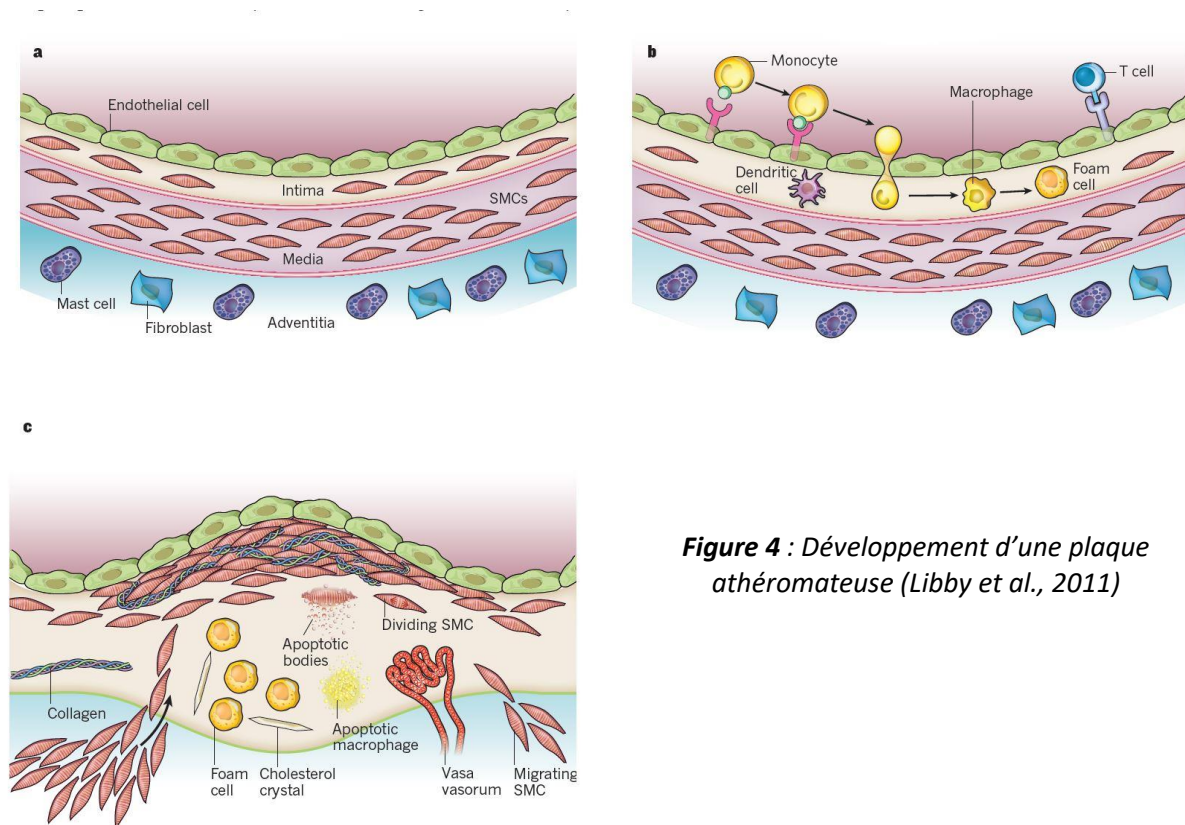


Figure 4 : Développement d'une plaque athéromateuse (Libby et al., 2011)

La formation de la plaque implique également le recrutement de CML de la média dans l'intima grâce à des médiateurs tels que le facteur de croissance dérivés des plaquettes (*PDGF, platelet-derived growth factor*). Ces CML produisent de la MEC et notamment du collagène, de l'élastine et des protéoglycanes pour former une chape fibreuse qui recouvre la plaque. La plaque athéromateuse, par l'accumulation de débris cellulaires, de lipides, de cellules apoptotiques et nécrotiques et de tissu fibreux, entraîne une réduction du diamètre interne du vaisseau et donc une sténose, limitant la circulation sanguine (4).

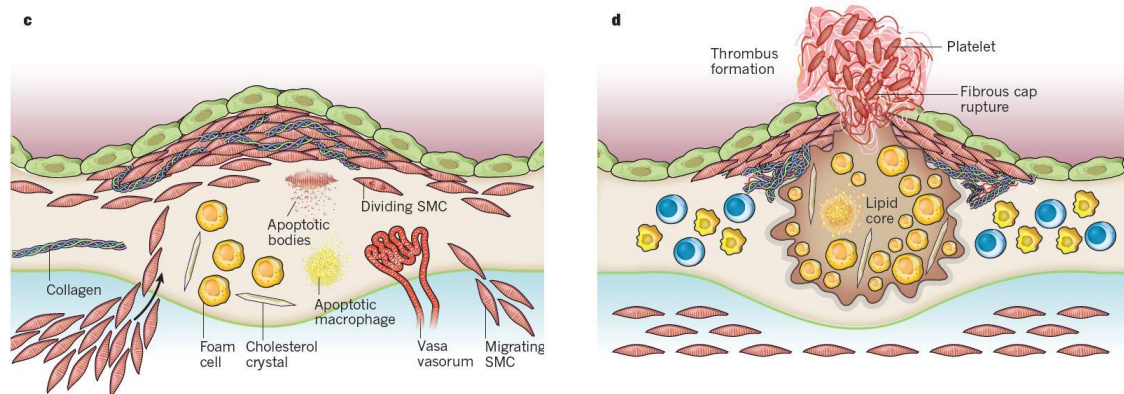


Figure 5 : Thrombose : rupture de la plaque athéromateuse et formation du thrombus (Libby et al., 2011)

La complication majeure et ultime de l'athérosclérose est la thrombose : elle est entraînée par une rupture physique de la plaque d'athérome par la fracture de la chape fibreuse (Figure 5). Cet évènement permet aux composants de la coagulation sanguine (comme la thrombine) (28) d'être en contact avec les facteurs tissulaires (protéines pro-coagulantes) contenus dans la plaque entraînant la formation d'un thrombus qui peut s'étendre dans la lumière du vaisseau et aboutir au blocage de la circulation sanguine. La formation du thrombus cause une ischémie et peut avoir lieu directement au site de rupture de la plaque ou entraîne une embolie distale. Si le blocage a lieu dans une artère coronaire, la thrombose va être à l'origine d'un infarctus du myocarde tandis que si le blocage a lieu dans une artère cérébrale, c'est un AVC qui va se déclencher (29).

Par ailleurs, la formation d'un thrombus peut trouver une autre origine : l'hyperplasie intimale (30). C'est un processus de remodelage pathologique dans lequel le diamètre du vaisseau sanguin diminue progressivement à cause de la migration et la prolifération des CML dans la région intimale du vaisseau. Cette réduction de la lumière favorise la formation d'un thrombus (31). De plus, cette pathologie est impliquée dans le processus de cicatrisation excessive qui a lieu suite à une intervention percutanée, entraînant une resténose (32). Elle est également fréquemment observée suite à la greffe d'un substitut vasculaire, notamment aux extrémités d'un greffon synthétique, et a pour conséquence une sténose (31).

2.2.2. Anévrisme

Un anévrisme est une dilatation anormale de la paroi vasculaire et dont le diamètre est supérieur à une fois et demie au diamètre normal (33). Les anévrismes ont souvent lieu dans l'aorte abdominale (90% des cas) mais peuvent aussi être localisés dans le thorax (34) ou le cerveau (35). Outre le risque de rupture et donc d'hémorragie (36), l'anévrisme induit la formation de thrombus par la perturbation du flux sanguin. Cette pathologie implique plusieurs processus : inflammation par infiltration leucocytaire (macrophages, neutrophiles, mastocytes, lymphocytes T et B), néo-vascularisation, micro-calcification et dégradation de la MEC de la média (collagène et élastine) par des protéases extracellulaires, perte de l'intégrité structurale de la paroi vasculaire, apoptose et senescence des CML (37).

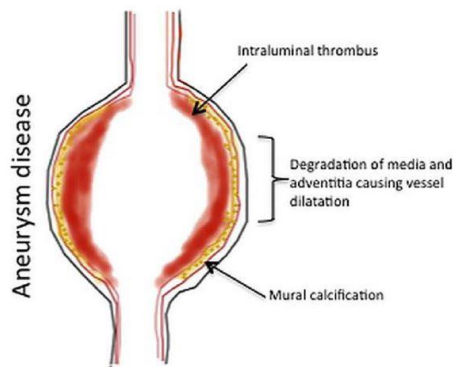


Figure 6 : Formation d'un anévrisme
(Forsythe et al., 2016)

Cette pathologie est souvent associée aux accès artério-veineux autologues pour les patients souffrant de maladie rénale en stade terminale (33). Dans ce cas, la cause est purement mécanique et due aux piqûres répétées (2 piqûres, 3 fois par semaine), nécessaires pour relier le patient à l'appareil d'hémodialyse, et typiquement faites avec des aiguilles de 15 à 17 G.

2.2.3. Dissection aortique

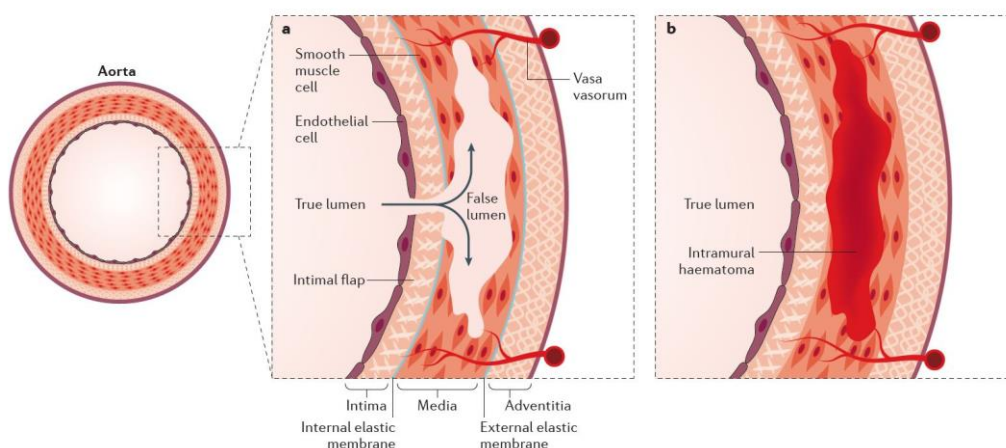


Figure 7 : Dissection aortique par déchirure de l'intima (a) ou rupture du vasa vasorum (b)
(Nienaber et al., 2016)

La dissection aortique est la déchirure de l'intima provoquant un écoulement dans les parois de l'aorte (un hématome), et notamment dans la média, et ayant pour conséquences de séparer l'intima de l'adventice (*Figure 7*). Cette séparation crée un mauvais chemin pour le sang qui continue de circuler dans la paroi aortique à travers une fausse lumière et qui peut s'étendre des deux côtés de la blessure initiale pour atteindre les artères proches. Dans la plupart des cas, la rupture intimale est primitive, permettant ainsi au sang de s'infiltrer dans la média. La dissection aortique peut également être secondaire à un hématome ou à un clivage de la média notamment par rupture du *vaso vasorum*. C'est une maladie souvent mortelle notamment lorsque la dissection atteint l'aorte ascendante (38). Elle est notamment à l'origine de tamponnade (compression des cavités cardiaques), d'insuffisance de la valve aortique et de malperfusion (ischémie d'un organe). Par ailleurs, un thrombus peut se former au niveau de la fausse lumière en cas d'inflammation (39).

2.3. Thérapies des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent une très lourde charge de santé publique et financière à travers le monde. Pour faire face à ces pathologies, plusieurs stratégies peuvent être mises en place. Tout d'abord, un changement de style de vie permet de réduire l'occurrence et notamment grâce à l'arrêt du tabagisme, un régime alimentaire équilibré (limité en graisses, sucres et sel), une augmentation de l'activité physique et une réduction de la consommation d'alcool (3). Dans certains cas, des traitements médicamenteux sont administrés tels que des bêtabloquants ou des hypolipémiants de la famille des statines (40).

Pour des stades plus avancés de la maladie, des techniques curatives sont mises en place. L'endartériectomie consiste à retirer la plaque athéromateuse qui bouche la carotide. Par ailleurs, l'angioplastie (*Figure 8*) est souvent accompagnée par la mise en place d'une endoprothèse métallique (*stent*) : elle consiste à placer un ballonnet gonflable à l'intérieur du vaisseau obstrué afin d'aplanir et de compresser la plaque puis d'installer une endoprothèse métallique afin de le maintenir ouvert (41).

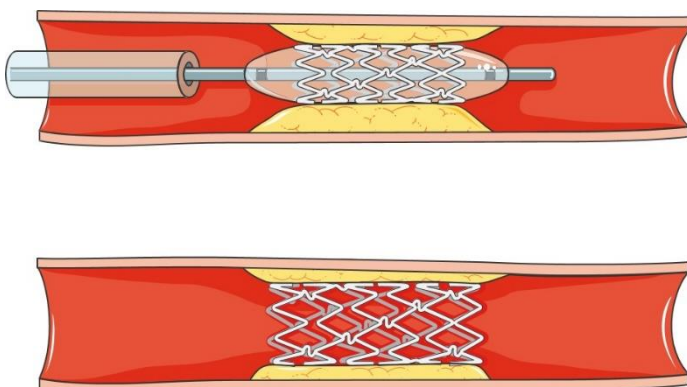


Figure 8 : Angioplastie et mise en place d'une endoprothèse métallique (*stent*) (Servier)

Malheureusement, un nouveau rétrécissement de la paroi artérielle peut avoir lieu (resténose due à un remodelage prolifératif) malgré les différentes stratégies mises en place pour pallier ce problème (5). Parmi elles, l'utilisation de *stent* à élution médicamenteuse a été proposée (42) (43). Comme traitement de deuxième ligne, un pontage peut être réalisé afin de contourner le blocage. Cette revascularisation consiste à prélever une veine ou préférentiellement une artère dans le corps du patient où les vaisseaux sanguins sont moins affectés (6). Bien que ce pontage autologue soit considéré comme la procédure standard pour la revascularisation, la disponibilité en greffons autologues adaptés est limité à cause de la progression de la maladie et du nombre répété de procédures. Face à ce manque de vaisseaux autologues, des alternatives ont été mises en place grâce à l'utilisation de plusieurs types de substituts vasculaires. Cette stratégie sera détaillée dans la partie suivante (II. Substituts vasculaires).

3. Cas particulier : fistule artério-veineuse

D'après l'Association Française d'Urologie, une fistule artério-veineuse consiste à détourner une veine sur un réseau artériel, à l'aide ou non d'une prothèse synthétique, d'un des bras du patient atteint d'insuffisance rénale chronique au stade terminal. Cette fistule est souvent réalisée pour connecter l'artère radiale à la veine céphalique, l'artère brachiale à la veine céphalique ou encore l'artère brachiale à la veine basilique. Cette procédure est réalisée afin d'augmenter le débit sanguin (environ 1 L/min) (44) dans la veine choisie pour réaliser une hémodialyse. Celle-ci consiste à dériver le sang pour qu'il soit filtré dans une machine afin d'éliminer les déchets. Pour cela, deux ponctions à l'aide d'aiguilles sont réalisées trois fois par semaine, l'une amenant le sang vers la machine et l'autre restituant le sang filtré au corps du patient. Une maturation de la veine est nécessaire afin qu'elle s'artérialise et résiste à l'augmentation importante de la pression et du flux sanguin (45).

Pour la création d'une fistule artério-veineuse, les artères doivent avoir un diamètre minimal de 2 mm, un débit sanguin supérieur à 500 ml/min et les veines doivent avoir un diamètre d'au moins 2,5 mm. Si les veines du bras ne permettent pas d'avoir une longueur suffisante, les veines fémoro-poplitées peuvent être transférées dans le bras du patient (46). Le taux de perméabilité primaire (délai entre la création et la première intervention pour maintenir ou rétablir la perméabilité de l'abord vasculaire) est de 65% pour une fistule radio-céphalique et de 87% pour une fistule brachio-céphalique (47).

En cas d'échec de la fistule, dû à une sténose, une thrombose, une infection ou un anévrisme, un accès vasculaire d'hémodialyse est réalisé par pontage entre une veine (diamètre minimal requis de 4 mm (46)) et une artère grâce à une prothèse synthétique (*Figure 9*) (48). Dans une étude de 2002 sur les différentes procédures utilisées aux Etats-Unis dans le cadre de la création d'un abord vasculaire, 28% des patients avaient une fistule artério-veineuse autologue tandis que 49% d'entre eux possédaient un greffon synthétique. Les 23% restant disposaient d'un cathéter permanent. Parmi les abords vasculaires créés par pontage synthétique, le taux d'occlusion à 3-4 ans était de 50% (49). Les différents greffons utilisés pour cette application seront détaillés dans la partie suivante (II. Substituts vasculaires).

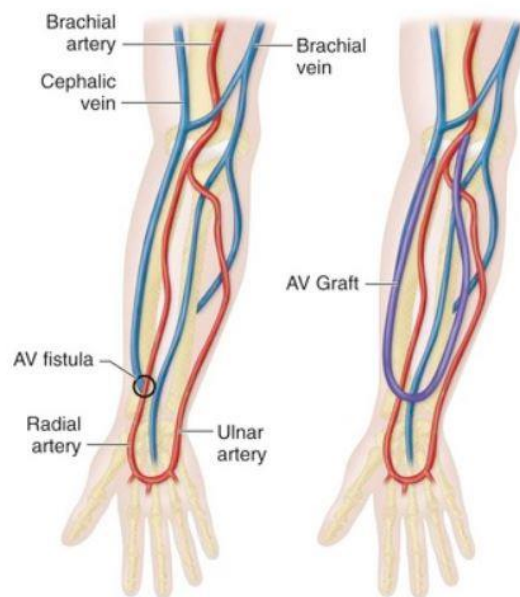


Figure 9 : Création d'une fistule artério-veineuse avec ou sans greffon (<https://clinicalgate.com/hemodialysis-fistulas/>)

III. SUBSTITUTS VASCULAIRES

Malgré l'évolution constante des endoprothèses métalliques, un substitut vasculaire peut être utilisé pour remplacer ou contourner un dommage ou une occlusion dans un vaisseau sanguin. En effet, cette procédure semble être l'option optimale pour des patients ayant besoin de solutions de revascularisation après plusieurs échecs de thérapies endovasculaires. Elle s'applique à deux types d'artères : des artères de gros et moyen calibre pour la chirurgie de l'aorte jusqu'aux artères fémorales, et des artères de petit calibre, pour la chirurgie de revascularisation sous-inguinale, des artères viscérales et des troncs supra-aortiques. Ces substituts vasculaires peuvent être de plusieurs natures et seront détaillés ci-après.

1. Substituts biologiques

1.1. *Greffons autologues*

Les greffons autologues, ou autogreffons, sont des artères et des veines du patient lui/elle-même et sont les substituts vasculaires de premier choix.

Le pontage veineux autologue a été réalisé pour la première fois en 1949 par Kunlin à l'aide d'une veine saphène (50). A ce jour, ce substitut est le plus utilisé pour des pontages sur des artères de petit calibre et notamment pour les chirurgies coronariennes (6). Malgré tout, 10 à 20% des greffes de veine saphène échouent un an après la revascularisation à cause de thrombose sur le greffon ou sur le réseau artériel d'aval, de sténose hyperplasique à 70% ou plus, ou d'un rétrécissement de la lumière étendu. A 10 ans, seulement la moitié de ces greffons seront encore perméables et parmi celles-ci, 50% présenteront des signes d'athérosclérose (51). La supériorité du greffon veineux autologue par rapport aux autres matériaux est principalement attribuée à sa surface luminale endothélialisée, une diminution du risque d'infection et à sa disponibilité par rapport aux autres vaisseaux autologues. L'utilisation des veines fémoro-poplitées autologues a également été proposée dans le cadre d'un pontage infra-inguinal et montre des résultats similaires à ceux de la veine saphène (52).

L'autogreffon artériel constitue théoriquement le substitut artériel idéal du fait de ses caractéristiques mécaniques, de ses capacités de cicatrisation, et de ses très bons taux de perméabilité 10 ans après une opération (90 à 95% de perméabilité) (53).

Cependant, son utilisation est limitée par le nombre réduit des sites de prélèvement. En effet, les artères les plus utilisées sont l'artère thoracique interne (autrement appelée, artère mammaire interne) et l'artère radiale (54). L'artère thoracique interne développe rarement de l'athérosclérose ce qui explique ses excellents résultats de perméabilité à long terme (55). Pour autant, lorsqu'elle est utilisée comme pontage coronarien, elle a des risques élevés d'occlusion précoce (56).

Les substituts autologues peuvent induire une morbidité significative du site donneur, surtout dans le cas des veines saphènes, et ne sont pas toujours disponibles, notamment en fonction de l'état de santé du patient. L'utilisation d'allogreffons issus de donneurs décédés ou de xéno-greffons a été développée comme une alternative possible.

1.2. Allogreffons et xéno-greffons

Bien que les vaisseaux autologues soient les substituts de premier choix, des allogreffes ou même des xéno-greffes peuvent être envisagées. Elles sont également utilisées lors d'infections des greffons synthétiques. Les allogreffons peuvent être : stockés à froid, cryopréservés, fixés (57) ou encore décellularisés (58). Cette dernière stratégie est plus rare, aucun effort sérieux n'ayant été mis en place par les industriels pour pallier l'utilisation des greffons fixés.

Le stockage à 4°C dans une solution saline supplémentée par des antibiotiques (par exemple, pour les veines saphènes, Bioprotec SAS, France) et la cryopréservation permettent d'utiliser des veines de patients décédés ou de donneurs vivants. Cette technique est majoritairement utilisée pour des veines saphènes prélevées lors du traitement chirurgical des varices. Bien que cette technique soit bien établie (59) et commercialement disponible grâce à l'existence de banques de tissus (par exemple, pour les veines fémorales, CryoLife, GA), elle reste source de problèmes. En effet, elle peut provoquer des dommages cellulaires et une perte de la fonctionnalité de l'endothélium (60).

La veine ombilicale humaine réticulée à la glutaraldéhyde a également été envisagée de par sa bonne disponibilité et de par la capacité du traitement par fixation à masquer les antigènes (par exemple, Dardik-biograft®) (61). Malgré des résultats décevants obtenus dans les premières utilisations de ces greffons, des améliorations ont été apportées et ont permis de montrer une amélioration des taux de perméabilité dans le cadre de revascularisation des extrémités inférieures.

Par ailleurs, d'après une étude de 2002, les problèmes de dilatation (21%) et de formation d'anévrismes (36%) précédemment observés ont été résolus (62).

Parallèlement aux substituts allogéniques, les xéno greffes se sont développées. Le xéno greffon, préparé à partir d'artères carotides de bœuf ou de veau traitées à la ficine puis réticulées, est le premier exemple de substitut artériel d'origine bovine (63). Une étude récente à long terme pour une application de reconstruction artérielle d'une extrémité inférieure a montré des résultats très encourageants et similaires à ceux obtenus lors de l'utilisation d'une veine autologue. En effet, les perméabilités primaire et secondaire à 5 ans étaient de 66,7% et 74,6% respectivement et le taux de sauvetage de membres était de 81% (64).

La veine mésentérique bovine a également été utilisée et commercialisée sous le nom de ProCol® (Le Maître Vascular) (65). Comme énoncé précédemment, la réticulation par fixation à la glutaraldéhyde est la procédure standard utilisée pour masquer les composants immunoréactifs des tissus. Malheureusement, ce traitement n'est pas bénin et altère les propriétés de cicatrisation du tissu, entraîne de la calcification et augmente les taux d'obstruction (66), entraîne de la cytotoxicité et peut déclencher des réponses inflammatoires importantes s'il est incomplet (67).

Pour améliorer l'utilisation des xéno greffons, sans avoir recours à la fixation du tissu, différentes techniques de décellularisation (enzymatiques, physiques ou chimiques (68)) ont été optimisées afin d'enlever les composants immunogéniques du tissu et ainsi éviter le rejet du greffon (69). Cette technique préserve les propriétés mécaniques de la greffe tout en réduisant son immunogénicité (70). L'urètre bovine a par exemple été utilisée décellularisée en 2003 (SynerGraft® model 100), pour son potentiel en tant que conduit vasculaire. En effet, elle a une longueur suffisante, un diamètre constant et ne présente pas de valve. Le processus de décellularisation n'a pas affecté les fortes propriétés mécaniques du tissu et des cellules (myofibroblastes et cellules endothéliales) ont recolonisé l'implant après l'avoir greffé. Néanmoins, la perméabilité du substitut était plus faible que pour des greffons synthétiques et des anévrismes importants se développaient (71).

2. Substituts synthétiques permanents

2.1. PTFE : polytetrafluoroethylene

Des greffons synthétiques ont été développés avec des matériaux biologiquement très inertes et présentant de bonnes propriétés mécaniques. Le *polytetrafluoroethylene* (PTFE) a été déposé par Dupont en 1937 sous le nom de Teflon® et le PTFE expansé (*ePTFE*) par Gore en 1969 sous le nom de Gore-Tex®.

Après chauffage, extrusion et étirement du PTFE, un tube poreux stable est obtenu avec une forte résistance mécanique et une surface chargée négativement afin de minimiser la réaction avec les composants sanguins (72). Afin d'améliorer leur perméabilité, des molécules d'héparine ont été déposées sur la surface luminale du greffon par liaison covalente. Ce greffon est commercialement disponible sous le nom de Propaten® depuis 2006 comme abord vasculaire d'hémodialyse (73).

2.2. PET : polyethylene terephthalate

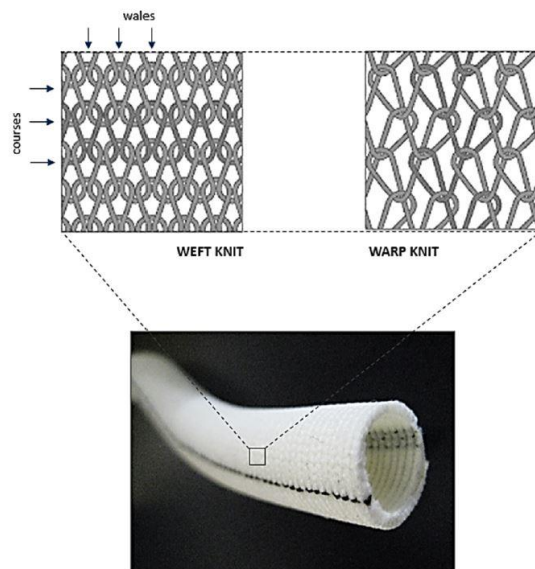


Figure 10 : Design structurel de Dacron® tricoté
(Singh et al., 2015)

Le *polyethylene tetraptalate*, plus connu sous le nom de Dacron®, a été déposé par Dupont en 1950 et constitue une résine de polyester thermoplastique utilisée sous forme de fibres synthétiques (74). Ces fibres sont regroupées en multifilaments qui sont ensuite tissés ou tricotés pour obtenir un tube avec une grande stabilité mécanique (*Figure 10*). Le Dacron® est imprégné depuis la fin des années 80 avec du collagène (75) et par la suite, avec de l'albumine ou de la gélatine pour diminuer la porosité transmurale et le rendre plus imperméable (72).

2.3. Gros vs petit calibres

Dans le cadre d'une occlusion artérielle chronique, la technique percutanée d'angioplastie, décrite pour la première fois en 1990 (76), couplée ou non à la pose d'une endoprothèse métallique, est la première solution envisagée. En effet, cette technique est peu invasive tant sur le plan chirurgical que sur la vie du patient. En cas d'échec, et si la lésion est trop étendue (77), un pontage peut être effectué (78).

Comme évoqué précédemment, si les propres vaisseaux du patient ne sont pas disponibles, des greffons synthétiques seront alors utilisés (*Table 1*). Généralement, le Dacron® est utilisé pour les vaisseaux de gros calibres, supérieur à 8 mm, (remplacements aortiques) et l'*ePTFE* pour des diamètres inférieurs, entre 6 et 8 mm (par exemple, pour des pontages fémoro-poplités). (72).

Les taux de perméabilité à long terme de ces greffons sont satisfaisants dans les artères de gros diamètre (>8mm) puisque la thrombogénicité qui peut avoir lieu est surmontée par un flux sanguin très important ou par des thérapies anti-coagulantes. Par exemple, la perméabilité à 5 ans des substituts aorto-iliaques est de 90% (79). En ce qui concerne les pontages d'artères de moyen calibres (6-8 mm), comme les artères carotidiennes et fémorales, les résultats sont similaires entre les greffons synthétiques et autologues (80). Par contre, pour les vaisseaux de petits diamètres (<6mm), comme les artères coronaires, infra-inguinales et infra-géniculées, les prothèses vasculaires synthétiques présentent des résultats de perméabilité à long terme insuffisants et largement inférieurs aux substituts autologues. En effet, lors d'un pontage coronarien, plusieurs études ont montré un taux de perméabilité à 1 an de 60% pour du *PTFE* alors qu'il était de 95% pour une veine saphène. A 2 ans, la perméabilité du vaisseau autologue ne variait pas tandis que celle du *PTFE* chutait à 32% (81) (82) (83). Une étude de 2008 a également montré que, dans le cadre d'un pontage fémoro-poplité, la perméabilité primaire à 5 ans d'une veine saphène autologue était de 76,6% tandis qu'elle était de 59,1% pour les greffons synthétiques (84).

Ainsi, pour les vaisseaux de petits calibres, les substituts synthétiques sont utilisés uniquement si aucun autre substitut autologue approprié n'est disponible (72).

Table 1 : *Substituts vasculaires utilisés en clinique (Chlupa et al., 2009)*

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

ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene), PU (polyurethane), TEBV (totally-engineered blood vessels).

Bien que des améliorations aient été apportées pour augmenter la perméabilité des substituts synthétiques par ensemencement de cellules endothéliales autologues (85) ou modification de surface (86) (87) (88), ces greffons ne permettent pas de dépasser les performances des substituts autologues.

Une étude clinique publiée en 2009 a permis de suivre à long terme la perméabilité de greffons synthétiques (*ePTFE*) endothélialisés *in vitro* avec des cellules autologues implantés chez 100 patients dans le cadre d'une reconstruction infra-inguinale (85). Brièvement, un segment de veine (jugulaire externe droite ou veine céphalique), du patient lui-même, de 4 à 5 cm était récupéré afin de récolter les cellules endothéliales de la surface luminale. Celles-ci étaient cultivées au sein du greffon synthétique de 6 mm de diamètre et de 60-70 cm de long, préalablement recouvert de colle de fibrine, pendant 8-12 jours. La croissance des cellules a échoué dans environ 30% des cas. La perméabilité à 9 ans était de 69% alors qu'elle était seulement de 16% pour le contrôle non-endothérialisé. Par ailleurs, aucun greffon ne présentait de signe d'infection.

La réponse de l'hôte après implantation chez l'humain des greffons synthétiques se compose en plusieurs phases. La première étape consiste à une adsorption/désorption des protéines plasmatiques au niveau de l'interface matériau/sang. Par la suite, les plaquettes, les leucocytes et les érythrocytes vont venir adhérer. Une fine couche de fibrine riche en plaquettes se développe au cours du temps et aucune endothélialisation n'a lieu. En effet, chez l'humain, les prothèses vasculaires ne permettent pas la régénération d'un endothélium, même après des décennies d'implantation, exceptée une migration transanastomotique des cellules endothéliales sur une distance d'environ 3

mm (89). Bien que cela n'affecte pas la performance clinique des substituts de gros calibre, elle contribue de manière significative au taux d'échec élevé des substituts de petit calibre. En revanche, chez l'animal, et chez les babouins pour des substituts synthétiques de gros diamètre (90), une endothélialisation spontanée des prothèses vasculaires est observée (voir *review* (91)). Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer l'endothélialisation des greffons vasculaires : ensemencement de cellules endothéliales *in vitro* avant implantation (chez l'humain), migration de cellules endothéliales adjacentes provenant du vaisseau natif ou de la colonisation transmurale, déposition de cellules progénitrices endothéliales au niveau de la lumière (92). Ainsi, l'utilisation de modèles animaux peut être critiqué, pour la validation de nouveaux substituts vasculaires.

Bien que ces deux dernières hypothèses ne soient pas observées pour des greffons synthétiques, aucune donnée clinique ne permet de conclure quant au potentiel d'endothélialisation des vaisseaux autologues. Néanmoins, compte tenu des dommages causés lors de leur récupération (93) (94) ou lors de la pose d'un stent (95), les très bons résultats de perméabilité obtenus pour ces vaisseaux suggèrent une endothélialisation spontanée. En effet, si l'endothélium endommagé n'était pas réparé, de la thrombose aurait lieu et entraînerait un échec du pontage. Par ailleurs, une étude de 2016 a montré un marquage CD31 positif au niveau de la lumière du milieu d'un greffon acellulaire biologique issu de l'ingénierie tissulaire, implanté chez l'humain pendant 44 semaines en tant qu'abord vasculaire d'hémodialyse, suggérant la présence d'un endothélium (96).

Les mauvais résultats des greffes synthétiques sont dus à l'inflammation, la thrombose, l'hyperplasie intimale, la discordance de compliance et de diamètre avec le vaisseau natif et le risque d'infection (72). Des thérapies anticoagulantes ont été mises en place pour pallier la thrombogénicité des greffons synthétiques de gros et moyen calibres et montrent de bons résultats : la perméabilité à 5 ans est similaire à celle des vaisseaux autologues. Pour autant, ces résultats sont largement insuffisants pour des vaisseaux de petits diamètres. En effet, une étude de 2016 basée sur les résultats de 13 publications montre que les taux de perméabilité pour les greffons synthétiques pour des pontages dans les membres inférieurs sont de 44-62% alors qu'ils sont de 71-75% pour les pontages autologues (*Figure 11*) (97).

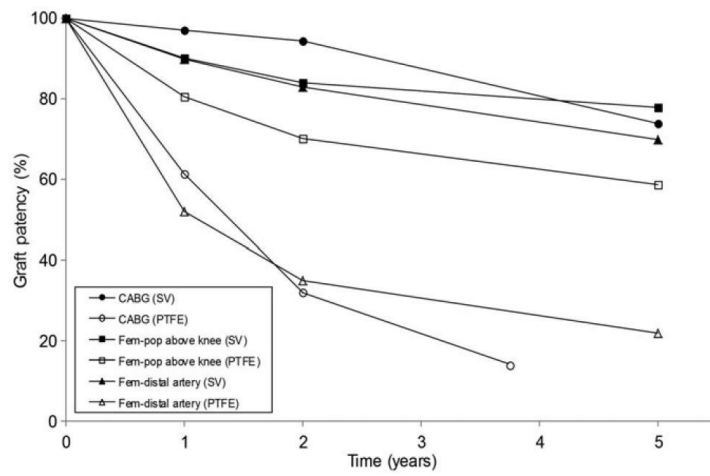


Figure 11 : Taux de perméabilité de substituts vasculaires biologiques et synthétiques.
 SV : veine saphène, CABG : pontage coronaire (Pashneh-Tala et al., 2015)

IV. SUBSTITUTS VASCULAIRES ISSUS DE L'INGÉNIERIE TISSULAIRE

1. Introduction de l'ingénierie tissulaire

Comme décrit précédemment, le remplacement vasculaire de petit calibre présente actuellement des limites. En effet, la faible disponibilité des vaisseaux biologiques et les problèmes liés à l'implantation de substituts synthétiques nécessitent le développement de nouvelles stratégies. L'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire qui lie les principes d'ingénierie et de biologie pour le développement de substituts biologiques dans le but de restaurer ou d'améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe complet et ainsi pallier l'insuffisance des biomatériaux existants (98).

C'est une discipline qui regroupe trois éléments : un biomatériau d'origine synthétique ou biologique, biodégradable ou non, des cellules avec un fort potentiel réparateur (pluripotentes, multipotentes, différenciées) et des biomolécules comme les facteurs de croissance ou les cytokines (Figure 12) (99).

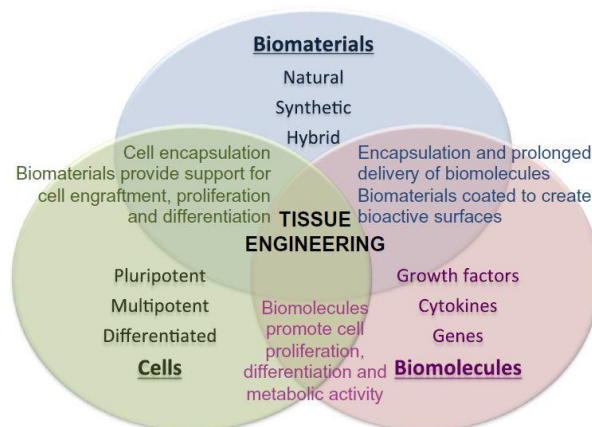


Figure 12 : Composantes de l'ingénierie tissulaire (Simon-Yarza et al., 2017)

Les cellules peuvent être prélevées chez le patient ou chez un donneur, amplifiées et/ou différenciées en culture *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure peut alors être cultivée ou non sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour stimuler la synthèse d'une MEC par les cellules elles-mêmes. Enfin, après maturation, ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient. Il assure un support structurel et mécanique aux cellules qui le coloniseront.

Cette notion a beaucoup évolué au cours du temps et plusieurs approches ont été développées pour la production de substituts vasculaires par ingénierie tissulaire. Cette stratégie apporte des solutions alternatives innovantes pour le remplacement de vaisseaux de petits calibres.

On distingue 4 stratégies d'élaboration : utilisation d'un échafaudage exogène (synthétique permanent ou biodégradable, naturel ou hybride), utilisation de matrices biologiques décellularisées, la technique d'auto-assemblage (MEC synthétisée par des cellules cultivées *in vitro*, agrégation de micro tissus, bio-impression) et enfin l'utilisation du corps comme bioréacteur.

2. Utilisation d'un échafaudage exogène

L'utilisation d'un échafaudage en ingénierie tissulaire possède plusieurs avantages : présence d'un support physique structurel permettant aux cellules de reposer sur un guide pendant leur prolifération et leur colonisation du tissu, rôle mécanique, définition d'une forme finale précise, reproductibilité, implantation plus rapide. Plusieurs types d'échafaudages sont utilisés à ce jour.

2.1. Échafaudage synthétique biodégradable

Une large variété de polymères et de copolymères a été testée et les plus utilisés sont les polyesters dégradables comme l'acide polyglycolique (*PGA, polyglycolic acid*), l'acide polylactique (*PLA, polylactic acid*), l'acide poly-L-lactique (*PLLA, poly-L-lactic acid*), leurs copolymères poly(lactide-co-glycolide) (*PLGA*) et le polycaprolactone (*PCL*). Il existe également des élastomères bio-absorbables tels que les polyuréthanes (*PU*) et le poly(glycérol-sebacate) (*PGS*) (100).

En 2006, Hoerstrup *et al.*, ont utilisé du *PGA* non tissé, assemblé par une technique de soudage par application de chaleur, et enrobé avec une fine couche de poly-4-hydroxybutyrate, sur lequel était ensemencé des myofibroblastes et des cellules endothéliales. Après 21 jours de culture en conditions biomimétiques, les constructions étaient implantées en tant que pontage cardiopulmonaire chez 14 agneaux. Après 100 semaines d'implantation, les résultats ne montraient pas de formation de thrombus, de calcification, de sténose ou même d'anévrisme. Le diamètre des greffons avait augmenté de 30% (par rapport au diamètre de 15 à 20 mm mesuré après 20 jours d'implantation), bien que les propriétés mécaniques étaient satisfaisantes (résistance à la traction d'environ 2 MPa tandis que le tissu natif avait une valeur inférieure à 0,5 MPa) (101). Plus récemment, ces auteurs ont montré

l'importance des métalloprotéinases dans le remodelage et la fonctionnalité des substituts vasculaires (102).

In Jeong *et al.*, ont utilisé en 2007 des fibres de *PLGA* électrospinnées associées à du collagène de méduse (comme alternative aux collagènes bovins et porcins couramment utilisés, afin d'éviter les risques liés aux maladies transmissibles de ces deux espèces). Cette stratégie a permis d'obtenir un échafaudage tubulaire sur lequel des CML et des cellules endothéliales, extraites d'aortes de lapins, ont étéensemencées et cultivées dans un bioréacteur pulsatile perfusé pendant 14 jours. Ce substitut montrait de bonnes propriétés mécaniques : les fibres de *PLGA* permettaient d'augmenter la résistance à la traction par rapport à l'échafaudage de collagène seul. En effet, les valeurs étaient de $0,14 \pm 0,02$ MPa pour le substitut hybride alors qu'elles étaient de $0,06 \pm 0,01$ MPa pour le collagène seul. Par ailleurs, un alignement des cellules était observé sur la surface luminale de l'échafaudage (103).

En 2008, une autre approche consistait à utiliser une combinaison de deux polymères, le *PGA* et le *PLLA* ainsi qu'une éponge de collagène (collagène de type I bovin) réticulée à la glutaraldéhyde afin d'obtenir des greffons vasculaires de petits diamètres (4 mm) directement implantés dans des artères carotidiennes de 24 chiens sans ensemencement cellulaire préalable. Après 12 mois d'implantation, tous les substituts étaient non obstrués et ne présentaient pas de signes anévrismaux. Par ailleurs, les cellules de l'hôte avaient recolonisé le conduit vasculaire puisque les analyses histologiques montraient une monocouche de cellules endothéliales, des CML ainsi que des fibres de collagène et d'élastine. Par contre, la force mécanique du substitut diminuait après implantation jusqu'à se stabiliser au niveau des valeurs de l'artère native (104).

Des échafaudages en polyuréthanes de 10 mm de longueur ont également été mis au point et implantés dans l'aorte abdominale de 42 rats pendant 8 semaines. Cette trame de poly(ester urethane)urea (*PEUU*) de 1,2 mm de diamètre interne a étéensemencée avec des cellules souches dérivées de muscles pendant 48h. Les résultats ont montré que la présence des cellules augmentait de manière significative le taux de perméabilité des greffons et que la présence d'un échafaudage permettait d'éviter la formation d'anévrismes (105).

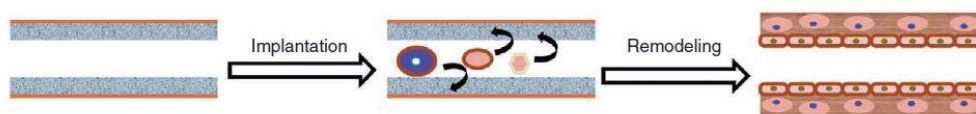


Figure 13 : Principe schématique du remodelage par infiltration cellulaire des cellules de l'hôte (Wu *et al.*, 2012)

Récemment, un élastomère avec une propriété de dégradation rapide (*PGS*) a été utilisé dans une étude chez le rat afin d'obtenir des substituts de 720 μm de diamètre interne, implantés dans l'aorte abdominale. Les auteurs n'ont pas utilisé d'ensemencement cellulaire se basant sur le remodelage rapide par les cellules de l'hôte au fur et à mesure de la dégradation du matériel par infiltration cellulaire (*Figure 13*). En effet, 3 mois après implantation, les néo-artères formées ressemblaient aux artères natives montrant un endothélium confluent, des couches de CML contractiles, l'expression de protéines de la MEC ainsi que des propriétés mécaniques satisfaisantes (paroi du greffon mécaniquement forte et compliant avec une valeur de $11 \pm 2,2\%$ comparable à celle de l'aorte native $6,7 \pm 2,3\%$, pression à l'éclatement de 2360 ± 673 mmHg en comparaison à 3415 ± 529 mmHg pour une aorte native) (106).

Dernièrement, Chan *et al.* ont proposé l'utilisation de *PCL* acellulaire comme échafaudage pour le remplacement de carotide de souris pendant 28 jours. Les analyses histologiques ont montré une augmentation de la quantité de collagène et des CML dans l'intima nouvellement formée (107). Parallèlement en 2017, Ong *et al.* développaient des greffons vasculaires de petits diamètres pour la mise en place de pontage bilatéral carotidien artério-veineux chez la brebis, forts de la réussite de leur approche dans des vaisseaux de gros calibres (108). Elle consiste à obtenir un support de *PGA/PCL* de 5 mm de diamètre interne par co-électrospinning. Ce modèle a montré de bons résultats en terme de perméabilité (66%) et d'endothélialisation de la lumière 4 semaines après implantation, mais entraîne une dilatation à cause d'un contenu insuffisant en élastine (108).

Deux équipes ont mené l'implantation de substituts synthétiques biodégradables en clinique. La première implantation d'un substitut vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire chez l'humain revient à l'équipe de Shinoka. En 2005, ces chercheurs ont publié une étude sur les résultats cliniques à moyen terme d'un substitut vasculaire de 12 à 24 mm de diamètre obtenu à partir d'un échafaudage de *PLLA* et d' ϵ -caprolactone renforcé par du *PGA*. Des cellules de la moelle osseuse du patient étaient ensemencées sur cet échafaudage qui était ensuite implanté en tant que connexion cavo-pulmonaire extracardiaque (flux élevé et basse pression). Les patients avaient reçu un traitement anticoagulant pendant 3 à 6 mois après l'opération et les substituts ne montraient pas de thrombose, de sténose, de calcification ou de formation d'anévrisme. Après explantation, une dégradation complète de l'échafaudage était observée et un remodelage cellulaire était notable avec la formation d'une paroi de CML et une couche de cellules endothéliales (109) (110).

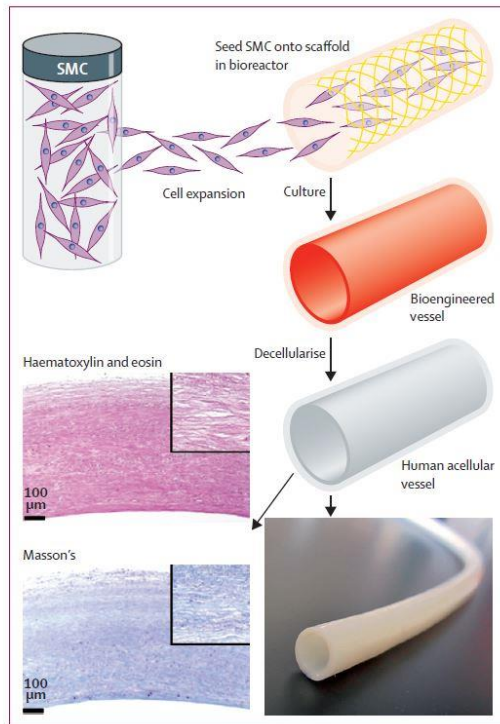


Figure 14 : Approche de Niklason. Des cellules musculaires lisses (SMC) allogéniques sont ensemencées sur un échafage de PGA et cultivées dans un bioréacteur. Après maturation, le substitut créée est décellularisé par traitement chimique (Lawson et al., 2016)

Parmi toutes ces études, l'équipe de Niklason s'est largement démarquée des autres. En effet, dès 1997, Niklason et Langer créaient un greffon vasculaire de petit diamètre (3,1 mm) à l'aide d'un support en *PGA* ensemencé avec des CML vasculaires. Ce substitut a été cultivé pendant 8 semaines dans un bioréacteur pulsatile afin de permettre une maturation complète et un dépôt de collagène (111). Ces constructions montraient une pression à l'éclatement de 2150 mmHg (112) et ont été testées dans plusieurs modèles animaux. Une perméabilité de 100% après 24 jours d'implantation chez le chien a été démontrée (88% après 6 mois chez le babouin) (113).

Ces résultats prometteurs ont permis de commencer une étude clinique en 2012 dans laquelle des substituts de *PGA* de 6 mm de diamètre et de 35 à 42 cm de long, ensemencés avec des CML vasculaires allogéniques, maturés en bioréacteur puis décellularisés par traitement chimique, (*Figure 14*) étaient implantés en tant qu'abord vasculaire chez des patients atteints de maladie rénale en stade terminale, sans ensemencement de cellules endothéliales au préalable (96). La décellularisation, par une solution détergente de *SDS* (*sodium dodecyl sulfat*)/*CHAPS* (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate), a permis d'enlever les antigènes cellulaires immunogéniques tout en conservant les protéines de la MEC non-immunogéniques telles que les collagènes I et III, la fibronectine et la vitronectine. Cette double étude de phase II impliquait 60 patients avec une durée de suivi moyenne de 16 mois, période pendant laquelle 4 patients sont décédés sans aucune relation avec l'échec de la greffe. Par ailleurs, aucune formation d'anévrisme ou de réponse immunitaire n'a été observée et 63% des substituts étaient perméables à 6 mois tandis

que seulement la moitié l'était toujours à 12 mois, résultant en de nombreuses interventions de thrombectomie.

L'utilisation d'échafaudages synthétiques biodégradables a été la méthode la plus étudiée pour la production de substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire. En effet, leur coût de production est relativement faible, ils permettent un bon contrôle des différentes propriétés du substitut (diamètre, forme, porosité, etc.). Néanmoins, les temps de production sont souvent longs et associés à des périodes de culture cellulaire *in vitro* très étendues, constituant une barrière pour des applications cliniques.

2.2. Échafaudage naturel

Face au manque de bio-activité des échafaudages synthétiques biodégradables, les études impliquant des polymères naturels basés sur des protéines de la MEC ont émergé. En effet, ces protéines ont pour avantage d'avoir des sites de liaison « normaux » pour permettre l'adhésion et les fonctions cellulaires. De ce fait, elles ont des propriétés biomimétiques et biocompatibles, réduisent la réponse immunitaire inflammatoire et stimulent la prolifération et la colonisation des cellules de l'hôte. De plus, elles peuvent facilement être métabolisées lors de la dégradation par les enzymes endogènes sans entraîner d'effets indésirables. Les plus utilisées sont le collagène, la gélatine, l'élastine et la fibrine. Pour produire des structures avec ces solutions de protéines, plusieurs procédés de fabrication ont été développés tels que l'électrospinning, la congélation-séchage et le moulage (100). Par ailleurs, la fibroïne de soie et le chitosane, bien qu'ils ne soient pas des composants de la MEC, sont des molécules biologiques utilisées en ingénierie tissulaire.

Récemment, le collagène a été utilisé afin d'obtenir un tube de forte densité pour pallier les faibles propriétés mécaniques liées aux utilisations précédentes de gels de collagène, notamment dans l'étude pionnière de Weinberg et Bell en 1986 (114). Ces auteurs ont reconstruit *in vitro* les 3 couches d'un vaisseau grâce à l'isolation et la culture de cellules endothéliales, de CML et de fibroblastes aortiques bovins avec du collagène. Déjà, des valeurs de pression à l'éclatement de 323 ± 31 mmHg étaient obtenues. Récemment, Li *et al.* ont séché et réticulé par immersion dans la génipine du collagène de type I issu de queue de rat afin de permettre la suturabilité du tube formé (diamètre inférieur à 1 mm) sur une artère fémorale de rat explantée, ainsi que d'améliorer sa résistance à la pression artérielle (pression à l'éclatement d'environ 1313 mmHg). Bien que la force des anastomoses à l'interface entre l'artère fémorale de rat et le substitut vasculaire ($81,9 \pm 20,6$ gf) restait toujours plus

faible qu'une anastomose entre deux artères natives ($132,1 \pm 19,9$ gf), cette étude constituait une réussite car elle représentait la première étude à partir de gel de collagène capable d'être suturé en microchirurgie (115).

La fibroïne de soie est une répétition de structures secondaires en feuillets beta lui conférant une grande résistance grâce aux nombreuses liaisons hydrogènes. Mais ces liaisons sont faibles et faciles à rompre donc apportent également de la flexibilité à la fibre. Ces propriétés font donc de la fibroïne de soie une protéine de choix dans l'élaboration de tissus biologiques mécaniquement forts. C'est pourquoi, Marelli *et al.*, en 2010, ont mis à profit ces propriétés mécaniques pour développer des tubes à base de fibroïne de soie électrospinnés pour l'ingénierie tissulaire vasculaire de petit diamètre (116). Les auteurs ont obtenu des valeurs de compliance ($3,51 \pm 0,42$ mmHg) et de pression à l'éclatement (575 ± 17 mmHg) inférieures à celles de la veine saphène ($4,4 \pm 0,8$ mmHg, 2250 mmHg respectivement). Sept ans plus tard, les auteurs ont amélioré leur échafaudage par réticulation de gélatine (création de liaisons carbone-carbone), possédant d'excellentes propriétés d'interaction cellulaire. Les tests mécaniques ont montré que la force, la compliance ainsi que le comportement viscoélastique étaient supérieurs aux résultats obtenus précédemment (117).

Des études *in vivo*, à partir de fils de fibroïne de soie, ont été réalisées en 2010. Ces fils ont été tressés afin de former 27 tubes de 1,5 mm de diamètre et de 10 mm de long,ensemencés avec des cellules de la moelle osseuse, qui ont été implantés dans l'aorte abdominale de rat par anastomose termino-terminale. Le greffon montrait une perméabilité de 85% à 1 an (3 greffons obstrués à 12 semaines), sans thrombus ni anévrisme et avec un recouvrement par des CML et des cellules endothéliales de la surface luminale (environ 92% à 12 semaines) (118). En parallèle, Lovett *et al.*, menaient une étude similaire démontrant des résultats équivalents mais avec un temps d'implantation plus court (4 semaines) (119). Bien que ces résultats soient encourageants, la perméabilité de ces substituts dans un modèle animal plus pertinent reste à prouver.

En 2016, Elsayed *et al.*, ont amélioré l'utilisation de la gélatine, souvent connue pour ses faibles propriétés mécaniques, grâce à l'élaboration d'un greffon vasculaire à base de fibres de gélatine électrospinnées en multicouches et orientées. L'optimisation de sa réticulation par glutaraldéhyde a permis d'augmenter le module d'élasticité (0,1 à 1,2 MPa, vs 1,06 à 4,1 MPa pour une artère coronaire) et la rétention à la suture (1,8 à 1,94 N) par rapport aux utilisations précédentes de la gélatine. De plus, elle est un très bon support pour la prolifération des CML (120). Néanmoins, son profil de dégradation lors d'une implantation *in vivo* reste à être étudié.

Une autre molécule biologique a été couramment utilisée en ingénierie tissulaire vasculaire : le chitosane. Le chitosane peut être considéré comme la forme N-désacétylée de la chitine, biopolymère abondant dans la structure du vivant.

En 2017, Aussel *et al.* ont développé un substitut vasculaire de 6 mm de diamètre et de 6 cm de long qui avaient une résistance à l'arrachement de sutures d'environ 1 N et une pression à l'éclatement de 840 à 1313 mmHg selon le degré d'acétylation utilisé (121). Malgré le fait que ces résultats soient en-dessous des valeurs natives (3073 et 2134 mmHg pour l'artère thoracique interne et la veine saphène, respectivement), ce substitut montrait une bonne hémocompatibilité (les cellules progénitrices endothéliales proliféraient, les systèmes d'activation plaquettaire, de coagulation et du complément n'étaient pas activés). Une preuve de concept d'implantation dans la carotide a été réalisée chez la brebis et les greffons étaient perméables 3 jours après l'opération (122).

Parmi toutes ces équipes, celle de Tranquillo reste la plus avancée dans le domaine des échafaudages naturels. En effet, depuis 2002, cette équipe s'intéresse à l'utilisation de la fibrine comme support pour obtenir un substitut vasculaire (123). Une dizaine d'années plus tard, cette stratégie était utilisée pour des implantations chez le gros animal. En 2014, Syedain *et al.*, ont réalisé la fabrication d'un greffon vasculaire de 4 mm de diamètre interne à base d'un gel de fibrine ensemencé avec des fibroblastes dermiques ovins allogéniques et cultivés dans un bioréacteur pulsatile pendant 3 semaines pour obtenir une période finale de maturation de 5 semaines. Suite à cette période ayant permis la synthèse de MEC sur le support de fibrine, le substitut a été décellularisé grâce à une solution détergente de SDS puis par action enzymatique d'une DNase. Bien que ce procédé ait affecté la pression à l'éclatement (5160 mmHg avant décellularisation et 4200 mmHg après), la compliance et la résistance à l'arrachement des sutures restaient inchangées. Après 24 semaines d'implantation dans l'artère fémorale de brebis, la concentration en collagène était augmentée et le greffon était colonisé par les cellules de l'hôte : les cellules endothéliales recouvraient entièrement la lumière du greffon sur toute sa longueur et des cellules positives pour l'actine du muscle lisse avaient migré à travers son épaisseur. En outre, aucun signe de formation anévrismale n'a été détecté (124). En 2016, les auteurs ont mené une étude similaire avec des résultats tout autant encourageants pour évaluer le potentiel de leur greffon au cours de la croissance somatique chez de jeunes agneaux (125).



Figure 15 : Substitut vasculaire obtenu par Tranquillo (Syedain *et al.*, 2017)

Dernièrement, l'équipe de Tranquillo a mené une étude chez le babouin en utilisant toujours la même stratégie, à l'exception des fibroblastes dermiques qui étaient d'origine humaines et du lieu d'implantation : ils ont estimé le potentiel de ce greffon (*Figure 15*) comme pontage artério-veineux dans le bras supérieur. Après 6 mois d'implantation, 60% des substituts étaient perméables (83% à 3 mois) et recellularisés. En effet, des CML ont colonisé le tissu et la formation d'un endothélium est détectée. De plus, les propriétés mécaniques étaient satisfaisantes et aucune sténose n'a été observée (exceptée très tôt après implantation) (126).

Bien que l'utilisation des polymères naturels possède plusieurs avantages en terme de biocompatibilité, leurs propriétés mécaniques restent limitées. En outre, la compaction qui peut avoir lieu avec ce type d'échafaudage entraîne la formation d'une matrice dense qui peut empêcher le remodelage par les cellules de l'hôte. Toutefois, les récentes améliorations apportées par le groupe de Tranquillo constituent un fort potentiel pour une application clinique. Néanmoins, l'efficacité de cette stratégie n'est pas encore prouvée dans le système circulatoire humain.

2.3. *Échafaudage hybride*

Les échafaudages synthétiques et naturels apportant chacun des avantages, plusieurs chercheurs ont utilisé la combinaison des deux pour potentialiser les effets bénéfiques de chacune des deux stratégies.

Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées afin de prouver l'efficacité d'une telle approche : un substitut vasculaire composé de 3 couches a été créé en superposant des nanofibres de *PCL*, du collagène et du *PLLA* (127). Le *PCL* a aussi été mélangé avec du collagène (128), de la gélatine (129) et de l'élastine (130) pour augmenter les propriétés d'adhésion à la surface. Par ailleurs, du *PLCL* a été entouré de nanofibres de fibroïne de soie (131).

Quelques équipes ont récemment mené des études *in vivo* à partir d'échafaudages hybrides. Par exemple, en 2013, Zhao *et al.* ont utilisé des nanofibres de *PCL* mélangés avec des fibres de soie d'araignée et du chitosane. Cette structure a été implantée dans l'aorte abdominale de rat et a permis de maintenir une perméabilité suffisante 8 semaines après implantation ainsi qu'un très bon support de prolifération pour les cellules en culture (132).

Plus récemment, des chercheurs ont utilisé un mélange de *PCL* et de collagène I pour obtenir un tube de 4,75 mm de diamètre par électrospinning puis réticulation. Des progéniteurs endothéliaux autologues ainsi que des cellules endothéliales dérivées de ces cellules et des CML ont été cultivés dans un bioréacteur pulsatile sur l'échafaudage hybride. Cette construction entièrement cellularisée a été implantée dans la carotide d'une brebis. Six mois après implantation, elle a gardé son intégrité structurelle et une haute perméabilité sans induire de réponse inflammatoire. Par ailleurs, la lumière du greffon a été recouverte par des cellules endothéliales matures et une couche de CML (133).

En 2010, une étude a été menée chez la brebis en utilisant un échafaudage composé de fibrine et de *PLA*. Des substituts de 6 mm de diamètre,ensemencés avec des cellules vasculaires autologues (CML, fibroblastes et cellules endothéliales), puis cultivés pendant 28 jours en conditions dynamiques, ont été implantés dans la carotide de 6 brebis jusqu'à 6 mois. Tous les substituts étaient perméables et ne présentaient pas de signe de calcification, d'anévrisme ou de thrombose, excepté un greffon qui avait sténosé à 3 mois. Par ailleurs, un remodelage de la paroi artérielle avait eu lieu avec de la néo-synthèse de collagène au cours de l'implantation et la surface luminale du greffon était recouverte d'une monocouche de cellules endothéliales (134).

En 2016, Shinoka et ses collaborateurs ont implanté un greffon hybride de 1 mm et 5 mm de diamètre dans l'artère carotide de 3 souris et 6 brebis, respectivement. Ce substitut était constitué de fibres de *PCL* électrospinnées couplées à du chitosane, sans ensemencement de cellules au préalable. Pour l'implantation chez la brebis, une différence significative concernant la pression à l'éclatement était observée 6 mois après l'intervention ($0,39 \pm 0,08$ MPa avant et $1,37 \pm 0,36$ MPa après) et cette valeur était similaire à la pression à l'éclatement de la carotide native ($1,46 \pm 0,52$ MPa). Par ailleurs, un remodelage avait eu lieu avec une recolonisation par les cellules de l'hôte (CML contractiles) et une production de collagène, d'élastine et une endothélialisation du greffon. Tous les greffons étaient perméables et ne montraient pas de signe de thrombose ou de formation d'anévrisme (135).

Bien que ces combinaisons d'approches permettent de tirer profit de chacune d'entre elles, en combinant la force, le contrôle de fabrication et la biocompatibilité, l'utilisation d'échafaudage hybride ajoute un niveau de complexité à une stratégie d'ingénierie vasculaire déjà parfois lourde et coûteuse. Elle fait appel à des temps de culture très longs et à la gestion de deux types de matériau, dont les propriétés diffèrent totalement, en même temps.

3. Matrices biologiques décellularisées

L'utilisation de matrices biologiques décellularisées permet de combiner ses avantages en terme de structure et de performances mécaniques tout en évitant des réactions immunologiques délétères dues à son origine. Ces matrices sont des tissus allogéniques ou xénogéniques, qui permettent d'obtenir un greffon avec une structure similaire aux tissus autologues. La décellularisation est effectuée selon un ou plusieurs des traitements suivants : détergents (*sodium dodecyl sulfate*, *octylglucoside*, *sodium deoxycholate*), enzymes (*dispase II*, nucléases, phospholipases, thermolysine), méthodes physiques et agitation mécanique afin d'accélérer le processus (68). Les substituts vasculaires issus de matrices biologiques décellularisées utilisent des allogreffons et xéngreffons (cités précédemment dans la partie II.1.2. Allogreffons et xéngreffons) décellularisées puis recellularisées ou non afin d'optimiser leur remodelage et leur intégration *in vivo* (58).

En 2012, notamment, Tillman *et al.*, ont utilisé des segments d'artère carotidienne de porc décellularisés, à l'aide d'une solution de Triton et d'hydroxyde d'ammonium, et ontensemencé des cellules endothéliales ovines autologues dérivées de progéniteurs endothéliaux circulants (136). Après 2 semaines de culture dans un bioréacteur, le substitut (5 mm de diamètre et 6 cm de long) a été implanté comme greffon artério-veineux chez des brebis. Malgré l'observation d'une légère dilatation 4 mois après implantation, le greffon avait maintenu une géométrie stable et ce, même si une ponction 3 fois par semaine avec une aiguille de 16G avait été mise en place. A 2 mois, l'extérieur du substitut était recolonisé par les cellules de l'hôte et une cicatrisation était observée au niveau des trous de l'aiguille par dépôt de nouvelle MEC. Pour autant, comme dans beaucoup de cas de pontage artério-veineux, tous les greffons ont développé une sténose anastomotique veineuse après 4-5 mois d'implantation, suggérant une résistance de la paroi du substitut trop faible.

La même année, la première étude chez l'humain a été menée avec une veine iliaque, humaine et décellularisée, de 9 cm de long, comme pontage veineux. La décellularisation consistait en plusieurs cycles d'incubation dans une solution de Triton, phosphate tri-*n*-butyl avec une désoxyribonucléase. L'allogreffon a étéensemencé avec des cellules endothéliales et des CML autologues, dérivées de la moelle osseuse et cultivées dans un bioréacteur pendant 2 semaines. Un an après la première implantation, malgré la perméabilité du vaisseau, le flux sanguin était trop faible à cause d'un rétrécissement du diamètre du greffon qui a causé la dilatation du vaisseau. Une deuxième implantation a été réalisée pour améliorer le flux sanguin ce qui a considérablement aidé le développement de la jeune patiente, et tout cela sans immunosuppression (137). Cette étude souligne la possibilité d'utilisation de greffons allogéniques, sans entraîner de réponse immunitaire délétère.

L'utilisation de la sous-muqueuse du petit intestin a également été démontrée par Peng *et al.*, en 2011 dans un modèle de pontage artério-veineux ovin *ex vivo*. Pour cela, le tissu a été rendu tubulaire grâce à la polymérisation de fibrine. Des cellules endothéliales aortiques bovines ont été cultivées dans la lumière du greffon (une semaine en conditions statiques et 2 jours supplémentaires sous flux). La structure a montré une pression à l'éclatement de 1200 mmHg et l'ensemencement des cellules endothéliales a réduit l'agrégation plaquettaire (138). Bien que cette approche soit intéressante, ces résultats restent à confirmer *in vivo*.

Une étude récente a été menée par Amensag *et al.*, sur l'utilisation de la membrane amniotique humaine décellularisée, par une solution de SDS complétée avec une DNase, roulée sous forme de tube de 3,2 mm de diamètre et implantée dans les carotides de lapins immunocompétents. Avant implantation, le greffon a été cultivé avec des CML humaines sur sa partie extérieure, sous perfusion pendant 4 semaines. À 4 semaines, les substituts étaient perméables, sans rejet ni occlusion thrombotique. Les cellules endogènes ont colonisé le greffon tandis que la membrane amniotique était dégradée (139). La membrane amniotique humaine semble être une approche prometteuse pour l'ingénierie tissulaire vasculaire puisqu'elle constitue un déchet opératoire avec des propriétés biologiques et mécaniques proches des matrices biologiques utilisées.

La décellularisation est un processus intéressant permettant de garder les propriétés mécaniques d'un tissu (issu de matrice naturelle) tout en retirant les composants immunogènes le constituant. De plus, l'utilisation de tissus non vasculaires a le mérite d'apporter un tissu d'origine biologique, mais, bien qu'ils réduisent l'écart entre les propriétés du vaisseau natif et du greffon construit, leur comportement sous un stress à long terme peut être complètement différent et donc entraîner des anévrismes, ou ne pas s'intégrer de façon stable au site de la greffe (100).

Malgré tout, la balance pour préserver l'intégrité de la matrice tout en éliminant le matériel cellulaire est difficile à optimiser. De plus, le contrôle sur la géométrie et la taille du greffon est limité par cette approche alors que le diamètre, par exemple, joue un rôle crucial dans l'efficacité d'un substitut vasculaire, afin d'éviter toutes complications thrombotiques. L'accessibilité et la variabilité des matrices utilisées pour la décellularisation posent également un problème. En effet, ses propriétés, telles que la force mécanique ou la composition par exemple, peuvent changer d'un donneur à l'autre ainsi que selon l'âge et l'état de santé du donneur (140).

4. Techniques d'auto-assemblage

4.1. Matrice extracellulaire synthétisée par des cellules in vitro

L'utilisation d'un échafaudage, de quelque nature qu'il soit, a souvent été considérée comme la meilleure stratégie pour obtenir un substitut vasculaire avec de bonnes propriétés mécaniques et un contrôle de la géométrie. Malgré tout, les différentes stratégies proposées précédemment entraînent souvent des problèmes d'hémocompatibilité et de résistance mécanique insuffisantes pour certaines. En outre, la préoccupation majeure quant à l'utilisation d'échafaudage est la réponse à un corps étranger et la mauvaise intégration du substitut *in vivo*. C'est pourquoi, une approche innovante consiste à utiliser les cellules elles-mêmes comme outils de fabrication de tissu très riche en MEC, qui ne subira pas de traitement ultérieure afin de préserver ses propriétés.

C'est l'équipe de L'Heureux qui a fait émerger cette approche en 1998, grâce à la première implantation d'un substitut vasculaire de 3 mm de diamètre, entièrement biologique, construit sans échafaudage, à partir de cellules humaines, dans le modèle canin non immunosupprimé. Ce premier essai consistait à reproduire les 3 couches de la paroi artérielle. Pour cela, des CML de veine ombilicale et des fibroblastes dermiques humains ont été cultivées avec de l'acide ascorbique pour obtenir des feuillets de MEC après 30 jours de culture. Ces feuillets ont été enroulés autour d'un tube de plastique puis cultivés pendant 8 semaines dans un bioréacteur pour permettre la maturation, c'est-à-dire, la fusion des couches de MEC entre elles. Finalement, des cellules endothéliales ont étéensemencées sur la surface luminale après avoir retiré le tube. Cet endothélium ainsi formé, était fonctionnel et inhibait l'adhésion des plaquettes *in vitro*. Des substituts vasculaires sans endothélialisation préalable, afin d'éviter la thrombose immédiate associée avec un rejet aigu des xénogreffons endothélialisés, ont été implantés dans l'artère fémorale de chiens immunosupprimés. Cette technique a permis d'obtenir des vaisseaux très forts, avec une pression à l'éclatement d'environ 2232 ± 249 mmHg mais après 7 jours d'implantation, une occlusion était observée à cause de la formation d'un thrombus. Cette réaction est liée à la nature thrombogénique du collagène en l'absence d'endothélium (141).

Les fibroblastes dermiques humains ont été les cellules de référence dans la suite des travaux de L'Heureux *et al.* En effet, après l'étude pionnière de 1998, cette équipe a constamment évolué vers une simplification de la méthode.

En 2006, l'approche était similaire à la première mais seuls les fibroblastes dermiques humains étaient utilisés pour former un feuillet de MEC roulé, endothélialisé avec des cellules humaines et implanté dans trois modèles animaux immunosupprimés : le rat, le chien et le primate. Les propriétés mécaniques obtenues étaient comparables aux vaisseaux natifs et même supérieurs pour la pression à l'éclatement, même sans aucun matériel exogène : pour un greffon de 4,5 mm de diamètre interne, la pression à l'éclatement était de 3468 ± 500 mmHg ; pour un substitut de 1,5 mm de diamètre, elle était de 3688 ± 1865 mmHg (1680 à 2273 mmHg pour la veine saphène humaine et 2031 à 4225 mmHg pour une artère humaine). Dans l'étude à long terme menée chez le rat, l'implantation d'un greffon de 1,5 mm de diamètre dans l'aorte abdominale après 7 mois montrait une recolonisation par les cellules de l'hôte. La perméabilité était de 85% et aucun signe d'anévrisme ou de rétrécissement de la lumière du greffon n'était observé. Dans le modèle primate, les greffons étaient perméables, ne formaient pas d'anévrisme et étaient recolonisés par les cellules de l'hôte 8 semaines après implantation (142).

Forts de cette réussite, des essais cliniques ont débuté en 2004 sur des patients atteints de maladie rénale en stade terminale nécessitant un pontage artério-veineux comme abord vasculaire d'hémodialyse. La maladie de ces patients était très avancée et toutes les options naturelles étaient épuisées, ils s'apprêtaient donc à recevoir un greffon synthétique. Des substituts autologues ont été réalisés etensemencés avec des cellules endothéliales du patient puis implantés après $7,5 \pm 0,7$ mois de préparation. La pression à l'éclatement de ces greffons variait de 2348 à 4617 mmHg. Bien que des échecs de greffe (3 sur 9) aient été liés à de la dilation, de la thrombose et des anévrismes, 20 mois après implantation, les résultats étaient très encourageants. Les vaisseaux étaient perméables à 78% après 1 mois d'implantation, et à 60% 6 mois après (143).

Par ailleurs, en 2011, dans le cadre de la mise en place d'une solution urgente pour la création d'un pontage artério-veineux, un vaisseau a été préalablement produit à partir de cellules autologues, déshydraté puis stocké congelé jusqu'à demande. Avant implantation chez l'homme, le vaisseau était réhydraté et endothélialisé avec des cellules autologues (144). Ce greffon dévitalisé mais non décellularisé de 4,8 mm de diamètre et de 18 cm de long était perméable 8 semaines après l'opération et le diamètre était stable.

Pour aller plus loin et améliorer la disponibilité des substituts, l'équipe a mis au point des greffons allogéniques (dévitalisés et stockés à -80°C) et non endothélialisés (*Figure 16*) (145). Ces substituts étaient obtenus par culture de fibroblastes dermiques extraits de deux donneurs. La pression à l'éclatement variait de 5877 à 6407 mmHg. Trois patients ont reçu ces greffons en tant qu'abord vasculaire.

De manière générale, les vaisseaux étaient perméables jusqu'à 3 et 5 mois avant qu'une intervention ait été nécessaire pour assurer une perméabilité secondaire et aucun signe d'infection n'était observé. Ces études ont montré que la déshydratation des tissus allogéniques n'affectait pas les propriétés mécaniques et n'induisait pas de réponse immunitaire. Par ailleurs, l'endothélialisation préalable ne semblait pas absolument nécessaire.

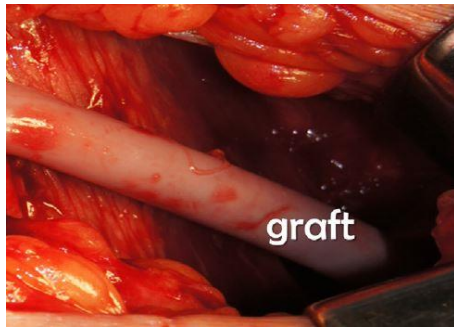


Figure 16 : Substitut vasculaire entièrement biologique et humain synthétisé par des fibroblastes dermiques allogéniques (D'après Wystrychowski et al., 2014)

D'autres équipes ont également mis en place cette stratégie en utilisant différents types cellulaires. Par exemple, Zhao *et al.*, ont utilisé des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse autologues pour former un feuillet, qui, après avoir été enroulé, a été utilisé comme implant dans la carotide de lapin. Après 4 semaines, les greffons étaient perméables, endothélialisés et très bien intégrés au vaisseau natif (146).

En 2015, Vallières *et al.*, ont proposé l'utilisation de cellules stromales dérivées de tissu adipeux humaines autologues pour former un substitut vasculaire après 10 semaines de culture. Ces vaisseaux avaient une pression à l'éclatement d'environ 760 mmHg et contenaient du collagène I, III, de la fibronectine et de l'élastine et permettaient la formation d'un endothélium confluent après ensemencement de cellules endothéliales humaines (147). Toutefois, les performances de ce substitut restent à prouver *in vivo*. Par ailleurs, les résultats de pression à l'éclatement sont en-deçà, de ceux obtenus avec des matrices synthétisées à partir de fibroblastes humains (148). Récemment, cette même équipe a développé un substitut vasculaire anisotropique grâce à l'utilisation de fibroblastes dermiques humains cultivés pour obtenir un feuillet puis ensemencé avec des CML. Cette orientation uniforme permettait d'augmenter la force des vaisseaux tout en gardant une synthèse de MEC très active (149).

4.2. Agrégats cellulaires de micro-tissu

Cette approche s'affranchit de la manipulation du tissu après la période de culture en utilisant directement une surface de culture adaptée pour donner la géométrie dès le départ. L'étude de Kelm *et al.* en 2010 en est un exemple. À partir de culture de fibroblastes issus de l'artère humaine et des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, des agrégats cellulaires piégés dans la MEC ont été obtenus. Ils ont été ensuite assemblés dans un moule cylindrique grâce à une technique automatisée de microgouttes. Après 14 jours, sous flux pulsatile, les agrégats ont fusionné et formé un substitut vasculaire cohésif. Néanmoins, les cellules endothéliales n'étaient plus détectées au niveau de la surface luminale (150).

4.3. Bio-impression

La technique de bio-impression est de plus en plus pratiquée. Elle permet la production de structures en trois dimensions à l'aide d'un outillage plus ou moins précis guidé par ordinateur. Les tissus sont donc issus de programmes et assemblés automatiquement ce qui promet une grande reproductibilité. Classiquement, les cellules sont mises en suspension dans une solution qui se solidifiera lors de l'impression (*bio-ink*) et sont imprimées sur un support biocompatible (*bio-paper*), le plus souvent des hydrogels d'agarose ou de collagène (100). Pour produire un tissu sans échafaudage exogène, les cellules peuvent être imprimées sous forme sphéroïde ou cylindrique dans une solution entièrement soluble et imprimées sur un support temporaire. Le tube final est obtenu après une étape d'incubation au cours de laquelle les différentes couches cellulaires fusionnent, permettant le retrait des hydrogels de soutien. Enfin, une étape de perfusion est nécessaire pour apporter au substitut vasculaire les propriétés mécaniques adéquates (151). Malgré des perspectives intéressantes, l'impression de particules multicellulaires est lourde. En effet, pour fabriquer un substitut vasculaire de 10 cm de long, 4000 sphéroïdes de 300 μm sont nécessaires. L'utilisation de cylindres a permis de simplifier l'impression. Cette technique oblige à fabriquer des tubes au diamètre épais (300 à 500 μm), ce qui entraîne une mauvaise survie des cellules à cause d'une ischémie. En outre, les propriétés mécaniques d'un tel substitut restent à déterminer.

5. Utilisation du corps comme bioréacteur

Une approche très intéressante consiste à créer un tissu entièrement autologue *in vivo*. Pour cela, la réponse à un corps étranger (*FBR*, *foreign body response*) est déclenchée par l'implantation d'un biomatériau dans le corps du patient qui va servir de bioréacteur (152). Cette méthode produit un greffon vasculaire entièrement biologique et autologue (après avoir enlevé le biomatériau). Cette approche bouscule la philosophie qui consiste à minimiser cette *FBR* car elle produit l'inflammation chronique responsable de la thrombose ou de l'hyperplasie intimale des greffons vasculaires synthétiques.

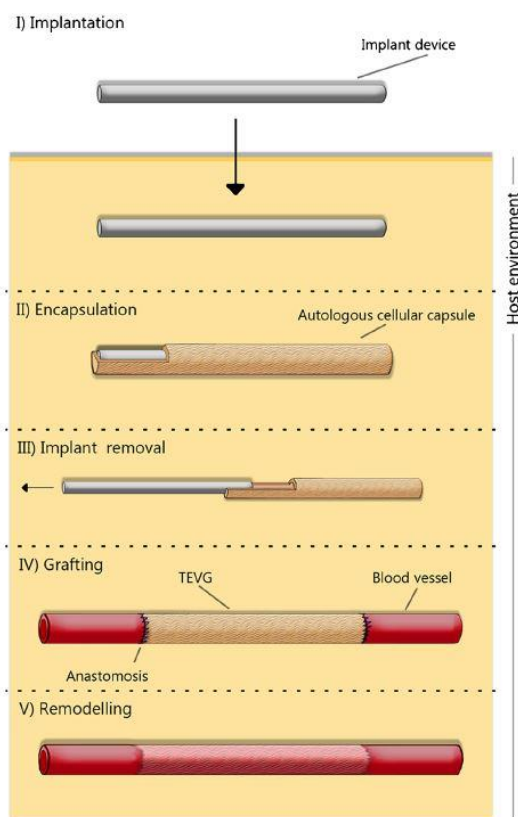


Figure 17 : Construction d'un substitut vasculaire *in vivo* grâce à la réponse à un corps étranger (*FBR*) (Geelhoed et al., 2017)

Ainsi, une tige de biomatériau implantée va être encapsulée par des cellules de l'immunité de l'hôte lorsque la *FBR* sera déclenchée, puis, lorsqu'elle sera retirée, le substitut vasculaire ainsi obtenu pourra être greffé puis remodelé (*Figure 17*).

Cette approche a commencé en 1960 par une étude préliminaire chez le chien (153) et a été poursuivie en 1961 avec l'équipe de Schillings qui a implanté des cylindres en acier inoxydable en site sous-cutanée chez le chien (154).

Sparks *et al.*, ont développé ce concept plus tard dans les années 1960 en utilisant la capsule fibreuse, synthétisée autour d'un tube de silicone entouré de fibres de Dacron® en sous-cutané pendant 5-8 semaines, comme greffon fémoro-poplitée chez le chien (155) et même chez l'humain (156). Mais cette technique a montré plusieurs problèmes : de la thrombose et de la sténose étaient observées après pontage ainsi que des anévrismes.

Cette technique a été de nouveau étudiée par Campbell qui a changé de stratégie pour le site d'implantation. En effet, elle a choisi d'implanter le biomatériau dans la cavité péritonéale afin que la capsule soit recouverte par des cellules mésothéliales qui ont des propriétés très similaires aux cellules endothéliales. Ainsi, en retournant le tissu formé, la couche mésothéliale se retrouve du côté de la surface luminale et peut jouer un rôle anti-coagulant (157). En 1999, un tube d'élastomère de silicone a été implanté dans les cavités péritonéales de rats et de lapins. Les capsules de tissu obtenues ont été implantées dans les artères carotidiennes ou abdominales de ces mêmes animaux pendant 4 mois. Bien que la moitié des implants aient pu produire des greffons utilisables, la perméabilité des substituts implantables était de 67% chez les rats et de 70% chez les lapins (158). En 2004, des greffons ont été obtenus après implantation, dans la cavité péritonéale ou pleurale de chiens, de tiges de différents types de polymères recouverts ou non d'un fin maillage d'acide polyglycolique biodégradable ou de polypropylène non biodégradable (159). Ces substituts montraient une pression à l'éclatement de plus de 2500 mmHg permettant ainsi le pontage. Onze tubes (diamètres de 3-4,5 mm) ont été implantés comme greffons interpositionnels dans l'artère fémorale du chien ayant produit le tissu. Huit greffons étaient perméables après des périodes d'implantation allant jusqu'à 6,5 mois et contenaient des cellules qui formaient un pseudo-endothélium et une adventice vascularisée (les myofibroblastes ayant pris un phénotype de CML). La perte de certains greffons a été attribuée à une thrombose sans hyperplasie intinale.

Tsukagoshi *et al.*, a utilisé une couche de fascia (membrane fibro-élastique qui relie les éléments anatomiques entre eux) pour entourer un tube de silicone. Cet implant était ensuite déposé en site sous-cutané pendant 4 semaines chez le lapin. Le silicone a été retiré et le substitut a été traité avec une solution de glutaraldéhyde et d'héparine pour être anti-thrombogénique et implanté comme conduit dans l'artère fémorale. La perméabilité était de 80% à 5 et 8 semaines et une réendothélialisation progressive avait lieu mais une hyperplasie intinale a été observée aux sites anastomotiques (160).

Récemment, le groupe de Nakayama a repris cette approche et appelle ce type de greffon un « biotube ». Sa stratégie reprend l'approche de Spark et utilise l'implantation d'un tube de silicone en site sous-cutané. Le premier essai de greffe a été effectué chez le lapin en 2010 par Watanabe *et al.*, après l'implantation sous-cutanée d'un tube de silicone de 3 mm de diamètre externe pendant 2 mois. L'implant a été explanté, les sites anastomotiques ont été renforcés par des éponges de polyuréthane, un anticoagulant a été administré afin d'éviter le risque de thrombose et le biotube a été implanté dans la carotide du lapin. Cette étude à long terme n'a montré aucun signe de formation anévrysmale, de rupture ou de sténose. De plus, la surface luminale était complètement recouverte de cellules endothéliales et la paroi du greffon était constituée de CML et de fibres de collagène (161). Par ailleurs, des études similaires dans le modèle du rat ont montré de moins bons résultats avec 67% de perméabilité à 12 semaines (contre 82% chez le lapin) (162).

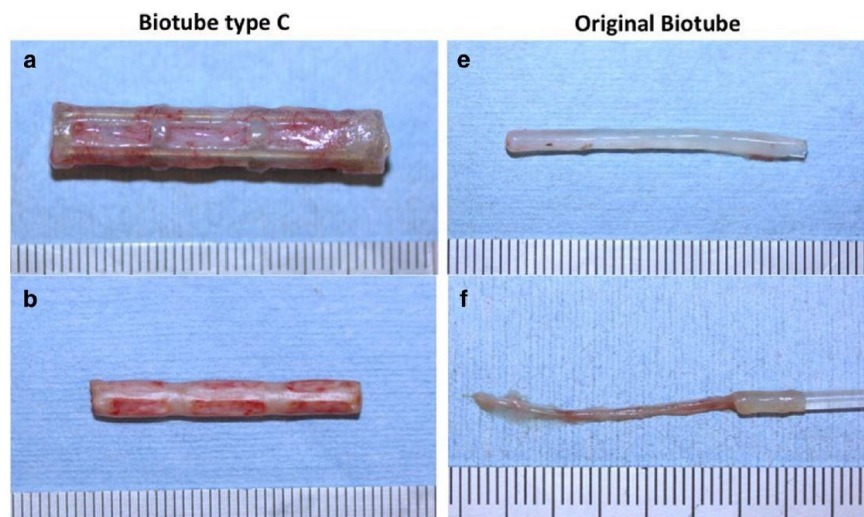


Figure 18 : Amélioration du biotube développé par Nakayama. Greffon obtenu par encapsulation après 4 semaines d'implantation en sous-cutanée avec (a) et sans (b) cage, après avoir retiré le moule (b, f) (Furukoshi *et al.*, 2016)

Récemment, des améliorations ont été apportées pour obtenir des substituts plus robustes et notamment l'utilisation d'une cage pour l'implantation sous-cutanée (pression à l'éclatement 1825 mmHg avec cette méthode comparée à 944 mmHg précédemment) (Figure 18). Sept jours après implantation dans l'artère fémorale, la perméabilité des nouveaux substituts était totale tandis que seulement 33% des biotubes classiques étaient perméables (163).

L'équipe de Rotmans a également mené des études en utilisant la *FBR* pour développer un substitut vasculaire, et dernièrement chez le gros animal. Ces auteurs se sont focalisés sur des modifications de surface des biomatériaux implantés afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation par les cellules de l'hôte. Pour cela, plusieurs stratégies ont été mises en place : traitement au plasma, revêtement avec du collagène I et du *TGB-β* (*transforming growth factor-beta*), et gravure au chloroforme. Cette technique s'avère être la plus satisfaisante puisqu'elle permet d'obtenir une couche épaisse de collagène avec des myofibroblastes et de l'élastine grâce à l'augmentation de sa capacité d'adhésion cellulaire (164).

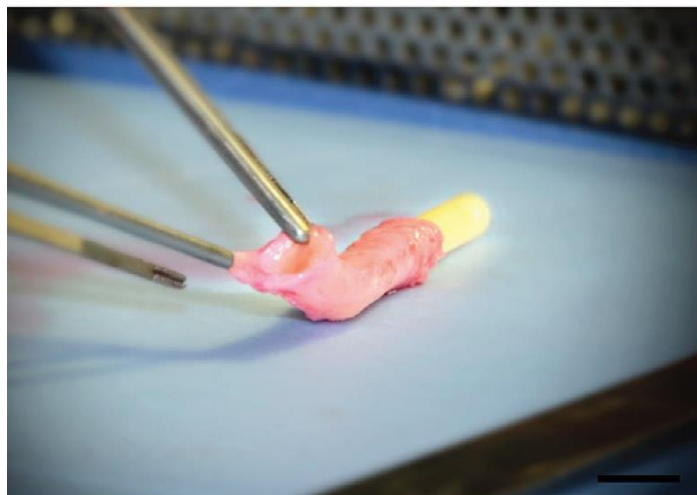


Figure 19 : Tissu fibrocellulaire encapsulé autour du tube de polymère après 4 semaines d'implantation en site sous-cutané chez le porc (Rothuizen et al., 2016)

Cette stratégie a été aussi reprise en 2016 par Rothuizen et al. en implantant un copolymère de *poly(ethylene oxide terephthalate)-poly(butylene terephthalate)* de 4,2 mm de diamètre, traité au chloroforme, pendant 4 semaines en site sous-cutané chez le porc. Ce substitut (*Figure 19*), riche en protéines de la MEC, a ensuite été greffé dans la carotide et était perméable à 100% pendant 1 semaine puis 87,5% à 4 semaines. Malgré la compatibilité de diamètre entre le substitut et l'artère carotidienne au début de l'implantation, de la sténose au niveau des anastomoses a été observée dès la première semaine. De plus, la pression à l'éclatement était de 3947 ± 577 mmHg avant implantation et de 5211 ± 358 mmHg après, suggérant un remodelage important de la paroi du substitut. Néanmoins, ces valeurs restent très en-deçà des valeurs natives de la carotide (10011 ± 1090 mmHg) (165).

6. Conclusion

Finalement, le substitut vasculaire idéal doit :

- Avoir des propriétés mécaniques suffisantes pour supporter la pression sanguine sur de longues périodes sans engendrer d'anévrismes ou d'éclatement ;
- Avoir une force de résistance à l'arrachement des sutures compatible avec la chirurgie et être facilement manipulable par le chirurgien ;
- Avoir une surface luminale non thrombogénique (ce qui pourrait causer des sténoses ou des occlusions) ;
- Être compatible avec les cellules de l'hôte, notamment en ne déclenchant pas de réaction inflammatoire ni de cytotoxicité ;
- Être suffisamment compliant pour éviter les différences d'élasticité avec le vaisseau natif (cause très fréquente d'échec de la greffe) ;
- Être capable de se remodeler après implantation pour s'intégrer dans le système vasculaire ;
- Être produit à large échelle, à bas coût, avoir des dimensions (longueur, diamètres, etc.) variables.

À ce jour, malgré l'exploitation de plusieurs approches en ingénierie tissulaire vasculaire et les nombreuses améliorations apportées depuis des dizaines d'années, aucun substitut ne répond à tous ces critères. En effet, plusieurs échecs peuvent intervenir au cours de l'implantation. La thrombose aiguë est la cause d'échec principale aux premiers temps de l'implantation (jusqu'à 3 mois après l'opération). Elle est notamment liée à l'absence d'endothélium, qui physiologiquement, empêche l'adhésion plaquettaire à outrance et donc régule le phénomène de coagulation. Par exemple, les substituts issus de matrices biologiques décellularisées, et donc dépourvus de cellules endothéliales, ont un haut risque d'activation plaquettaire puisque leur MEC est en contact direct avec la circulation sanguine. C'est également le cas pour les greffons vasculaires issus de la stratégie d'auto-assemblage et d'échafaudages naturels non endothélialisés. Pour les substituts issus d'échafaudages synthétiques biodégradables, un échec plus tardif peut avoir lieu (3 mois à 2 ans après implantation). En effet, la structure souvent poreuse des polymères utilisés permet aux cellules de l'hôte de coloniser le greffon au niveau des anastomoses, entraînant un épaississement de la paroi et donc une hyperplasie intimale qui va diminuer la perméabilité du vaisseau à cet endroit ainsi qu'une turbulence du flux sanguin.

La cause la plus tardive d'échec est l'apparition d'une plaque athéromateuse récurrente. Ce problème touche la plupart des approches d'ingénierie vasculaire à long terme à cause d'une réaction inflammatoire chronique *in vivo* (100).

Pour autant, plusieurs substituts vasculaires issus de l'ingénierie vasculaire ont connu un succès et ont même atteint les essais cliniques (*Table 2*). Une des approches consiste en l'utilisation de l'artère carotide bovine décellularisée. Les résultats sont très encourageants puisque le pontage dans les membres inférieurs a permis de les sauver dans 86,2% des cas 5 ans après l'implantation (64). Malgré tout, cette stratégie repose sur l'utilisation d'un xéno greffon et donc fait appel à la décellularisation qui peut s'avérer être une technique délétère pour l'intégrité du tissu. Sur le plan psychologique, certains patients pourraient également développer une certaine réticence à l'implantation d'un tissu d'une autre espèce dans le corps. L'utilisation de CML cadavériques a également permis de développer des vaisseaux sanguins issus de l'ingénierie tissulaire suffisamment forts pour être testés en clinique. Malheureusement, la technique utilisée par Niklason fait appel à des étapes longues, complexes et donc coûteuses bien que les résultats obtenus soient satisfaisants avec une perméabilité secondaire (perméabilité maintenue grâce à une réintervention chirurgicale) du vaisseau à 1 an de 89% (96). Finalement, la technique pionnière de l'assemblage de tissu par des cellules *in vitro* reste la plus prometteuse. En effet, malgré des étapes de production longues et coûteuses, elle a montré des résultats encourageants sans cellules autologues et sans endothélialisation (145). L'amélioration de cette approche fait l'objet de cette thèse.

Table 2 : Substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire ayant atteint les essais cliniques

Approaches	Applications	Scaffold materials and fabrication methods	Groups
Natural material-based TEVG	Graft as an extrahepatic portal vein bypass.	Decellularized human iliac vein seeded with autologous cells No commercial product	Sumitran-Holgersson and colleagues (Olausson et al., 2012)
	Lower extremity bypass surgery	Decellularized bovine carotid artery graft Commercial name: Artegraft, (North Brunswick, NJ)	Lin and colleagues (Lindsey et al., 2017)
Synthetic material-based TEVG	Arteriovenous (AV) shunt for hemodialysis	Decellularization of PGA scaffolds seeded with cadaver SMCs. Commercial name: Humacyte, (Humacyte Incorporated, RTP, NC)	Dahl/Niklason and colleagues (Lawson et al., 2016)
Self-assembled TEVG	AV shunt for hemodialysis access	Cell-sheet of human fibroblast in a shape of conduit. ECs were seeded in the graft after devitalization of the luminal side. Commercial name: Cytograft, (Cytograft Tissue Engineering, Inc.)	L'Heureux and colleagues (Wystrychowski et al., 2011)
	AV shunts for hemodialysis access	Cell-sheet of human fibroblast in a shape of conduit, without further endothelialization. Dehydrated and stored (-80°C) before clinical application. Commercial name: LifeLine™, (Cytograft Tissue Engineering, Inc.)	L'Heureux and colleagues (Wystrychowski et al., 2014)

V. MATRICE EXTRACELLULAIRE

1. Structure

Les tissus et les organes sont composés d'éléments cellulaires et non cellulaires. Ces derniers forment un réseau très organisé appelé matrice extracellulaire (MEC). Cette matrice n'a pas pour seule fonction d'être un échafaudage structurel dans lequel les cellules sont enchevêtrées, mais elle permet également la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la migration, la différenciation, la survie, l'homéostasie et la morphogénèse (166).

La MEC est composée d'une grande variété de macromolécules qui sont interconnectées et assemblées de manière précise et spécifique selon les tissus. La grande majorité de ces molécules sont des protéines impliquées dans la formation de fibres telles que les collagènes, l'élastine, ou y participent indirectement, telles que la fibronectine, les laminines, les glycoprotéines, les protéoglycanes (PG) et les glycosaminoglycanes (GAG). De plus, les PG ont un rôle de comblement de l'espace interstitiel en formant un gel hydraté (166). C'est l'assemblage complexe de ces protéines qui forme un réseau tridimensionnel structurel permettant l'intégrité des tissus et ces propriétés biochimiques. Tous les types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, *etc.*) synthétisent et sécrètent des macromolécules matricielles sous le contrôle de multiples signaux pour participer à la formation de la MEC. Par ailleurs, l'adhésion cellulaire au réseau macromoléculaire de la MEC est régulée par des récepteurs spécifiques de celle-ci, comme les intégrines, les récepteurs à domaine discoïdine et les syndecans. Cette MEC est également composée de plusieurs facteurs de croissance, cytokines et chimiokines qui vont se fixer aux molécules de la MEC et envoyer des signaux au cours de processus physiologique et pathologique (167).

La membrane basale constitue un type de MEC particulière qui est en contact direct avec les cellules. Elle se trouve à l'interface entre le tissu parenchymateux et le tissu conjonctif, formant une plateforme d'ancrage aux cellules. Elle est composée, entre autres, de collagène de type IV, laminines, nidogènes 1 et 2, perlecans, collagène de type XV et XVIII. L'association entre les laminines et le collagène IV permet de créer une couche structurelle pour l'adhésion des cellules épithéliales grâce aux jonctions de type hémidesmosome (168).

2. Composition et fonction

La force mécanique de la MEC est majoritairement due aux collagènes fibrillaires, notamment les types I et III, qui sont les plus abondants dans les tissus (30% de la masse des protéines totales) et qui sont principalement synthétisés par des fibroblastes (169). La superfamille du collagène contient 28 membres. Cette famille de protéines joue un rôle clé dans la paroi vasculaire dont les propriétés mécaniques sont cruciales. Cet aspect sera discuté plus en détail dans la partie V.4. Cas particulier du collagène.

Les fibres élastiques sont une autre composante importante de la MEC qui dictent ses propriétés mécaniques. Les fibres élastiques sont composées de deux molécules différentes : l'élastine et les microfibrilles (*Figure 20*). L'élastine forme le cœur interne des fibres élastiques tandis que les microfibrilles l'entourent et sont composées de plusieurs macromolécules (170). L'élastine est sécrétée par les cellules dans sa forme soluble, appelée tropoélastine (60-70 kDa). Elle est constituée de deux régions : la boucle élastique N-terminale qui procure le caractère élastique aux fibres et la partie C-terminale qui permet aux fibres d'interagir avec les cellules. Cette protéine s'auto-agrège dans l'espace extracellulaire (phénomène de coacervation) (171) et est réticulée par la *lysyl oxidase* pour former des globules d'élastine insolubles qui se regroupent avec d'autres protéines comme les glycoprotéines associées aux microfibrilles, la vitronectine, les protéines *latent transforming growth factor β -binding*, les fibulines 1, 3, 4 et 5 et la protéine *EMILIN (elastin microfibril interfacier)* autour de microfibrilles pour former des fibres élastiques.

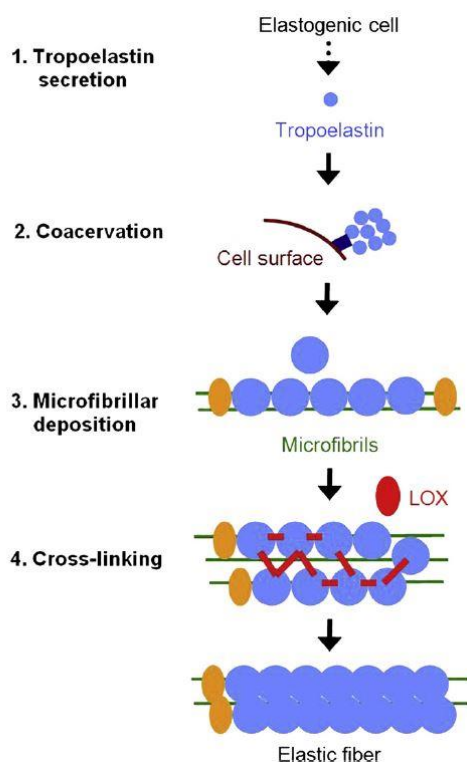


Figure 20 : Formation des fibres élastiques (Yeo et al., 2011)

La particularité de cette protéine réside dans sa faible synthèse à l'âge adulte, la quasi-totalité de l'élastine étant produite lors du développement embryonnaire et de l'enfance (172). Les microfibrilles (10-12 nm de diamètre) servent d'échafaudage pour le dépôt, l'orientation et l'assemblage des monomères de tropoélastine. Elles se forment à proximité des cellules sécrétant la tropoélastine et parallèlement à la fibre d'élastine en développement. Ces microfibrilles sont formées par les fibrillines 1 et 2 et la glycoprotéine associée aux microfibrilles 1 (*MAGP1, microfibril-associated glycoprotein 1*). Ces fibres élastiques sont une composante essentielle de la média de la paroi vasculaire, et notamment dans les vaisseaux à proximité du cœur où s'exercent une forte pression artérielle. Elles sont capables de s'étirer de manière réversible à 220% de leur longueur initiale. Elles sont organisées en anneaux concentriques dans lesquels des CML sont enchevêtrées (170). Par ailleurs, l'élastine joue un rôle important dans l'inhibition de la prolifération des CML vasculaires. En effet, une carence en élastine peut entraîner une sténose aortique supra-valvulaire et une obstruction du vaisseau (173).

Les PG sont très abondantes dans la MEC et participent à la formation d'un réseau organisé, à la signalisation, la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose grâce à leurs interactions avec des facteurs de croissance et des récepteurs cellulaires via leurs chaînes GAG. (167). Les PG sont constituées d'une chaîne protéique à laquelle est liée une ou plusieurs GAG (*Figure 21*). Les GAG sont constituées de l'enchaînement d'unités disaccharidiques dont l'une des deux sous-unités est un glucide aminé, c'est-à-dire une N-acetylglucosamine ou une N-acetylgalactosamine. Ces chaînes sont sulfatées et chargées négativement. Les GAG sont classées en 5 groupes se différenciant par le type de liaison qui relie les 2 sous-unités saccharidiques ainsi que par le nombre et le positionnement des groupements sulfates, créant des motifs très hétérogènes. Il est ainsi possible de trouver les héparanes-sulfates (HS), les chondroïtines-sulfates (CS), les dermatanes-sulfates (DS), les kératanes-sulfates (KS) ainsi que les acides hyaluroniques (AH). L'acide hyaluronique est la seule famille de GAG non sulfaté qui est retrouvée sous une forme non liée de manière covalente à une protéine.

Les GAG, avec leur capacité de gonflement en captant les molécules d'eau, occupent une place importante dans les matrices procurant ainsi une résistance aux forces de compression et servant de réservoir d'eau et d'ions divalents (174). Dans la paroi vasculaire, des protéoglycanes comme le versican, le biglycan et la décorine interagissent avec les microfibrilles et apportent des propriétés d'hydratation, forment un tamis moléculaire, régulent les activités cellulaires, sécrétoires et de transport au sein de la MEC (170). L'acide hyaluronique est étroitement liée aux maladies vasculaires, notamment lors de l'athérosclérose, en s'accumulant et en captant des molécules d'eau à l'endroit de la lésion, contribuant au développement d'une sténose (175).

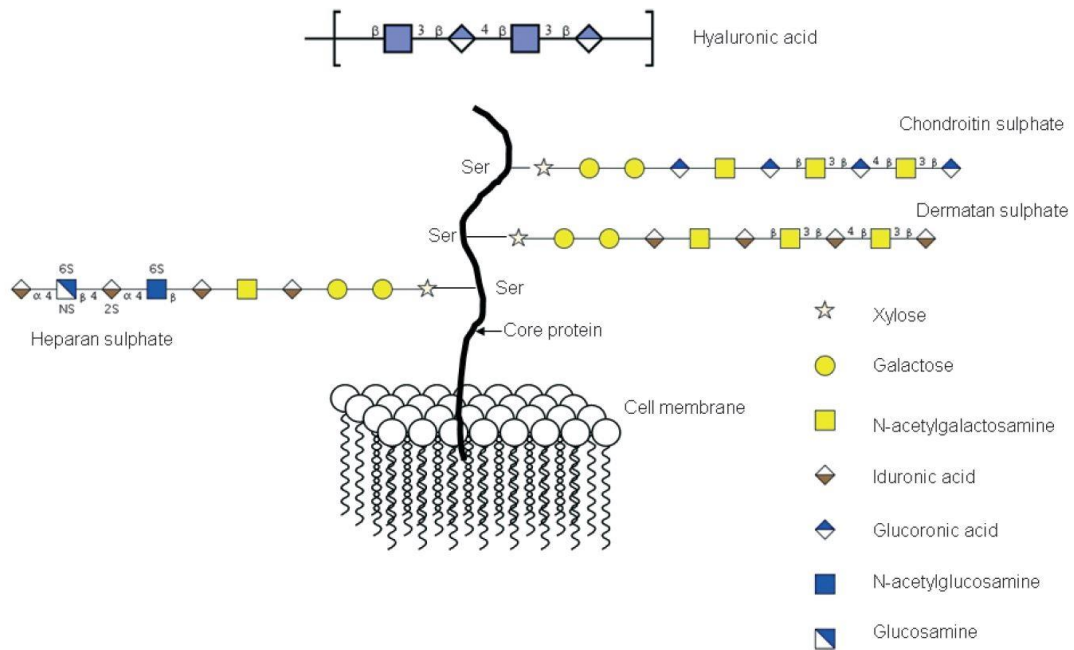


Figure 21 : Structure des protéoglycans et liaison avec des glycosaminoglycans (Gandhi et al., 2008)

Une autre classe de molécules est présente dans la MEC : les glycoprotéines. Elles ont un rôle de cohésion de la matrice et permettent l'interaction entre les différents composants de celle-ci. Ces protéines sont des chaînes protéiques auxquelles sont liés des motifs glycosylés. Elles ont une structure organisée en modules et sont de haut poids moléculaire (plusieurs milliers de Da). Ces modules sont des séquences en acides aminés qui permettent de se lier à d'autres protéines et/ou de s'auto-assembler pour former un réseau complexe. Elles peuvent également lier des facteurs de croissance pour induire des voies de signalisation. L'une des glycoprotéines les plus abondantes dans la MEC de la paroi vasculaire, et notamment au niveau de la membrane basale, est la laminine (Figure 22). Cette glycoprotéine a une forme de croix ou de T et est hétérotrimérique, c'est-à-dire qu'elle est constituée de 3 chaînes α , β et γ liées ensemble par des ponts disulfures. Des combinaisons différentes de ces trois types de chaînes (5 α , 3 β et 3 γ ont été identifiées) peuvent théoriquement donner lieu à 45 types de laminine, mais actuellement, 18 d'entre elles ont été identifiées.

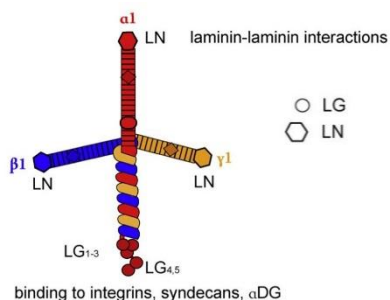


Figure 22 : Domaines d'interaction de la laminine (D'après Kostourou et al., 2014)

Les parties N-terminales de la protéine forment des bras courts qui se terminent par une région globulaire LN qui joue un rôle crucial dans l'interaction avec les membranes basales ou d'autres laminines. De plus, les bras courts interagissent avec les nidogènes, le perlecan, les fibulines 1 et 2, l'héparine et les sulfatides (176). Par ailleurs, la partie C-terminale de la chaîne α porte un domaine LG qui a un rôle dans l'interaction avec des récepteurs cellulaires de surface, des intégrines, des α -dystroglycans (α DG) et des syndécans (protéoglycanes transmembranaires). Les laminines 8 et 10 sont exprimées dans les vaisseaux sanguins et les isoformes des chaînes majoritaires sont $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 2$ (177).

Une autre glycoprotéine ayant un rôle majeur dans la MEC est la fibronectine (*Figure 23*). C'est une protéine de 240-270 kDa qui est produite dans les tissus fibreux. Elle forme un dimère antiparallèle composé de deux monomères similaires liés ensemble par une paire de ponts disulfures en C-terminal. Chaque monomère comprend des répétitions de type I, II et III. Les ponts disulfures des répétitions de type I et II stabilisent la structure de la protéine repliée alors que la répétition de type III donne de la flexibilité (177). Cette protéine interagit avec plusieurs récepteurs cellulaires de surface comme les intégrines via son domaine RGD (arginine, glycine, acide aspartique) et différentes molécules de la MEC, servant ainsi d'échafaudage pour l'assemblage de protéines de la MEC telles que le collagène, le fibrinogène, l'héparine, la thrombospondine et la tenascine. Elle a également un rôle de mécanorégulation du microenvironnement tissulaire en changeant sa structure en réponse à une force, entraînant ainsi différentes signalisations pour moduler la réponse cellulaire (176). Dans la MEC vasculaire, sa fonction est médiée par l'interaction entre son domaine RGD et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Ces différentes isoformes permettent le remodelage de la paroi vasculaire notamment par régulation de l'adhésion de leukocytes, de cytokines et dans la différenciation des types cellulaires cités précédemment (178).

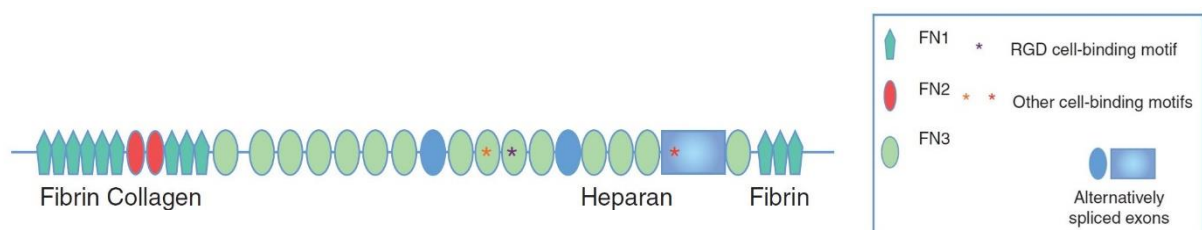


Figure 23 : Domaines d'interaction de la fibronectine (D'après Hynes et al., 2012)

D'après Hynes *et al.*, de nombreux facteurs de croissance et enzymes sont présents au sein de la MEC et doivent donc être considérés comme des composants de celle-ci (179). Par exemple, la fibronectine lie spécifiquement le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), l'HGF (*hepatocyte growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), etc.

Le facteur *TGF* peut interagir indirectement avec les fibrillines et une altération dans cette liaison peut entraîner des maladies telles que le syndrome de Marfan. Ces facteurs sécrétés ont un rôle essentiel dans le développement (179). Des enzymes sont également intégrées à l'intérieur de la MEC et notamment pour sa propre régulation grâce à des protéines telles que les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs. Les métalloprotéinases ont pour rôle la dégradation de la MEC, elles permettent ainsi de libérer certains facteurs piégés dans la MEC ou de défaire le réseau tridimensionnel (180).

3. Matrice extracellulaire vasculaire

La MEC constitue plus de la moitié de la masse de la paroi vasculaire et contient majoritairement du collagène et de l'élastine (*Figure 24*). La composition de la paroi peut varier selon les vaisseaux. Par exemple, les artères contiennent plus de collagène et d'élastine que les veines. Au sein de cette paroi, les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale qui contient de la laminine, du collagène de type IV, de la fibuline 1, du nidogène, du perlecan, les collagènes de type XV et XVIII, de la fibronectine, etc. Les collagènes de type XVIII et IV interagissent avec les microfibrilles contenant de la fibrilline permettant ainsi l'ancrage de la membrane sous-endothéliale au réseau élastique (18). Cette membrane basale sépare les cellules endothéliales de la limitante élastique interne (*internal elastic lamina, IEL*), composée de plusieurs couches de CML contractiles séparées par des fibres élastiques et une matrice riche en collagène (181). La média débute au niveau de l'*IEL* et est constituée de couches concentriques de fibres élastiques et de CML séparées par un réseau enchevêtré de collagènes, microfibrilles, protéoglycanes et glycoprotéines. La média et l'*adventice* sont séparées par la limitante élastique externe (*external elastic lamina, EEL*). L'*adventice* est un tissu conjonctif fibroélastique et est composée en grande partie de collagènes fibrillaires de type I et III, de fibronectine de protéoglycanes (chondroïtine et *dermatan* sulfate), de versican, de biglycan, et de décorine (178). Ces protéoglycanes sont capables de se gonfler en milieu aqueux et donc contribue à la compressibilité de la paroi vasculaire (18).

La MEC de la média est principalement synthétisée par les CML qui sont enchevêtrées dans un réseau de fibres élastiques et de collagène. La MEC de l'*adventice*, quant à elle, est synthétisée par les fibroblastes présents dans cette couche de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales synthétisent les composants de la membrane basale sous-endothéliale et de l'*IEL* ainsi que des médiateurs vasoactifs comme l'oxide nitrique, la prostacycline, l'endothéline 1, la sérotonine et la thromboxane qui contrôlent le tonus vasculaire. La MEC des vaisseaux sanguins leur apporte la force mécanique, l'élasticité et la compressibilité.

Par ailleurs, elle forme un réseau complexe qui participe aux interactions cellules-cellules et MEC-cellules afin de réguler la migration, la prolifération, la différenciation et permettre l'homéostasie vasculaire en contrôlant la croissance, les propriétés mécaniques et les processus de réparation de la paroi du vaisseau (181).

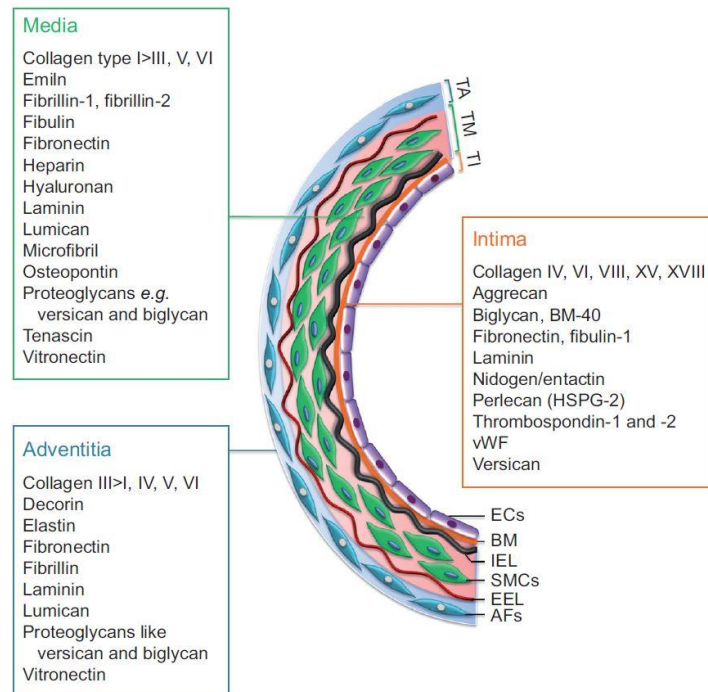


Figure 24 : Composition des différentes couches de la paroi vasculaire (Chelladurai et al., 2012)

4. Cas particulier du collagène

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères (30% de la masse totale de protéines). C'est une superfamille qui comprend 28 membres qui possèdent une structure quaternaire particulière en triple hélice de pas droit formée par 3 chaînes polypeptidiques dites « α ». Ces chaînes α , dont la taille peut varier, peuvent être identiques pour former des homotrimères ou différentes et ainsi former des hétérotrimères. La triple hélice est composée de la séquence répétée Gly(glycine)-X-Y, où X est souvent une proline et Y est fréquemment une 4-hydroxyproline. Cette structure en triple hélice se retrouve sur une portion plus ou moins importante de la molécule ce qui détermine son appartenance à une certaine famille de collagène. Les domaines non structurés en triple hélice sont appelés domaines non-collagéniques. Ils participent à la structure mais ont surtout des activités biologiques.

On distingue ainsi les *fibril-forming collagens*, qui contiennent un domaine en triple hélice important (collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII), des *fibril-associated collagens with interrupted triple helices ou FACITs* (collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII), riches en domaines non-collagéniques. Des domaines d'interactions protéiques spécifiques sont retrouvés au sein des domaines non-collagéniques, notamment les domaines du facteur von Willebrand, de la fibronectine type III et de la thrombospondine (Figure 25). D'autres collagènes forment des familles moins nombreuses qui jouent une variété de rôles biologiques : *network-forming collagens* (collagènes de type IV, VI, VIII et X), les collagènes membranaires (type XIII, XVII, XXIII, XXV) et les *multiplexins* (collagènes de type XV et XVIII) (169).

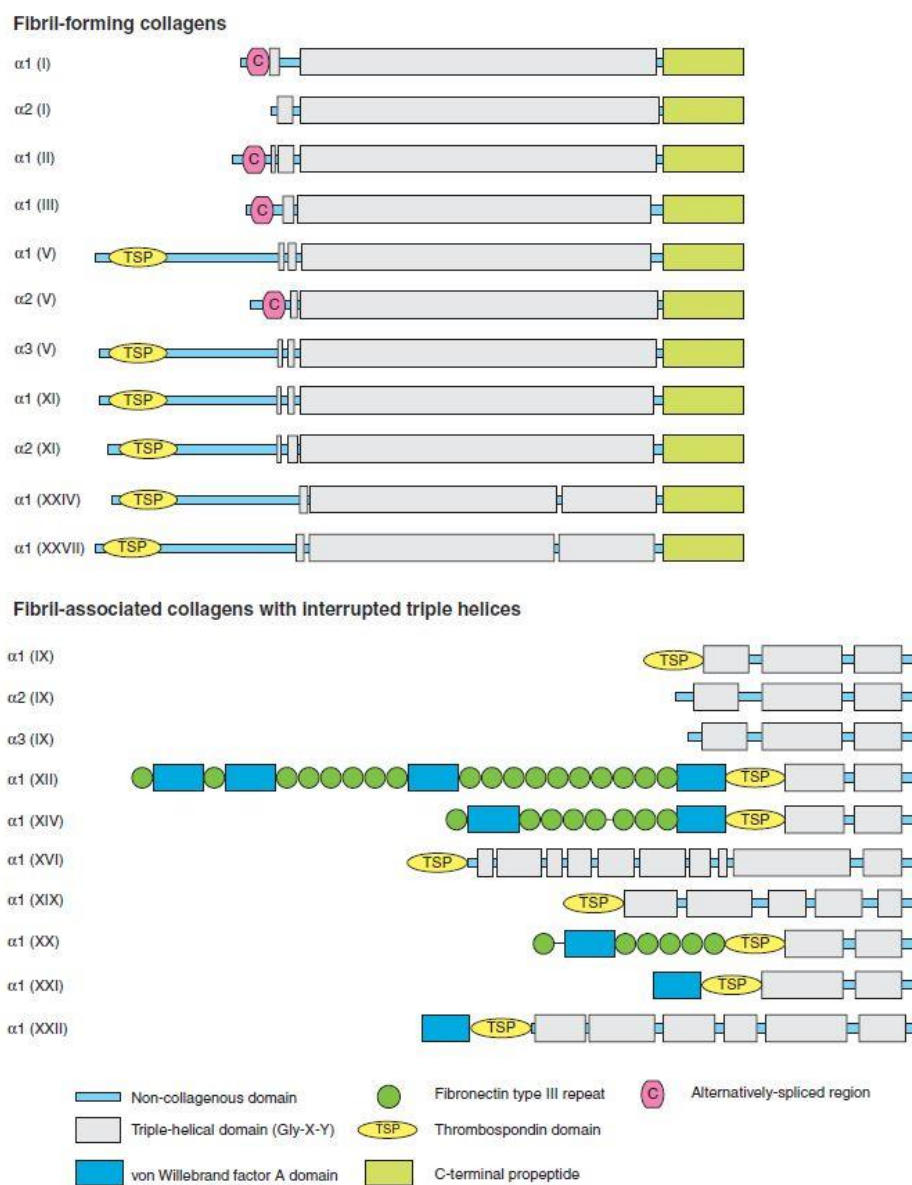


Figure 25 : Domaines collagéniques de la triple hélice et domaines non-collagéniques (Ricard-Blum, 2011)

Puisque le rôle mécanique du collagène est primordial pour un vaisseau sanguin, la structure et la production du collagène de type I vont être particulièrement décrites. La biosynthèse du collagène de type I débute par la transcription des gènes COL1A1 et COL1A2 dans le noyau. Les ARN messagers transcrits sont transportés dans le cytoplasme et traduits au niveau du réticulum endoplasmique granuleux. Ces gènes codent pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui formeront la molécule précurseur du collagène, le procollagène (Figure 26). Chaque chaîne α est composée d'environ 1400 acides aminés qui présentent une partie globulaire à leurs extrémités N- et C-terminales (N- et C-propeptide) ainsi qu'une partie non hélicale en amont : les télépeptides (169). Chaque chaîne α va ensuite subir un certain nombre de modifications post-traductionnelles. L'hydroxylation des résidus proline et lysine par la prolyl 3-hydroxylase, la prolyl 4-hydroxylase et la lysyl hydroxylase. La catalyse de ces réactions nécessite des cofacteurs tels que des ions ferreux, du 2-oxoglutarate, du dioxygène et de l'ascorbate. L'ascorbate, ou vitamine C, est une vitamine soluble et anti-oxydante *in vivo* (182). Par ailleurs, des résidus glucosyl et galactosyl sont ajoutés sur les groupements hydroxyl de l'hydroxylysine.

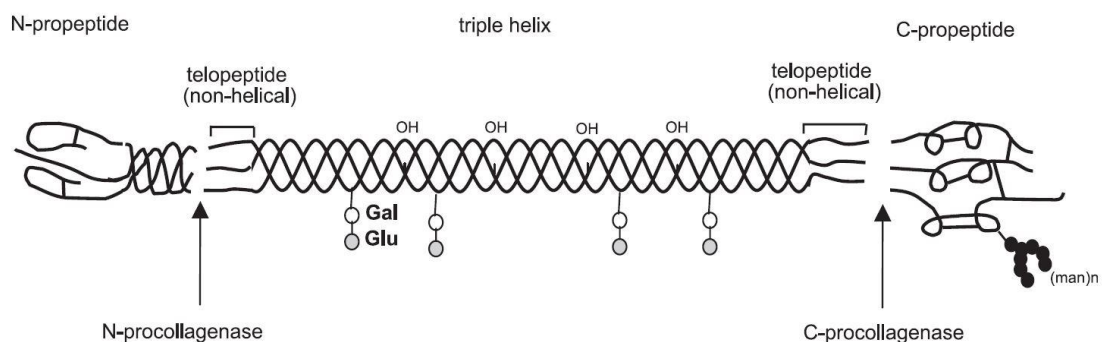


Figure 26 : Structure du procollagène (Gelse et al., 2003)

Ensuite, les deux chaînes $\alpha 1$ et une $\alpha 2$ s'assemblent pour former un trimère, grâce à la présence de glycines dont la chaîne latérale est composée d'un unique atome d'hydrogène. Cet acide aminé est positionné en 3^{ème} place selon le motif répété (Gly-X-Y)_n, où X et Y sont souvent une proline ou une hydroxyproline. Les chaînes α s'assemblent autour d'un axe central de sorte à ce que les résidus glycine soient positionnés au centre de la triple hélice (183). La triple hélice est ensuite empaquetée dans l'appareil de Golgi dans des vésicules sécrétrices afin d'être relarguée dans l'espace extracellulaire et clivée par deux protéases spécifiques : la *procollagen N-proteinase* et la *procollagen C-proteinase*.

Ces enzymes coupent le procollagène au niveau de ces extrémités N- et C-terminales afin de donner naissance à une molécule mature qui va alors s'auto-assembler en fibrilles (184). Cet assemblage est possible car la perte des propeptides diminue la solubilité des molécules ce qui entraîne leur agrégation. L'assemblage en fibrilles est stabilisé par réticulation covalente entre les résidus lysines et prolines hydroxylés. Les monomères de triple hélice ont une longueur de 300 nm et 40 nm les séparent des monomères consécutifs (*Figure 27*). Cet espacement explique la striation typique des fibrilles de collagène I visible au microscope électronique avec une périodicité de 65-67 nm. La manière dont les triples hélices sont organisées les unes par rapport aux autres dicte la localisation et l'accessibilité de leurs sites de liaison à des ligands actifs biologiquement. C'est cette forme supramoléculaire qui est responsable de la résistance structurale et mécanique du collagène de type fibrillaire (183).

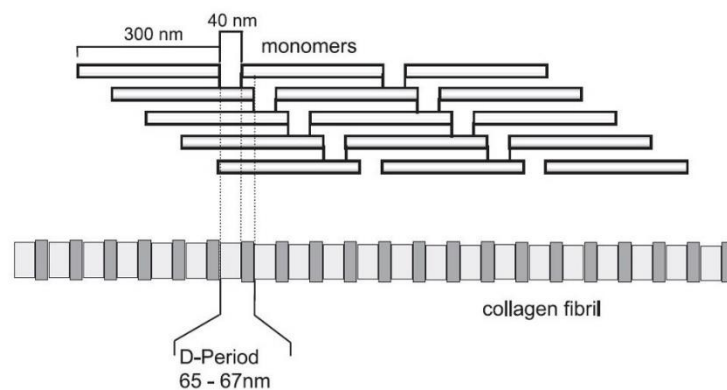


Figure 27 : Schéma d'assemblage des fibrilles (Gelse et al., 2003)

Mais cette organisation supramoléculaire ne s'arrête pas là. En effet, il existe un niveau d'assemblage supérieur car les fibrilles de collagène s'organisent en faisceaux parallèles pour former des fibres de collagène (*Figure 28*) (185). Ces fibres peuvent ensuite elles-mêmes se regrouper pour former des paquets de fibres. Ces structures sont obtenues grâce à différentes réticulations covalentes telles que la formation de ponts disulfures, de liaisons isopeptidiques, des réactions de glycation, ou plus rarement, des liaisons sulfilimine (169). Ces liens covalents sont très forts et confèrent une haute stabilité aux collagènes, non seulement en augmentant la résistance mécanique, mais également en limitant la dégradation protéolytique (186).

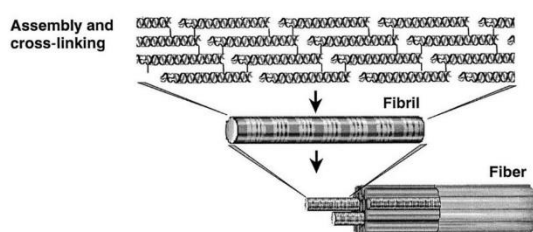


Figure 28 : Assemblage des fibrilles en faisceaux parallèles pour former des fibres de collagène (d'après Culav et al., 1999)

Dans la paroi du vaisseau sanguin, l'enchevêtrement du réseau très varié de collagènes et des autres protéines de la MEC est essentiel pour ses propriétés mécaniques ainsi que son remodelage.

Ainsi, on compte une douzaine de collagènes différents tels que les collagènes de type I, III et V (les plus abondants), les collagènes de type IV, XV, XVIII (présents dans la membrane basale sous-endothéliale), les collagènes de type VI, VIII, XIV, les collagènes transmembranaires ainsi qu'un certain nombre de *FACITs*. Afin d'éviter de réaliser un catalogue, les collagènes présents dans la paroi vasculaire et leurs interactions avec les cellules et les autres protéines de la MEC sont résumés dans la *Table 3* (187).

Table 3 : Collagènes présents dans la paroi vasculaire et interactions avec les cellules et les autres protéines de la MEC (Osidak et al., 2015)

Collagen type	Supramolecular structure	Interaction with			Cell source	MMP degradation ^d
		other collagens types ^a	other ECM components and growth factors ^b	cells ^c		
<i>Fibril-forming collagens</i>						
I	Stiated fibrils	III, V, VI, XIV	fibronectin, decorin, heparin, heparan sulfate, vitronectin, thrombospondin-1, HGF, PDGF-bb, SPARC	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$	Endothelial cell, Smooth muscle cell	MMP-1, 2, 7, 8, 13, 14 19
III		I, V	heparin, heparan sulfate, PDGF-bb, fibronectin, SPARC, thrombospondin-1		Endothelial cell, Smooth muscle cell	MMP-1, 2, 3, 8, 10, 13, 14
<i>Basement membrane collagen</i>						
IV	Chicken-wire network with lateral association	VI, XIII, XVIII	heparin, heparan sulfate, PDGF-bb, SPARC, HGF, TGF- β , nidogen, perlecan, biglycan, endostatin, thrombospondin-1	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$	Endothelial cell, Smooth muscle cell	MMP-2, 3, 7, 9, 10, 11, 13 19, 26, 25
<i>Regulatory fibril-forming collagen</i>						
V	Stiated fibrils, retain regulatory, noncollagenous N-terminal domains	I, III	heparin, heparan sulfate, SPARC, PDGF-bb, thrombospondin-1	$\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$	Smooth muscle cell	MMP-2, 9
<i>Beaded filament-forming collagen</i>						
VI	Beaded filaments, networks	I, IV, XIV and XVIII (NC1)	heparin, heparan sulfate, SPARC, endostatin, PDGF-bb, TGF- β , biglycan, decorin, matrilin-1, glycoprotein-1	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$	Smooth muscle cell, macrophage	
<i>Network-forming collagen</i>						
VIII	Hexagonal lattices		fibronectin	$\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$	Endothelial cell, Smooth muscle cell, macrophage, monocyte, mast-cell, T-cell	MMP-1, 8
<i>Transmembrane collagen</i>						
XIII	Transmembrane and shed soluble ectodomain	IV	heparin, fibronectin, nidogen-2, perlecan, vitronectin,	$\alpha 1\beta 1$	Endothelial cell	
<i>FACIT collagens</i>						
XIV	Associated with fibrils	I, VI	decorin, tenascin-X, heparin, perlecan	no interactions through integrins	Smooth muscle cell	MMP-2, 9
<i>Multiplexin collagens</i>						
XV	Basement membrane proteoglycans, cleaved C-terminal domains influence angiogenesis	associated with XIX	fibulin-1,2, nidogen-1,2, vitronectin, laminin, fibronectin, perlecan	$\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$	Smooth muscle cell	MMP-3, 7, 9, 13, 14 20
XVIII		IV	heparin, fibulin-1,2, nidogen-1,2, perlecan,			

Collagen type	Supramolecular structure	Interaction with			Cell source	MMP degradation ^d
		other collagens types ^a	other ECM components and growth factors ^b	cells ^c		
<i>FACIT-like collagen</i>						
XVI	Interfacial regions, basement membrane zones	associated with fibrils containing I, III, V collagens	fibrillin-1,-2, fibronectin	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1$	Smooth muscle cell	
XIX		associated with IV, XV, XVIII collagens				

L'arrangement des fibres de collagène explique le comportement anisotropique des artères. Les artères élastiques, près du cœur, ont des propriétés élastiques importantes alors que les artères musculaires, en périphérie, montrent des propriétés viscoélastiques. Même lorsque la charge est nulle, les artères sont toujours sous tension et sous compression. Dans l'intima, l'orientation des fibres de collagène est dispersée et ne participe que très faiblement aux propriétés mécaniques du vaisseau alors que dans la média, les fibres interconnectées avec les couches élastiques et les CML ont une orientation essentiellement circonférentielle (elles forment une hélice de faible pas). Cette conformation permet à la média de résister circonférentiellement à de fortes charges (188). Dans l'adventice, les fibres de collagène ont des orientations variées (avec une orientation moyenne dans la direction circonférentielle) et organisées en vagues (189), rendant celle-ci moins rigide que la média lorsqu'aucune contrainte n'est appliquée. Par contre, lorsque les contraintes sont élevées, les fibres s'allongent et s'étirent afin de se rigidifier et empêcher une distension trop importante de la média (190). Une des propriétés importantes de la paroi vasculaire est son comportement mécanique non linéaire. En effet, sa courbe de contrainte-déformation traduit un comportement élastique pendant les faibles déformations (solicitation de l'élastine) et un comportement plus rigide lors des phases de haute déformation (solicitation du collagène) (191). En d'autres termes, lorsque le volume sanguin augmente pendant la phase de systole, la paroi vasculaire s'agrandit entraînant une dilatation des limitantes élastiques peu rigides, dans un premier temps. Ensuite, quand la déformation augmente, le module élastique augmente également car les fibres de collagène sont sollicitées afin de maintenir l'intégrité structurale de la paroi vasculaire (192). Le module élastique des espèces de mammifères, normalisé en fonction des pressions sanguines, varie entre 0,3 et 1,0 MPa (187).

5. Synthèse in vitro de la MEC pour l'ingénierie tissulaire

5.1. Utilisation des cellules musculaires lisses

Les CML vasculaires sont impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux (vasculogénèse) ainsi que dans la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (angiogénèse). Les CML vasculaires ont des propriétés de plasticité biologique et peuvent avoir deux phénotypes différents : contractile (différencié, peu prolifératif, régulation du tonus vasculaire en réponse à des médiateurs vasoactifs) et sécrétoire (moins différencié, migratoire, prolifératif) (193). Ces phénotypes dépendent de facteurs présents dans la MEC environnante tels que des facteurs de croissance (*PDGF*, *TGF-β*) et des cytokines (181). Les cellules avec un phénotype contractile sont prédominantes dans la paroi vasculaire normale et sont des cellules riches en alpha actine du muscle lisse car c'est une des protéines intracellulaires qui leur permet d'avoir des propriétés contractiles. Ces cellules exercent également des forces mécaniques sur la matrice péricellulaire notamment via l'intégrine $\alpha1\beta1$ qui se lie au collagène et l'intégrine $\alpha7\beta1$ qui se lie à la laminine. Par ailleurs, le phénotype moins différencié des CML vasculaires correspond à leurs capacités à proliférer, migrer et sécréter des protéines de la MEC, comme les collagènes fibrillaires, l'élastine, la fibronectine, la laminine et les protéoglycanes. L'élastine joue un rôle important dans la régulation de ces deux phénotypes puisqu'elle induit la quiescence des CML dans un phénotype contractile. Ce type de cellules, contrairement au premier cité, est pauvre en alpha actine et est souvent associé avec un état pathologique (18).

In vitro, au contact des facteurs de croissance du sérum foetal bovin, ces cellules vont adopter un phénotype prolifératif et sécrétoire qui leur permet de produire des composants de la MEC et sont donc riches en organelles permettant la synthèse protéique (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique granuleux) (193). Ainsi, les CML cultivées sont capables de sécréter une grande variété de protéines de la MEC telles que les collagènes de type I, III, V, VI, XIV, des laminines, des PG et des GAG ainsi que des protéines impliquées dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice (194). C'est cette propriété qui est mise à profit pour l'obtention de substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire détaillée dans la partie IV. Substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire de ce manuscrit. En effet, les équipes de Niklason (96) et de Tranquillo (126) mettent à profit les propriétés des CML pour produire des substituts vasculaires biologiques.

5.2. Utilisation des fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses de 20 à 30 μm de long et de 5 à 10 μm de large, de forme très allongée, en forme de fuseau. Elles ont pour origine le mésoderme et sont présentes dans les tissus conjonctifs. Ces cellules proviennent d'au moins trois origines cellulaires différentes : le mésenchyme primaire, la transition épithélio-mésenchymateuse locale et les précurseurs dérivés de la moelle osseuse (20).

Une étude a proposé le marqueur *FSP-1* (*fibroblast-specific protein-1*) comme marqueur précoce des fibroblastes en mettant en évidence sa présence dans des cellules épithéliales subissant une transition épithélio-mésenchymateuse (195). Malgré tout, à ce jour, les marqueurs utilisés pour identifier ces cellules sont problématiques car tous exprimés dans d'autres types cellulaires ou non présents dans tous les fibroblastes. Par exemple, les marqueurs comme CD105 (*CD*, *cluster differentiation*), CD166, CD90, CD44, CD29, CD73 et CD9 sont tous exprimés à la fois par les fibroblastes et par les cellules souches mésenchymateuses. De plus, ces marqueurs peuvent être exprimés dans certains tissus ou organes (196).

Le rôle principal des fibroblastes est la production de protéines et de polysaccharides afin de former la MEC. Mais de nombreux autres rôles peuvent leur être attribués : ils sont capables de dégrader la MEC qu'ils ont produite, grâce aux métalloprotéinases, pour permettre une régulation de la quantité de tissu conjonctif. Ils produisent aussi des facteurs bioactifs permettant leur communication avec les cellules et le tissu environnants, ils sont capables de communiquer avec les cellules du système immunitaire, et interagissent avec d'autres types cellulaires (cellules épithéliales, endothéliales et musculaires lisses) (21). Ils produisent notamment une grande variété de collagènes dont les collagènes fibrillaires de type I et III, ainsi que de la fibronectine, des PG et des GAG. Ils sont également capables d'organiser les matrices formées et exercer des forces mécaniques grâce à leur interaction avec les molécules qu'elles produisent via leurs récepteurs de surface. En effet, l'intégrine $\beta 1$ permet la liaison entre les protéines de la MEC et le squelette d'actine intracellulaire des fibroblastes (197). Certaines protéines jouent le rôle d'activateur de la synthèse des gènes de collagène comme le *TGF- β* et l'*IL-1* (interleukine-1) et 4. Par ailleurs, la production de collagène est inhibée par d'autres médiateurs tels que le *TNF α* (*tumor necrosis factor α*) et l'*IFN γ* (interféron γ). La régulation de la synthèse de la MEC est cruciale car une production excessive entraîne le phénomène de fibrose qui a lieu lors d'inflammation.

Certains fibroblastes ont la capacité de se différencier dans des types cellulaires plus spécialisés du tissu conjonctif comme les chondrocytes, les ostéocytes et les adipocytes (196). La croissance des fibroblastes est stimulée par un certain nombre de facteurs de croissance. Par exemple, le *PDGF* est libéré par les plaquettes lors de la formation d'un caillot afin de stimuler la prolifération des fibroblastes dans le cadre de la réparation. La famille des *FGF* (*fibroblast growth factor*) ainsi que les *EGF* (*epidermal growth factor*) sont aussi des facteurs de croissance qui participent à la prolifération des fibroblastes. Les fibroblastes peuvent produire ou répondre à une large variété de cytokines qui leur permettent de coopérer avec les leucocytes pendant des processus complexes. Pendant la cicatrisation, par exemple, les leucocytes induisent des changements dans la composition matricielle par les fibroblastes. Du point de vue immunitaire, les fibroblastes expriment de manière constitutive le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I (198), tandis qu'ils expriment très peu le CMH de classe II et uniquement de manière inductible (199) (200). Une étude a montré en 2007 le rôle immunorégulateur des fibroblastes au même titre que celui des cellules souches mésenchymateuses. En effet, les auteurs ont montré une similitude d'immunosuppression entre les deux types cellulaires par inhibition de l'activation des lymphocytes T allogéniques (201).

Différents phénotypes de fibroblastes sont retrouvés : les myofibroblastes sont une sous-population différenciée trouvée en quantité limitée dans le corps et qui se distinguent des autres populations fibroblastiques par la présence de filaments d'alpha-actine de l'isoforme dite « des cellules musculaires lisses » dans son cytoplasme, indiquant un phénotype contractile (20). Cette population est retrouvée au niveau de sites de blessures, est impliquée dans le phénomène de fibrose et sécrète une matrice riche en fibronectine et hyaluronan (202). Les cellules stromales tumorales forment une population spécialisée activée et différenciée au contact de cellules tumorales. Leur principal marqueur est la protéine *FAP* (*fibroblast activation protein*). Bien qu'elles n'aient pas un phénotype cancéreux, elles synthétisent des protéines de la matrice favorisant l'augmentation de la vascularisation tumorale. Les cellules souches mésenchymateuses (*MSC*, *mesenchymal stem cells*) et les fibrocytes sont des cellules similaires aux fibroblastes et dérivées de la moelle osseuse. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en cellules de l'os, du cartilage, du tissu adipeux, du tendon. Les fibrocytes, quant à elles, sont apparentées à des fibroblastes de par leur capacité à produire de la MEC, bien que leur fonction soit identique à celle d'une cellule dendritique (présentatrice d'antigènes). Leur présence dans le tissu conjonctif traduit une fibrose engendrée par une blessure (21).

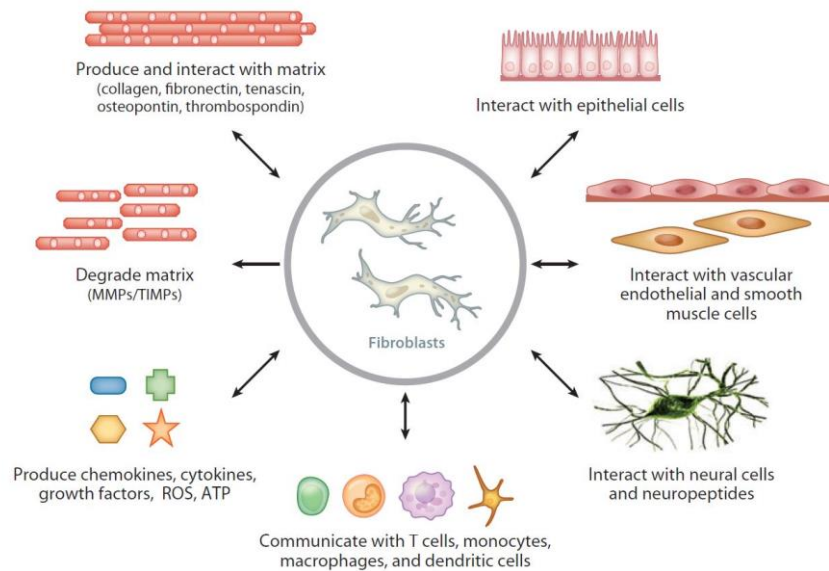


Figure 29 : Rôles des fibroblastes dans la paroi vasculaire (Stenmark et al., 2013)

Dans la paroi vasculaire, les fibroblastes sont responsables de la synthèse de la MEC de l'adventice. Ils ont un rôle de régulation de la fonction de la paroi ainsi que de la synthèse des protéines de la MEC (181). Leurs rôles dans la paroi vasculaire sont résumés dans la *Figure 29* (20). Ils jouent le rôle de senseur et sont les premières cellules activées pour répondre aux stimuli et entraîner un remodelage de l'adventice via une augmentation de leur prolifération. Dans l'adventice, en conditions normales, les fibroblastes restent quiescents, dans un état indifférencié grâce à leurs interactions avec la MEC environnante. Ils sont activés en réponse à un stress ou une blessure, entraînant un changement dans la production et la composition des protéines de la MEC. Lorsqu'ils sont activés, ils peuvent également produire des cytokines pro-inflammatoires et des molécules nécessaires pour la présentation d'antigènes. Ils peuvent aussi participer à la stimulation des lymphocytes T pour communiquer avec les cellules dendritiques et les macrophages environnants et également promouvoir le recrutement de cellules inflammatoires (20).

C'est la propriété de sécrétion de protéines de la MEC par les fibroblastes qui est exploitée dans l'ingénierie tissulaire vasculaire (partie IV de ce manuscrit). Généralement, les fibroblastes utilisés sont extraits du derme de la peau pour des questions d'accessibilité. Ces cellules, cultivées *in vitro* avec de l'acide ascorbique, sont capables d'augmenter leur production de collagènes par rapport à leur synthèse *in vivo* (203). En effet, la production de MEC par ces cellules permet la création d'un tissu organisé de façon similaire à une matrice native, qui comprend une variété de protéines toutes interconnectées les unes avec les autres au sein d'un réseau collagénique très robuste. Cette stratégie permet ainsi d'obtenir un tissu entièrement biologique possédant de bonnes propriétés mécaniques et une activité biologique.

VI. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES REQUISES POUR UN SUBSTITUT VASCULAIRE

La pression artérielle physiologique varie de 80 (pression diastolique) à 120 mmHg (pression systolique) à chaque pulsation. Le cœur d'un homme bat environ à 60 battements par minute ce qui entraîne plus de 315 millions de charges cycliques en 10 ans pour les vaisseaux sanguins (204). C'est pourquoi, lors d'un remplacement de vaisseaux sanguins, le substitut utilisé doit avoir certaines propriétés mécaniques cruciales pour le bon fonctionnement de la greffe. En effet, ces propriétés permettent de garder l'intégrité du tissu face à une déformation permanente. La pression à l'éclatement est un paramètre critique qui permet d'évaluer la résistance aux contraintes hémodynamiques. Comme évoqué dans les parties précédentes, la mauvaise corrélation de compliance entre le vaisseau natif et le substitut entraîne souvent un échec de la greffe. Par ailleurs, le substitut doit être suturable et les anastomoses doivent résister aux tensions exercées sur les points effectués. Pour les substituts composés de fibres tissées ou tricotées, comme le Dacron®, la porosité est une propriété importante afin d'assurer le bon écoulement du sang au sein du greffon. Les propriétés mécaniques de la veine saphène et de l'artère thoracique interne sont souvent utilisées comme valeurs de référence, car ce sont les vaisseaux autologues les plus utilisés dans le cadre d'un pontage. À ce jour, aucun substitut issu de l'ingénierie tissulaire ne possède des propriétés mécaniques idéales (Figure 30) (140).

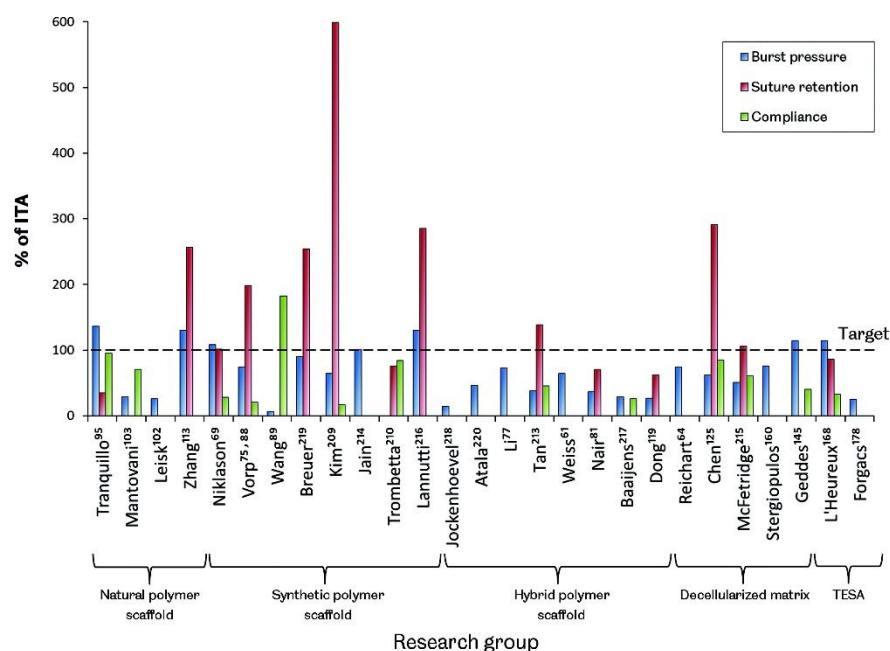


Figure 30 : Pression à l'éclatement, résistance à l'arrachement de sutures et compliance de substituts vasculaires obtenus par ingénierie tissulaire (Pashneh-Tala et al., 2015)

Comme évoqué précédemment, dans les vaisseaux natifs, les fibres élastiques sont les premiers éléments du vaisseau à être engagés en réponse à une pression faible puis ce sont les fibres de collagène qui prennent en charge les forces liées à la pression plus élevée en rigidifiant la paroi vasculaire par étirement. Ce phénomène explique la courbe typique contrainte-déformation en forme de J, traduisant le comportement non linéaire des vaisseaux sanguins qui permet de dissiper l'énergie en minimisant la fatigue du matériau (Figure 31) (74).

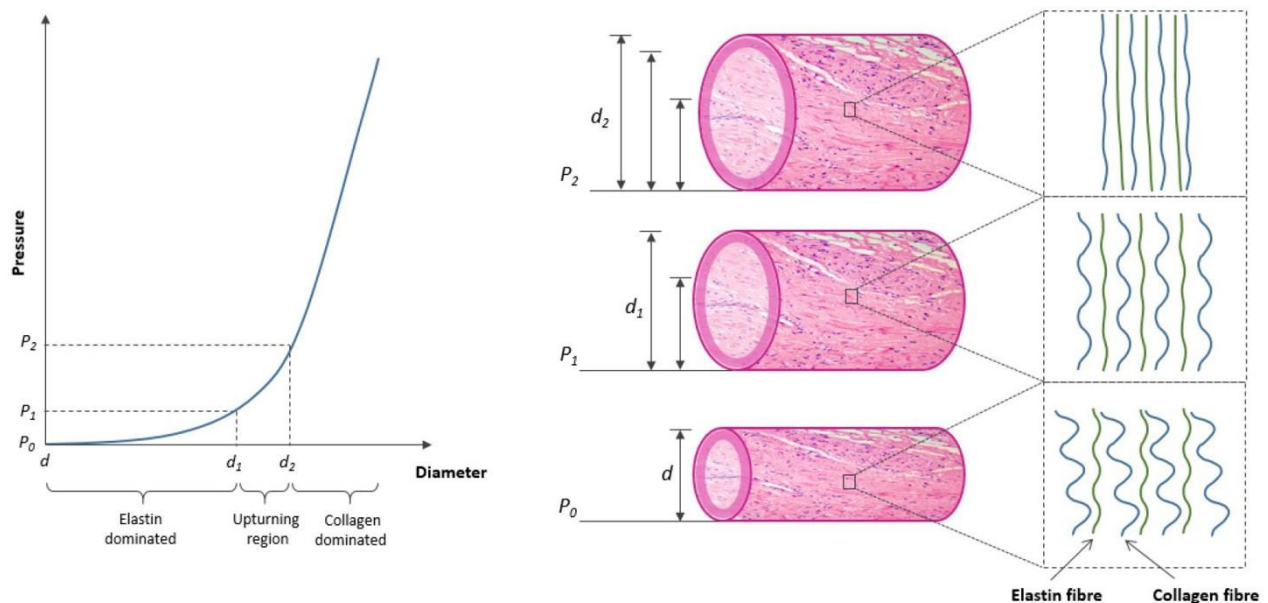


Figure 31 : Courbe contrainte-déformation (pression-diamètre) d'une artère native (D'après Singh et al., 2015)

Les substituts synthétiques permanents disponibles en clinique, quant à eux, sont toujours incapables de correspondre aux propriétés mécaniques des vaisseaux natifs et c'est ce qui explique notamment leur échec, pour les greffes de vaisseaux sanguins de petit calibre. En effet, le Dacron®, par exemple, a une structure homogène qui possède peu de propriétés élastiques et une réponse quasiment linéaire quelles que soient les contraintes apportées. Il en résulte des valeurs de compliance faibles surtout en comparaison avec les valeurs d'une artère native (Table 4) (74).

Par ailleurs, pour la création d'un pontage artério-veineux, la compliance du substitut est d'autant plus importante que le flux est particulièrement perturbé dans ce cas de figure. Les équipes développant des substituts issus de l'ingénierie tissulaire doivent donc porter une attention toute particulière à cette propriété. En effet, le flux sanguin engendré par la création du pontage est supérieur à 1 L/min avec une pression comprise entre 80 et 100 mmHg.

La connexion créée entre une veine compliant et un substitut rigide (dans le cas d'un pontage avec du *ePTFE*) perturbe de manière drastique les paramètres hémodynamiques de la veine connectée, notamment par une augmentation des contraintes de cisaillement, conduisant souvent à de l'hyperplasie intinale, de la sténose, de la thrombose et même une occlusion (205). De plus, le flux sanguin devient turbulent et crée un vortex à cause de l'augmentation de la vélocité (vitesse du flux sanguin) et de l'angle de suture (206).

1. Compliance

La compliance désigne la capacité de distension d'un vaisseau sanguin et donc à changer son diamètre interne en fonction de la pression exercée. Elle est liée à l'élasticité circonférentielle d'un vaisseau en réponse à la pression pulsatile sanguine. Elle est exprimée en pourcentage d'augmentation du diamètre par 100 mmHg pour une plage de pression donnée. La mauvaise corrélation de compliance entre une artère et un implant est une cause de complications à long terme de la greffe car elle provoque des troubles au niveau du flux sanguin et du stress au niveau des anastomoses, stimulant l'hyperplasie intinale qui mène à des sténoses et même des thromboses (74). En effet, une corrélation quasi linéaire a été montrée entre la compliance et le pourcentage de perméabilité d'un vaisseau (207) (208). Les anastomoses sont les zones les plus difficiles à contrôler en terme de compliance, car elles sont le siège de fortes variations, notamment à cause des changements de géométrie et de structure qui ont lieu à cet endroit (209).

La compliance est déterminée avant l'implantation *in vivo* selon la norme ISO 7198 : 1998. Le principe du test repose sur l'utilisation d'un système permettant de générer un flux pulsé à l'intérieur du substitut relié à un système permettant de mesurer la pression résultante à l'intérieur du greffon. Ainsi, le substitut vasculaire d'environ 6 cm de longueur est pressurisé avec un fluide de circulation, généralement de l'eau distillée. Le diamètre externe du vaisseau est mesuré à différents paliers de pression, grâce à un dispositif d'enregistrement.

Table 4 : Comparaison de compliance entre du Dacron et des vaisseaux natifs (Singh et al., 2015)

Structure	Compliance (mmHg × 10 ⁻²)
Artery	7.4
Vein	2.7
Dacron [®] Polyester (Woven)	1.9
Dacron [®] Polyester (Knitted)	2.3

Le diamètre interne est ensuite calculé grâce à l'épaisseur de la paroi du substitut. La compliance (rapportée à 100 mmHg) est donnée par l'équation : $\% \text{ compliance}/100 \text{ mmHg} = ((d_{i2}-d_{i1})/d_{i1})/(p_2-p_1) \times 10^4$, où d_{i2} correspond au diamètre interne systolique, d_{i1} au diamètre interne diastolique, p_2 à la pression intra-luminale systolique et p_1 à la pression intra-luminale diastolique.

Bien que la compliance soit un paramètre critique pour l'obtention d'une bonne perméabilité, les processus de remodelage des vaisseaux après implantation peuvent avoir des effets importants sur celle-ci. En effet, un substitut vasculaire généré par auto-assemblage avait une compliance de 8,8%/100 mmHg 6 mois après implantation chez un patient alors qu'elle était seulement de 3,4%/100 mmHg avant l'opération (148).

2. Pression à l'éclatement

Il s'agit d'évaluer la résistance du substitut sous haute pression afin de s'assurer que le greffon n'éclate pas lorsqu'un flux sanguin lui est appliqué.

Pour la mesurer, le substitut vasculaire est pressurisé progressivement sur un banc, muni d'un système d'enregistrement de la pression intra-luminale, jusqu'à ce que le substitut éclate. La pression ainsi obtenue est à mettre en balance avec le diamètre du substitut. En effet, selon la loi de Laplace, la pression à l'éclatement augmente linéairement avec la diminution du diamètre si l'épaisseur de la paroi vasculaire est maintenue constante (148). Bien que ce paramètre soit largement utilisé pour l'évaluation des propriétés mécaniques d'un substitut, la méthodologie utilisée pour mesurer cette pression peut influencer le résultat (210).

Pour les vaisseaux natifs, les valeurs moyennes de résistance à l'éclatement sont de 3196 ± 1264 mmHg pour l'artère thoracique interne et de 1599 ± 877 mmHg pour la veine saphène (148), soient des valeurs environ 20 et 10 fois plus élevées que la pression systolique physiologique, respectivement. Il est important que ces valeurs soient très au-delà des valeurs physiologiques afin de prévenir et pallier les problèmes d'hypertension artérielle, d'augmentation brutale du flux sanguin, etc. En ce qui concerne les substituts issus de l'ingénierie tissulaire, des valeurs très proches des valeurs de pression à l'éclatement des vaisseaux natifs ont été obtenues par plusieurs groupes, notamment Tranquillo, Zhang, Breuer, Lanutti, Geddes et L'Heureux (*Figure 29*). Ces valeurs doivent être d'autant plus importantes avant implantation que le remodelage pourrait avoir des effets délétères sur la résistance du substitut aux fortes pressions.

3. Résistance à l'arrachement des sutures

La résistance à l'arrachement des sutures est aussi une propriété majeure pour l'évaluation d'un substitut vasculaire. En effet, le chirurgien doit être capable de manipuler et de suturer le greffon sans que celui-ci ne se dégrade même dans des conditions de routine ou sous-optimales. Définir un seuil de résistance à atteindre est difficile puisque ce paramètre va dépendre de la flexibilité dont dispose le chirurgien pour utiliser différentes tailles de fils, le nombre de points effectués, etc. Certains auteurs ont décidé de choisir un seuil de 0,5 N comme valeur minimale à atteindre, bien qu'il soit en-deçà des valeurs de suturabilité de l'artère thoracique interne : $1,38 \pm 0,5$ N (148). Le test de résistance à l'arrachement des sutures détermine la force de traction qu'il faut exercer sur un fil jusqu'à son arrachement de la prothèse ou sa rupture. Le fil et la prothèse sont maintenus dans des mors qui sont écartés à vitesse constante, la force de traction augmente progressivement jusqu'à rupture (125). Globalement, les valeurs obtenues par les différents groupes de recherche montrent que les matrices naturelles sont bien en-deçà de celles d'une artère native, mais ces valeurs sont améliorées lorsque les matrices sont combinées aux matrices synthétiques (très résistantes) (Figure 29).

4. Porosité et étanchéité

Les propriétés de porosité et d'étanchéité sont deux notions complémentaires. En effet, il serait idéal que la paroi du substitut soit suffisamment poreuse afin de permettre la colonisation et l'infiltration des cellules de l'hôte pour permettre le remodelage, mais de manière raisonnable, afin d'éviter des complications chirurgicales dues à une perte de sang transpariétale (211). Dans une certaine mesure, l'adsorption des protéines du sang sur la paroi va permettre d'assurer une étanchéité malgré une certaine porosité pré-opératoire (212). La porosité est mesurée par la quantification de vide dans la structure des substituts. L'étanchéité est évaluée avant implantation en quantifiant la perméabilité à l'eau du substitut. Pour cela, le volume d'eau écoulé au travers de la surface poreuse est mesuré pendant une minute sous une pression de 120 mmHg et rapporté à l'aire de la surface (211). Les valeurs obtenues sont uniquement comparables entre différents substituts puisque ce test ne peut pas être assimilé à l'écoulement physiologique du sang. À titre de comparaison, certains substituts vasculaires tissés commercialisés montrent des valeurs au-dessus de 350 ml/min/cm² (213).

VII. RÉPONSE DE L'HÔTE À L'IMPLANTATION D'UN PRODUIT D'INGÉNIERIE TISSULAIRE

Lors de l'implantation d'un biomatériau, plusieurs événements peuvent s'enchaîner selon la nature de l'implant. Dans le cas d'un matériau synthétique permanent, une réponse des cellules de l'hôte va entraîner son encapsulation afin de créer une barrière protectrice entre le corps étranger et le tissu environnant. Par contre, pour un matériau synthétique biodégradable, la réponse de l'hôte va permettre sa dégradation tout en remodelant le greffon par les cellules de l'hôte. Les matériaux d'origine naturelle, quant à eux, peuvent même être intégrés au niveau du site d'implantation.

1. Réponse à un corps étranger

Tous les biomatériaux entraînent une réponse cellulaire et tissulaire lorsqu'ils sont implantés *in vivo*, appelée réponse à un corps étranger (*FBR, foreign body response*). Si le corps étranger est petit et assez superficiel, il va être expulsé par le corps tandis que s'il est trop profond ou large pour être extrudé, il sera encapsulé pour former une barrière de protection entre lui et l'environnement de l'hôte. Ce sont les composants du système immunitaire inné qui sont les premiers à répondre lors de l'implantation d'un biomatériau. Lors des dommages mécaniques au niveau du tissu conjonctif vascularisé du site d'implantation, en quelques secondes seulement, il y aura une adsorption immédiate de protéines par interaction avec le sang, afin de créer une matrice provisoire à la surface du biomatériau (*Figure 32*).

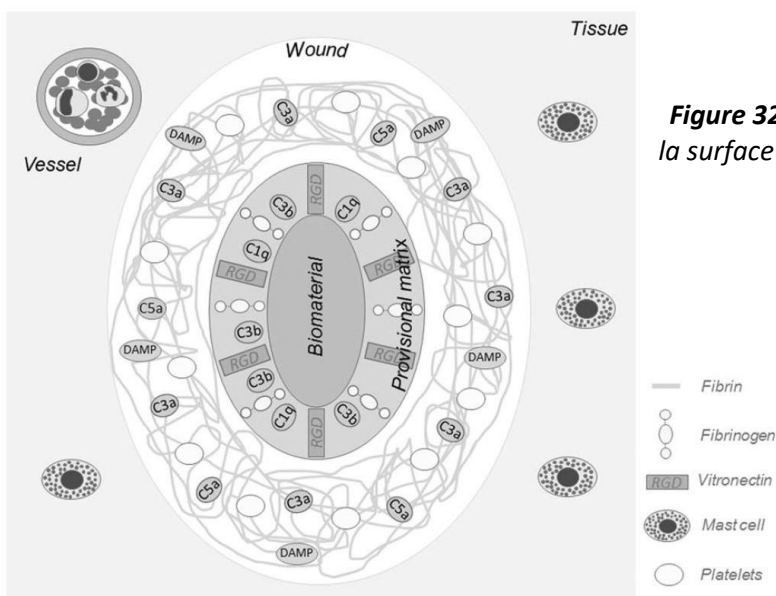


Figure 32 : Formation d'une matrice provisoire à la surface du biomatériau (Klopffleisch et al., 2016)

L'adsorption des protéines est décrite par l'effet de Vroman. Les protéines à haute mobilité comme l'albumine sont adsorbées en premier et sont remplacées par des protéines moins mobiles comme le fibrinogène, le kininogène de haut poids moléculaire, la fibronectine et la vitronectine. La quantité de ces deux dernières protéines est un paramètre important pour l'adhésion des monocytes et la formation de cellules géantes grâce aux interactions via les intégrines. L'adsorption des protéines est très dépendante des caractéristiques de surface des biomatériaux (214).

Le fibrinogène qui s'adsorbe directement sur la surface du biomatériau permet la formation d'un réseau dense de fibrine qui permet le recrutement des leucocytes. La matrice provisoire ainsi créée est riche en chimioattractants (*TGF-β*, *PDGF*, *IL-1*, facteur von Willebrand *vWF*, facteur plaquettaire 4 *PF4*, P-sélectine), cytokines et facteurs de croissance capables de recruter les cellules immunitaires innées (notamment les macrophages) au niveau du site de l'implantation au cours de la phase suivante (215).

L'activation de la cascade du complément est également impliquée dans la formation de la matrice en générant des quantités élevées de C3a et C5a qui sont des chimioattractants forts pour les cellules phagocytaires et de puissants stimulants pour la dégranulation des mastocytes et des neutrophiles. Le C3b agit comme un ligand pour l'adhésion des leucocytes via des intégrines (216).

L'inflammation aigüe constitue la deuxième phase de la réaction à un corps étranger et est caractérisée par l'infiltration de neutrophiles et de mastocytes, une dilatation des vaisseaux sanguins et une augmentation du flux sanguin au niveau du site de l'inflammation (152). C'est une réaction courte pouvant aller de quelques heures à quelques jours (Figure 33).

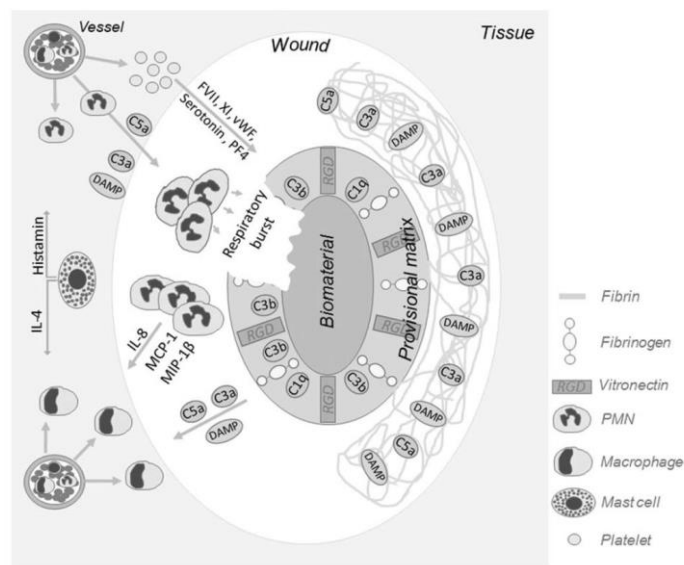


Figure 33 : Recrutement de neutrophiles et mastocytes pendant la phase aigüe de l'inflammation (Klopfeisch et al., 2016)

Ce sont les dommages tissulaires causés par l'implantation qui entraînent cette réponse, notamment par la libération de motifs moléculaires associés à un dommage (*damage-associated molecular patterns, DAMP*) comme l'ATP (adénosine triphosphate), l'acide urique, les lipides bioactifs et les protéines de choc thermique. Ces *DAMP* sont reconnus par les neutrophiles et les mastocytes qui migrent alors vers le site de l'inflammation. En parallèle, comme évoqué précédemment, des facteurs présents dans la matrice provisoire sont capables d'entraîner l'infiltration des neutrophiles puis des macrophages. Les neutrophiles et les mastocytes sont activés ce qui permet leur dégranulation aboutissant au relargage de chimiokines : histamine, interleukine-4 IL-4, interleukine-13 IL-13, interleukine-8 IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1 MCP-1*, *macrophage inflammatory protein-1 β MIP-1 β* . Ces facteurs permettent le recrutement de leucocytes supplémentaires y compris les macrophages, engageant la phase chronique de l'inflammation (215).

Cette phase est caractérisée par la présence de macrophages, aux propriétés phagocytaires, au niveau du site de l'inflammation. Ils ont pour origine les monocytes circulants (provenant de précurseurs de la moelle osseuse) et des macrophages résidents générés pendant le développement embryonnaire. (Figure 34).

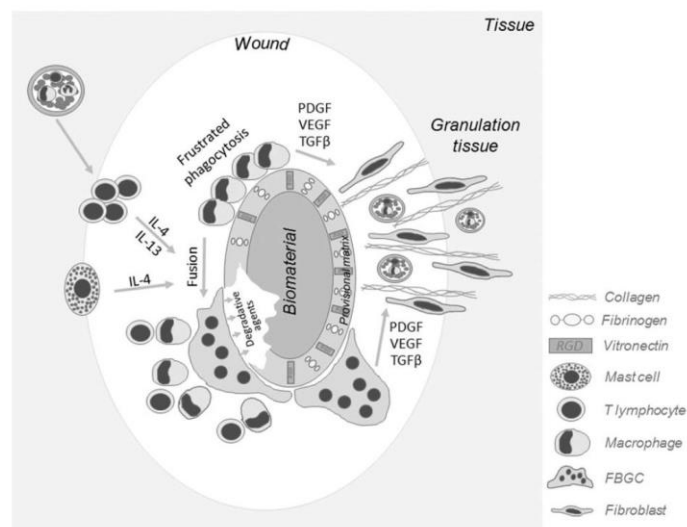


Figure 34 : Phase chronique de l'inflammation avec recrutement de lymphocytes et de macrophages qui fusionnent en cas d'échec de phagocytose pour former des cellules géantes (Klopfleisch et al., 2016)

Les macrophages via les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ peuvent interagir avec la matrice provisoire et le biomatériau afin d'en couvrir la surface. Les macrophages assemblés relarguent des signaux chimioattractants supplémentaires (*PDGF*, *TNF- α* , interleukine-6 IL-6, *granulocyte-colony stimulating factor G-CSF* et *granulocyte macrophage-colony stimulating factor GM-CSF*) afin de recruter d'autres macrophages (214).

Les macrophages peuvent ainsi se différencier majoritairement en deux types de macrophages. Les macrophages M1 (dits macrophages activés), induits notamment par l'interféron- γ (IFN- γ) et des lipopolysaccharides bactériens (LPS), pro-inflammatoires qui sécrètent IL-1, IL-6, IL-8 et *TNF- α* accentuent l'inflammation en essayant de dégrader le biomatériau par phagocytose et relargage de *ROS (reactive oxygene species)* et d'enzymes lysosomales. Ils ont également une haute capacité de présentation d'antigènes et permettent la différenciation des lymphocytes Th1 (217).

Les macrophages M2 (dits macrophages alternativement activés), induits par IL-4 et IL-13, ont des propriétés plutôt anti-inflammatoires grâce à la sécrétion d'IL-10 et de *TGF- β* afin d'entraîner le remodelage du tissu environnant par les métalloprotéinases matricielles et la réparation tissulaire via la vascularisation (215). Trois sous-types de macrophages M2 existent : M2a, M2b et M2c. Les interleukines IL-4 et IL-13 conduisent à l'activation des M2a. Les complexes immuns, les *TLR (toll-like receptors)* et les agonistes des récepteurs de l'IL-1 permettent l'activation des M2b. L'IL-10 induit préférentiellement un phénotype M2c (218).

Ce phénomène, appelé la polarisation des macrophages, désigne le changement entre les deux phénotypes M1 et M2 en fonction du microenvironnement. Ces deux états constamment présents peuvent ainsi être exploités pour favoriser des mécanismes de remodelage constructif qui minimisent la réaction inflammatoire (219).

Les lymphocytes, quant à eux, sont également attirés par les cytokines sécrétées par les macrophages. Les lymphocytes T CD4+ sont les lymphocytes majoritairement présents au niveau du site de l'inflammation et produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-13. Ils sont également impliqués dans le changement de phénotype des macrophages (M1 vers M2) et la formation d'un granulome (215).

La formation de ce granulome fait suite à la fusion des macrophages en cellules géantes (*FBGC, foreign body giant cells*) qui a lieu lorsque les macrophages seuls ne sont pas capables d'avoir une fonction phagocytaire, afin d'éviter leur apoptose. Ces cellules sont très grosses (plusieurs centaines de μm) et possèdent des dizaines de noyaux (on les appelle également cellules géantes multinucléées). C'est le type cellulaire le plus persistant lors d'une réponse à un corps étranger et il entraîne la dégradation du matériau à long terme, ce qui a pour conséquence l'échec du dispositif implantable lorsqu'il est synthétique permanent. Il est également la source de la formation d'un granulome qui correspond à une capsule fibrotique qui entoure le matériau (*Figure 35*).

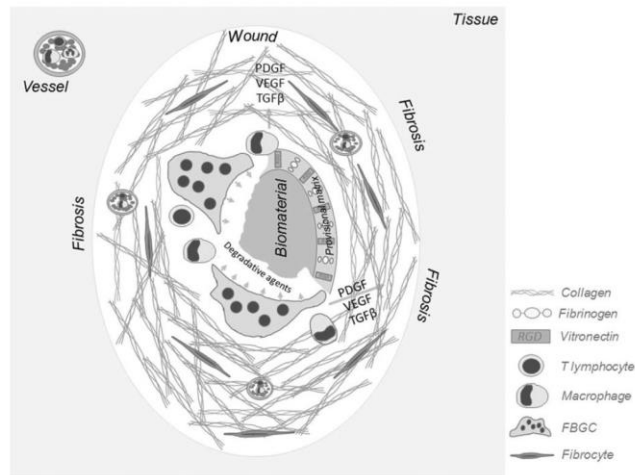


Figure 35 : Formation d'un granulome, capsule fibrotique, qui entoure le matériau (Klopfleisch et al., 2016)

Cette capsule est particulièrement formée sous l'influence d'IL-4 et IL-13, sécrétées par les macrophages M2 mais elle est aussi influencée par des facteurs de croissance pro-fibrotiques et angiogéniques tels que le *PDGF*, le *VEGF*, et le *TGF-β*. Ces facteurs sont sécrétés par un ensemble de cellules qui peuvent être d'origine immunitaire, des kératinocytes et des fibroblastes, des cellules adipeuses, etc. Ces facteurs attirent et activent également les fibroblastes, qui produisent du collagène et d'autres protéines de la MEC, contribuant ainsi à la formation du granulome. Des enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéinases sont sécrétées par des macrophages et/ou des cellules endothéliales et ont un rôle dans le remodelage de la MEC. Dans un premier temps, ce tissu est plutôt composé de macrophages phagocytaires, de fibroblastes synthétisant des fibres de collagène et de capillaires puis devient moins cellulaire afin de constituer un tissu fibrillaire dense qui constitue une barrière d'interaction avec le tissu environnant (215).

2. Réponse à une matrice naturelle ou synthétisée *in vitro*

Comme évoqué précédemment, l'utilisation de matrices naturelles ou synthétisées *in vitro*, qu'elles soient des allogreffons ou des xélogreffons, fixées ou non, décellularisées ou non, synthétisées par des cellules *in vitro* ou non, est une stratégie de plus en plus répandue dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Par ailleurs, les matrices faisant appel à des techniques de décellularisation ont été les plus étudiées *in vivo* et notamment au niveau de la réponse inflammatoire.

L'utilisation des matrices synthétisées *in vitro* par des cellules est beaucoup plus récente et un paradigme général ne peut encore être établi, bien souvent par manque de données post-implantation.

La MEC utilisée dans ce cas ne va pas subir les réactions de l'hôte face à un corps étranger classiques. En effet, comme un matériau complètement naturel, les matrices utilisées présentent une architecture, un design biomoléculaire et une composition biologique physiquement et biochimiquement très proches, dites natives, et permettent une réponse orientée vers la cicatrisation plutôt que vers l'encapsulation (220). La cicatrisation suite à une blessure peut être décrite selon 3 phases majeures : inflammation, prolifération et remodelage (*Figure 36*) (221).

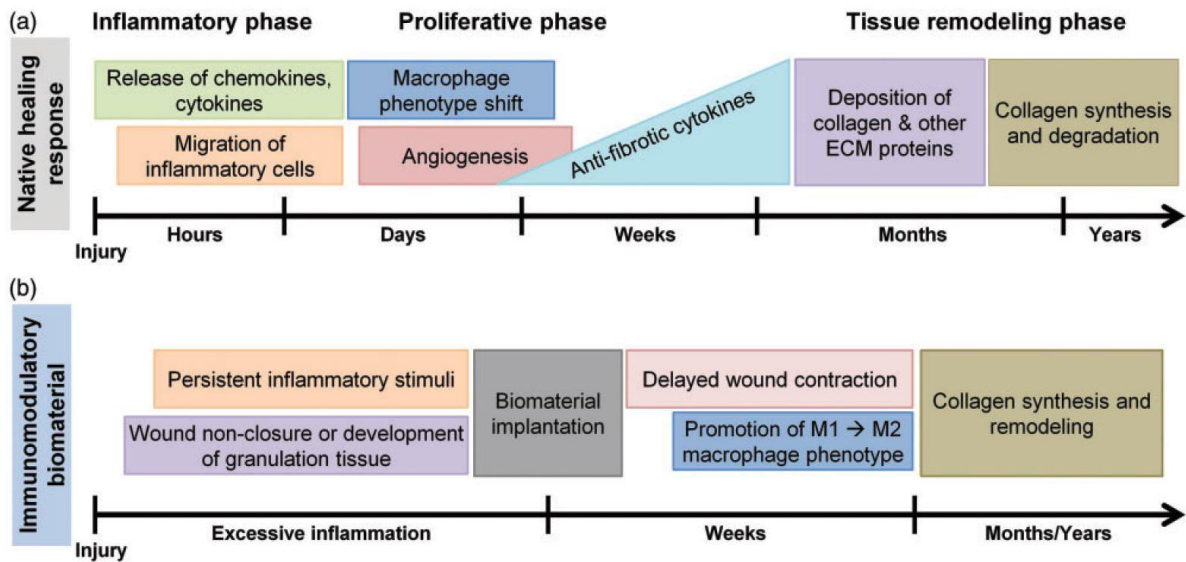


Figure 36 : Réponse normale du corps lors de la cicatrisation vs réponse immunomodulatrice lors de l'implantation d'un biomatériau (Hortensius et al., 2016)

Pendant la phase d'inflammation, qui a lieu immédiatement après les dommages tissulaires, la production de chimiokines, par les cellules de l'inflammation telles que les neutrophiles et les macrophages au niveau du site de la blessure, est stimulée par le *PDGF* et le *TGF-β*. Les cytokines pro-inflammatoires (*TNF-α* et *IL-1*) sont sécrétées puis les macrophages subissent une transition vers un phénotype anti-inflammatoire permettant la synthèse de protéines de la MEC via le recrutement de fibroblastes. Finalement, la phase de remodelage, grâce aux progéniteurs et cellules souches endogènes, permet simultanément de synthétiser du collagène tout en dégradant la MEC. Un certain nombre d'étapes sont communes lors de l'implantation d'un matériau aux propriétés immunomodulatrices (222).

En effet, au contact du biomatériau, les neutrophiles viennent s'infiltrer au niveau du site de l'implantation, suivis par des macrophages qui changent rapidement de phénotype, passant du

phénotype M1 pro-inflammatoire, au phénotype M2 immunomodulateur. Ce dernier favorise le remodelage dès les premières semaines de l'implantation (223).

Si on s'intéresse aux matrices naturelles décellularisées, cas de figure pour lequel le recul est suffisant pour avoir une idée globale des mécanismes en jeu, on s'aperçoit que ces matrices entraînent une régénération tissulaire, contrairement aux produits synthétiques qui provoquent une encapsulation. En effet, les techniques utilisées pour la décellularisation essaient de garder la composition et les propriétés architecturales et chimiques de la MEC les plus natifs possibles. Ainsi, la MEC implantée va s'orienter vers une réponse de régénération afin de synthétiser une nouvelle MEC plutôt que celle d'une inflammation chronique (220). En effet, 24 à 48h après l'implantation, les neutrophiles vont infiltrer le matériau et commencent à dégrader le matériau tout en relargant des cytokines. Ces cytokines permettent le recrutement des macrophages après 48h au niveau du site d'implantation afin de diminuer la réponse inflammatoire. Celle-ci tend progressivement vers un phénotype de remodelage constructif par transition des macrophages M1 en M2. Tandis que le matériau est dégradé, les fibroblastes et les cellules souches sont alors recrutés au site d'implantation et synthétisent une nouvelle matrice afin de créer un tissu fonctionnel (224).

Toutefois, si cette décellularisation n'est pas totale, les résidus restant au sein de la MEC, et notamment l'ADN, peuvent avoir un effet délétère sur la réponse de l'hôte (225). En effet, des résidus cellulaires entraînent la formation d'une cicatrice plutôt que d'un tissu fonctionnel. De plus, ces résidus vont altérer la transition d'un phénotype M1 vers M2. L'ADN résiduel est reconnu comme étant un *DAMP* par interaction avec *TLR9*. D'autres *DAMP* ont été identifiés tels que *HSP* (*heat shock proteins*), les molécules *S100* et *HMGB1* (*high mobility box group 1*) (224). Pour prédire l'efficacité de la décellularisation, un seuil est largement utilisé par les chercheurs utilisant cette technique : la décellularisation serait suffisante si moins de 50 ng d'ADN par mg de tissu sec sont retrouvés, avec des fragments d'ADN inférieurs à 300 paires de bases. Cette valeur reste cependant très arbitraire et nécessite des études plus approfondies puisque la réponse immunitaire d'un hôte est stimulée avec des fragments d'ADN de seulement 24 paires de bases (220).

Les mécanismes liés aux propriétés immunomodulatrices générées lors de l'implantation de matrices décellularisées ne sont pas bien connus. Des hypothèses évoquent le fait que l'élimination des complexes majeurs d'histocompatibilité entraînerait une réponse anti-inflammatoire *in vivo*, permettrait une diminution de la prolifération des lymphocytes T *in vitro*, une diminution d'expression d'IL-1 et d'IFN- γ (221).

La dégradation du matériau dépend de sa densité et des traitements qu'il a subi, comme la réticulation chimique par exemple. Cette méthode est souvent utilisée pour augmenter les propriétés

mécaniques du matériau ainsi que pour masquer les antigènes. Ce traitement est reporté comme étant très délétère, favorisant le phénotype pro-inflammatoire M1 et l'encapsulation (223).

Les protéines de la MEC sont très conservées à travers les espèces et sont donc faiblement immunogéniques. Toutefois, l'épitope α -gal présent chez les mammifères non-primates a été identifié comme étant à la source de réponse inflammatoire et même de rejet. Ce problème concerne uniquement les xéno greffes puisque les humains sécrètent naturellement l'anticorps anti-gal (220).

Une alternative aux matrices naturelles décellularisées sont les matrices synthétisées *in vitro* à partir de cellules en culture. Cette approche reste toujours très récente et aucun paradigme ne peut encore être établi. De plus, dans ce cas, une étude approfondie de la réponse inflammatoire manque toujours et notamment parce que les études utilisant cette stratégie font appel à des animaux immunodéficients. Pour les implantations chez l'humain, l'explantation des échantillons n'est pas possible donc les études sont limitées (224).

Dans le contexte des substituts vasculaires, 4 groupes ont utilisé l'approche des matrices synthétisées *in vitro* par des cellules : Niklason, Tranquillo et Auger avec décellularisation avant implantation et L'Heureux, sans décellularisation. Dans ce contexte, le remodelage, s'il a lieu, doit être finement régulé afin d'éviter la sténose ou la dilatation du substitut implanté.

Le groupe de Niklason utilise un échafaudage biodégradableensemencé avec des CML lisses cultivées dans un bioréacteur pendant 8-10 semaines. Cette stratégie a permis d'obtenir dès 1999 des substituts vasculaires autologues et endothélialisés, implantés chez le porc pendant 4 semaines (226). Malheureusement, très peu d'informations ont été publiées quant à la réponse inflammatoire. Dix ans plus tard, ce même groupe a utilisé une stratégie similaire mais en utilisant des CML humaines issues de cadavres afin d'obtenir une matricée synthétisée *in vitro* qui sera par la suite décellularisée (113). L'implantation chez le babouin, sans endothélialisation préalable, pour des substituts de 6 mm de diamètre interne et l'implantation chez le chien, avec endothélialisation autologue, pour des substituts de petit calibre ont montré un remodelage considérable. En effet, un tissu lâche fibreux s'est formé autour du substitut mais sans formation d'un tissu fibrotique. Trois mois après implantation, de l'élastine a été marquée dans les régions fortement infiltrées par les cellules de l'hôte mais pas au milieu de la greffe. Des cellules positives pour l'actine α des muscles lisses ont été retrouvées tout le long du substitut. Ce marquage ne permet pas de distinguer si ces cellules sont des myofibroblastes (et donc des marqueurs d'un tissu fibrotique) ou des CML (et donc des marqueurs d'un remodelage réparateur). De plus, des cellules endothéliales ont été observées au niveau de la lumière du greffon.

Des analyses de sang ont permis de montrer qu'il n'y avait pas de prolifération des cellules T chez le babouin, aucun signe de calcification n'a été détecté et aucune cellule géante associée à la réponse à un corps étranger non plus.

En 2016, des études cliniques ont été menées et 16 semaines après implantation, une infiltration importante de monocytes a été mise en évidence, au niveau de la surface abluminale, ainsi que des cellules positives à l'actine α des muscles lisses. À 55 semaines, les résultats ont montré une diminution du marquage des monocytes mais une augmentation du marquage des cellules positives à l'actine α des muscles lisses, montrant ainsi une progression de la réponse de l'hôte. Toutefois, l'explantation à 55 semaines n'a été effectuée que sur un seul greffon. Les substituts ont été complètement réendothélialisés et contenaient très peu de lymphocytes B ou T (96).

Le groupe de Tranquillo a étudié l'implantation de matrices synthétisées *in vitro* par des cellules chez le gros animal. Sa stratégie repose sur la culture de fibroblastes sur un échafaudage de fibrine pendant plusieurs semaines afin d'obtenir une matrice qui sera par la suite décellularisée. L'implantation dans l'artère fémorale de brebis a montré un remodelage important du substitut. En effet, 24 semaines après implantation, la concentration en collagène a fortement augmenté par rapport aux valeurs à 8 semaines, atteignant les valeurs de l'artère native. À 24 semaines, aucune région acellulaire n'a été retrouvée, ce qui prouve la colonisation du substitut par les cellules de l'hôte (majoritairement des cellules positives à la fois pour l'actine α des muscles lisses et pour la calponine). À 8 semaines, des marquages CD45, CD3 et CD11b positifs ont mis en évidence la présence de lymphocytes T et de macrophages. À 24 semaines, ces marquages ont diminué (124). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'implantation du substitut chez de jeunes agneaux (125). Récemment, des implantations chez le babouin ont montré une colonisation par les cellules de l'hôte très étendue à 3 mois et 6 mois après implantation. Par ailleurs, des cellules immunitaires et inflammatoires ont été retrouvées de façon éparse (éosinophiles, leucocytes polymorphonucléaires, lymphocytes et macrophages). Des injections intradermiques de greffon homogénéisé ont montré un test négatif puisqu'aucune réaction n'a été détectée. De plus, les concentrations sanguines en immunoglobulines étaient proches des valeurs seuil (126).

La technologie d'obtention d'une matrice par synthèse d'un feuillet de matrice extracellulaire par des fibroblastes *in vitro* a été exploitée par les équipes d'Auger et de L'Heureux. La première équipe a utilisé la décellularisation avant implantation tandis que la deuxième s'en affranchissait. En 2016, le groupe d'Auger a implanté pendant 6 mois des substituts obtenus par enroulement de feuillets chez des rats immunocompétents. Les analyses sanguines montraient des taux normaux de neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles.

La protéine C réactive, marqueur de l'inflammation, n'a pas été détectée. Après 6 mois, le remodelage n'était pas total puisque les cellules de l'hôte n'ont pas été retrouvées au milieu du greffon, bien que des cellules positives à l'actine α des muscles lisses et la calponine aient été marquées au niveau de la surface luminale, au milieu du greffon. Par ailleurs, de la délamination était visible bien qu'aucun signe de dégradation n'ait été observé (227).

L'équipe de L'Heureux a fait le pari de ne pas utiliser de décellularisation afin de protéger la structure et l'organisation natives de la MEC synthétisée par des fibroblastes. Des implantations à long terme ont été réalisées en 2006 chez plusieurs modèles animaux immunosupprimés : rats, chiens et primates (142). Les greffons humains implantés dans l'aorte abdominale de rats immunodéficients pendant 6 mois ont été remodelés par les cellules de l'hôte : des cellules positives à l' α -actine étaient retrouvées entre l'adventice et la membrane interne. De plus, des protéoglycanes étaient marquées à 6 mois alors qu'elles n'étaient pas présentes à 90 jours. Chez le primate, une faible réponse immunitaire était observée mais le remodelage par les cellules de l'hôte correspondait aux observations faites dans le modèle de rats. De plus, la formation d'un endothélium confluent a été démontrée par marquage du facteur von Willebrand. Dans l'étude clinique publiée en 2009, des fortes concentrations en IgG ont été reportées (143). La cause de cette réaction immunitaire provenait de l'utilisation d'un sérum foetal bovin provenant de Nouvelle-Zélande. Elle n'était pas observée pour les greffons cultivés avec un sérum provenant des États-Unis. En 2011, dans le cadre de la création urgente d'un abord vasculaire, un greffon humain autologue dévitalisé a été implanté chez un patient qui ne pouvait plus recevoir de fistule artério-veineuse native (144). Les résultats récoltés après 8 semaines d'implantation ne montraient pas de réactions indésirables face à l'implantation d'une matrice dévitalisée. Dernièrement, 3 patients ont reçu des greffons allogéniques, non vivants et non endothélialisés comme abord vasculaire (145). Aucune dégradation n'a été observée, le taux de lymphocytes était stable et les résultats du *PRA* (*panel reactive antibody*) étaient négatifs 24 semaines après implantation. Ces résultats montrent l'innocuité des greffons allogéniques et la possibilité d'utiliser une matrice dévitalisée sans avoir recours à la décellularisation.

En conclusion, il semble que toutes les techniques permettant la production de matrices synthétisées *in vitro* et faisant appel à la décellularisation montrent une réponse inflammatoire légère et immunomodulatrice. En effet, tous les substituts étaient recolonisés par des cellules de l'hôte afin de synthétiser une nouvelle matrice. Les résultats sans décellularisation montrent que la présence de cellules allogéniques, même mortes, ne porte pas préjudice à l'intégration du tissu et à son remodelage *in vivo*. Cependant, des études plus poussées sur la réponse inflammatoire sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu lors de l'implantation d'une matrice synthétisée par des cellules *in vitro*.

VIII. APPROCHE TEXTILE

Les textiles médicaux sont largement utilisés pour fabriquer des implants, notamment pour traiter des hernies et des maladies vasculaires, depuis plus de 60 ans (228). Récemment, des approches textiles ont également été utilisées pour la bio-fabrication d'échafaudage à base de fibres pour des applications d'ingénierie tissulaire (229) (230) (231) (232). Ces technologies sont très polyvalentes et incluent des méthodes d'assemblage telles que le tissage, le tricotage, le tressage et l'électrospinning. Les approches permettent de changer l'architecture en contrôlant la taille et l'orientation, la taille des pores et la géométrie de la construction finale, l'interconnectivité des pores, la topographie de surface et *in fine*, les propriétés mécaniques. Toutes ces propriétés sont des éléments clés pour le comportement cellulaire de l'implant construit. En effet, grâce à l'utilisation de fibres chargées en cellules, la distribution cellulaire peut être également finement régulée (233).

L'incorporation des textiles comme implants vasculaires a débuté en 1952 avec le travail de Voorhees qui a remplacé des vaisseaux aortiques de chiens par des tubes de Vinyon-N (polyvinylchloride) tissés (228). Suite à cela, plusieurs études cliniques ont utilisé différents types de matériaux (Nylon, Teflon®, Dacron®, Orlon) et différentes constructions avec des diamètres variables.

Le tricotage est une méthode permettant de créer des structures 2D et 3D complexes par entrelacement de fils grâce à un arrangement organisé de boucles connectées. Selon le type de tricotage, les constructions possèdent différentes propriétés physiques et mécaniques et ce processus est automatisable (233). Les structures tricotées sont flexibles, compliantes et facilement manipulables mais leur porosité peut poser problème. Le substitut vasculaire faisant appel à cette technique le plus connu et commercialement utilisé est le Dacron® tricoté. Les *stents* métalliques peuvent également avoir des fibres structurées sous forme de monofilament tricoté (74).

Le tressage nécessite l'entrelacement de trois fils ou plus pour créer des formes géométriques 3D et a pour avantage d'avoir une grande souplesse au niveau des propriétés de charges axiales et radiales, une bonne stabilité physique et une bonne résistance à la fatigue. Cette propriété, ainsi que sa faible rigidité en flexion, ont été exploitées pour la fabrication de *stents* (WALLSTENT®, Boston Scientific Co. pour une application dans la carotide par exemple). Néanmoins, il entraîne des problèmes de changement de diamètre lorsque la construction est étirée (233).

Le tissage est l'une des techniques textiles ancestrales et repose sur l'utilisation de deux types de fils : le fil de trame (*weft*) et le fil de chaîne (*warp*). Le fil de trame passe alternativement au-dessus et en-dessous des fils de chaîne permettant de créer une structure dense et peu poreuse (Figure 37).

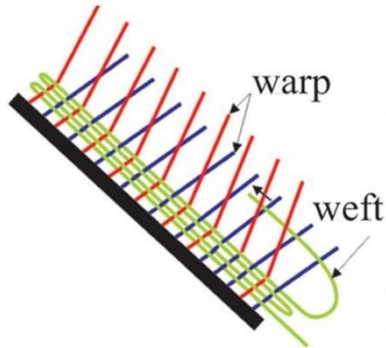


Figure 37 : Principe du tissage (Akbari et al., 2016)

C'est une technique qui apporte beaucoup de souplesse dans les propriétés désirées puisque la porosité, la densité de tissage, le nombre de fils et leurs diamètres peuvent être facilement modulés. Le Dacron[®], évoqué précédemment comme étant tricoté, est aussi retrouvé sous forme tissé. L'un des avantages majeurs du tissage est sa facilité de construction grâce à un métier à tisser manuel ou automatisé (233). Les caractéristiques importantes qui ont permis l'utilisation de constructions tissées en clinique sont : la surface lisse, la manipulation facile, la faible perméabilité transpariétale, la force à l'éclatement, la force à l'arrachement de sutures et la réponse biologique réparatrice (74). En effet, sa structure finement poreuse permet à un substitut vasculaire d'être étanche tout en laissant possible les échanges avec le tissu environnant, permettant par exemple, la colonisation par des cellules de l'hôte. L'arrangement des fils entre eux de façon orthogonale entraîne une elongation axiale et des propriétés de compliance radiale faibles, constituant un désavantage important mais qui n'empêche pas sa large utilisation en clinique. Cette mauvaise compliance est attribuée au comportement non élastique du matériau tissé. En effet, la structure va se comporter uniquement comme les fibres de collagène dans une artère native et la composante élastique ne va pas être représentée, augmentant ainsi la rigidité du substitut (74). Différentes stratégies ont été utilisées afin de trouver une alternative à ce problème, et notamment en 2011 grâce à la création d'un prototype formé de deux couches tissées : la couche interne est composée de *poly-trimethylene terephthalate* ayant un module élastique faible, et la couche externe est faite de polyester aux propriétés élastiques élevées. Ainsi, les deux couches miment à la fois l'effet des fibres de collagène et des fibres élastiques. Malheureusement, aucune étude *in vivo* n'a encore été réalisée (234).

IX. OBJECTIFS

Il y a 20 ans, une étude pionnière a été menée par Nicolas L'Heureux afin de construire un substitut vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire sans échafaudage exogène. Pour cela, des cellules mésenchymateuses humaines étaient cultivées *in vitro* afin de synthétiser un feuillet de matrice extracellulaire entièrement biologique. Ces feuillets étaient ensuite roulés autour d'un tube puis cultivés dans un bioréacteur pendant 2 mois afin de permettre la fusion des couches de matrice extracellulaire. Cette méthode (détaillée dans la partie IV.4.1. Matrice extracellulaire synthétisée par des cellules *in vitro*) a permis d'obtenir des résultats impressionnants en terme de propriétés mécaniques. Cette étude a également été un grand succès suite à l'implantation de substituts autologues vivants chez l'humain (235). Par ailleurs, un greffon dévitalisé, mais non décellularisé et endothélialisé avec des cellules autologues avait montré une bonne perméabilité à 8 semaines post-opération (144). Par la suite, deux greffons non endothélialisés et dévitalisés ont été implantés chez trois patients et étaient perméables pendant plusieurs mois (145). Ces résultats montrent donc la possibilité d'utiliser un greffon allogénique, sans endothélialisation préalable, avec des perméabilités primaires assistées et secondaires satisfaisantes. Ces résultats positifs suggèrent que ce greffon n'entraîne pas de rejet ou de réponse à un corps étranger et permet une meilleure intégration du tissu grâce au remodelage positif de l'hôte.

Malgré ces résultats très prometteurs et l'évolution rapide vers les essais cliniques, la production de ces greffons entièrement biologiques soulève quelques problèmes et laisse plusieurs questions importantes sans réponse. L'assemblage des feuillets autour d'un tube demande des étapes de maturation longues et coûteuses. En effet, pour permettre l'obtention d'un greffon mécaniquement très fort, la fusion des différentes couches de feuillet était réalisée pendant 8-12 semaines dans des bioréacteurs, très consommateurs de milieux de culture. Le temps de production total de ces greffons utilisés pour les essais cliniques s'élevait à environ 7 mois puisqu'ils contenaient plusieurs séries de couches nécessitant plus de deux mois de maturation chacune. De plus, ces bioréacteurs augmentent les risques de contamination à cause des risques de bris dans un système complexe. Par ailleurs, une structure par couche augmentait le risque de délamination dans les conditions dynamiques rencontrées *in vivo*. En outre, cette stratégie limite la géométrie et les propriétés mécaniques locales du greffon.

Grâce à son approche textile, cette thèse propose d'assembler le greffon trois fois plus rapidement, et donc à moindre coût, tout en préservant les qualités de la matrice extracellulaire synthétisée par des cellules *in vitro*, ainsi que les très bonnes propriétés mécaniques obtenues

précédemment. De plus, cette technique, s'affranchit de l'étape de maturation en bioréacteur et élimine les problèmes de délamination dus à une fusion incomplète des couches de MEC. L'approche textile permet aussi un très bon contrôle local et directionnel des propriétés mécaniques des structures construites. Elle permet également un contrôle sur le design de la construction, et par exemple, sur sa forme finale. Contrairement à la stratégie précédente, elle apporte une flexibilité au niveau de la densité et de la porosité de la paroi, paramètre important pour la colonisation par les cellules de l'hôte. Enfin, cette thèse montre aussi que la production de textiles humains ne se confine pas seulement à la fabrication de substituts vasculaires, elle peut également être utilisée pour le développement de tissus complexes.

La première étape de la thèse consistait à mieux comprendre l'organisation et la composition de la matrice extracellulaire synthétisée par des cellules *in vitro*, nommée *CAM* pour *Cell-Assembled extracellular Matrix*, responsables de sa capacité d'intégration dans l'hôte et sa force mécanique impressionnante. Parallèlement, l'effet de la dévitalisation par séchage, processus utilisé pour stocker la *CAM* et créer des modèles allogéniques, « prêts à être utilisés », a été évalué. Pour cela, des mesures d'épaisseur et de résistance à la perforation ont été réalisées afin de comparer les potentielles variations entre un feuillet, dit frais, c'est-à-dire vivant et hydraté, et un feuillet dévitalisé, c'est-à-dire dans lequel les cellules ont été tuées par séchage. La composition en protéines humaines de la MEC a été analysée par spectrométrie de masse et des colorations histologiques ont été réalisées afin de mettre en évidence la composition et la distribution du réseau de collagènes, des glycosaminoglycanes et des fibroblastes. La distribution de protéines plus spécifiques, ayant un rôle clef dans l'organisation d'une matrice biologique, identifiées précédemment par spectrométrie de masse, a été évaluée par immunofluorescence. Par la suite, une étude ciblée sur les fibrilles de collagène a été menée par microscopie électronique afin de comprendre la distribution ultrastructurale et la densité du réseau de collagènes ainsi que d'expliquer la force mécanique des feuillets. L'impact de la dévitalisation sur la densité et le diamètre des fibrilles de collagène a été quantifié. Finalement, une étude à plus haute échelle par génération de seconde harmonique, a permis d'observer l'orientation des fibres de collagène, paramètre qui joue un rôle crucial dans la résistance mécanique d'un tissu. Pour conclure, cette première étape visait à mettre en évidence l'organisation de la *CAM* et ses similarités avec une matrice biologique native pour démontrer que la *CAM* déshydratée constitue littéralement un « bio-matériau ».

La deuxième étape avait pour but de montrer la conception de textiles humains. Pour cela, des rubans de *CAM* ont été réalisés par coupure longitudinale du feuillet. Ces rubans pouvaient être torsadés afin d'obtenir des fils. L'état de surface de ces fils a été observé par cryo-microscopie électronique à différents niveaux de torsion et la réorganisation du réseau de collagène a été analysée

par coupes histologiques. De plus, la distribution ultrastructurale ainsi que la densité des fibrilles de collagène ont été observées par microscopie électronique à transmission. Ces différentes méthodes ont été réalisées afin de mieux comprendre l'impact du torsadage sur la structure de la CAM. Par ailleurs, les facteurs influençant la résistance mécanique des fils, ont été investigués, tels que : le degré de torsion, la largeur des rubans ou l'âge des feuillets. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence la variété de structures complexes pouvant être créées avec cette approche afin de développer des textiles humains. Ainsi, des structures tressées, crochetées, tricotées, *etc.* ont été réalisées. La possibilité de cellularisation de tels assemblages a également été étudiée. Finalement, deux applications pour l'utilisation de ces fils entièrement biologiques et humains ont été mises en évidence : l'utilisation comme fil de suture et le tissage d'un substitut vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire. Pour conclure, cette étape visait à mettre en évidence la conception de bio-textiles grâce aux fils de CAM, mécaniquement suffisamment forts pour être assemblés en tissus complexes.

La troisième étape visait à décrire la bonne intégration de la CAM *in vivo*, déjà observée de façon anecdotique chez des patients, en utilisant des implantations sous-cutanées chez le rat immunodéficient pour analyser la réponse immunitaire innée de l'hôte. Ainsi, des fils étaient implantés dans le dos du rat à l'aide d'une longue aiguille. L'implantation d'une membrane de collagène commerciale bovine reconstituée a été réalisée comme contrôle. L'effet de différents traitements (dévitalisation, décellularisation, gamma stérilisation et torsadage) sur la réponse inflammatoire et le remodelage *in vivo* a été analysé. Pour cela, de 2 semaines à 6 mois après implantation, des coupes histologiques de peau contenant le fil ont été réalisées afin d'observer la réponse inflammatoire par une coloration Hématoxyline Eosine. Le reste des fils a été récupéré afin d'évaluer la résistance mécanique après l'implantation, par test de traction. Le remodelage a été analysé grâce au marquage spécifique de trois protéines importantes de la matrice extracellulaire présente dans la CAM. La réponse inflammatoire a été quantifiée par immunofluorescence grâce au marquage spécifique des macrophages M1 et M2. Pour conclure, cette étape a mis en évidence la persistance de la CAM *in vivo*, avec une faible réponse inflammatoire, un remodelage très modeste et sans dégradation significative.

Ces trois études en parallèle visaient à montrer les caractéristiques impressionnantes de la CAM : un « bio-matériau » qui est mécaniquement très fort sans matériel exogène ou sans avoir recours à des modifications chimiques, qui est complètement biologique et humain, dont l'organisation ressemble à une matrice native, et qui garde ses qualités biologiques car il n'est pas reconnu comme un corps étranger *in vivo*. Grâce à l'approche textile, il est maintenant possible de fabriquer des textiles humains allogéniques, qui ont le potentiel de jouer un rôle mécanique et biologique à long terme grâce à une intégration inégalée post-transplantation.

X. RÉSULTATS

ARTICLE 1

Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process.

L. Magnan, G. Labrunie, S. Marais, S. Rey, N. Dusserre, M. Bonneu, S.
Lacomme, E. Gontier and N. L'Heureux

Acta Biomaterialia, 2018 Oct 5 (in press)

doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.006

ARTICLE 2

Tissue-Engineered Yarn: a New Bio-Material for the Production of Entirely Human Textiles.

L. Magnan, G. Labrunie, M. Fénelon, N. Dusserre, M.-P. Foulc, M. Lafourcade, I. Svahn, E. Gontier, T.N. McAllister and N. L'Heureux

Advanced Materials, En préparation

Title:

Tissue-Engineered Yarn: a New Bio-Material for the Production of Entirely Human Textiles.

Author names and affiliations:

Laure Magnan, Gaëlle Labrunie, Mathilde Fénelon, Nathalie Dusserre, Marie-Pierre Foulc, Mickaël Lafourcade, Isabelle Svahn, Etienne Gontier, Todd N. McAllister and Nicolas L'Heureux.

Laure Magnan¹

laure.magnan@hotmail.com

Gaëlle Labrunie¹

Mathilde Fénelon¹

Nathalie Dusserre¹

Nicolas L'Heureux¹

¹146 rue Léo Saignat, Univ. Bordeaux, Inserm, Laboratory for the Bioengineering of Tissues, INSERM U1026, F-33076, Bordeaux, France

Isabelle Svahn²

Etienne Gontier²

²UMS 3420 CNRS, US4 INSERM, Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Marie-Pierre Foulc³

Mickaël Lafourcade³

³Société de recherche Rescoll, 8 allée Geoffroy Saint-Hilaire, CS 30021, F-33615 Pessac, France

Todd N. McAllister⁴

⁴Amnion Foundation, 111 N. Chestnut Street, Suite 100, Winston-Salem, NC 27101, USA

Corresponding author:

Nicolas L'Heureux

nicolas.lheureux@inserm.fr, Tel: 33 (0)5 57 57 14 88 Fax: 33 (0)5 56 90 05 17

¹146 rue Léo Saignat, Univ. Bordeaux, Inserm, Laboratory for the Bioengineering of Tissues, INSERM

U1026, F-33076, Bordeaux, France

Abstract

Traditionally, tissue engineering has been dependent on biomaterials to provide the desired shape and mechanical properties to the engineered tissue. However, most biomaterials are recognized as foreign by the innate immune system of the body, which leads to an inflammatory response, which in turns leads to chronic inflammation and, finally, fibrous encapsulation.^[1] Advances in tissue engineering have led to the production of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) through a process termed Tissue Engineering by Self-Assembly, or TESA.^{[2] [3]} Sheets of CAM have been shown to be long-lived *in vivo* and very slowly remodeled, indicating that the CAM is not recognized as foreign.^{[4] [5] [6] [7]} Here, we show that by combining this truly “bio”-material with a textile-based assembly method, an array of completely biological human products could be produced for various applications. This novel approach is faster, automatable, much more versatile than the previously described sheet-based approach and, is an enabling technology for the mass production of tissue-engineered human textiles.

Keywords: Human textiles, cell-assembled extracellular matrix, tissue-engineered yarn, bio-material

1. Introduction

Medical textiles, either as external or internal devices, have been an integral part of modern medicine. When used as implants, these can be as simple as sutures or as complex as covered stents for abdominal aorta aneurism repair. Depending on the applications, they can be made of biodegradable materials, like processed collagen or polyglycolic acid, or of permanent polymers, like Dacron® (PET: Polyethylene terephthalate) or polypropylene. Biodegradables are well suited for repairs of tissues that heal quickly but their use for applications that require long-term tissue integrity is challenging because they rely on the fact that their degradation will not interfere with the biological or mechanical functions of the implant. Permanent synthetic materials tend to create a significant inflammatory response that leads to chronic inflammation and fibrous encapsulation.^[1] In some applications, this response can be a positive contribution to the tissue repair strategy, such as in the case of a polypropylene mesh used for abdominal hernias. However, this scarring response can be very detrimental for many other applications. But what if we could provide a textile that is not recognized as a foreign and that the body can slowly remodel to fit its environment?

In the specific field of cardiovascular devices, textile-based grafts were the first synthetic vascular grafts used (over 60 years ago), and are still the gold standard today for large diameter arterial replacement.^[8] However, in smaller diameter applications, like coronary heart bypass, leg bypass, or arteriovenous shunts for hemodialysis, they lead to critically poor clinical outcomes because they generate an inflammatory response that leads to scar formation, which will encroach on the lumen of the conduit and cause a blockage.^{[9] [10]} In an effort to find an alternative to the use of synthetic materials, we have pioneered an approach based on the production of robust sheets of extracellular matrix (ECM) synthesized by normal, adult, human skin fibroblasts *in vitro*.^{[2] [4]} This CAM has shown significant mechanical strength without the need for chemical modifications or addition of synthetic scaffolding.^{[2] [11]}

CAM sheets were rolled and matured for months in a bioreactor to produce the first completely biological tissue-engineered vascular graft (TEVG) that were successfully transplanted in the arterial circulation.^{[2] [4]} The CAM is well accepted by the host and persists for months unlike chemically processed collagens that are seen as foreign by the body and degraded rapidly.^{[12] [13]} While this rolling approach was adequate for making blood vessels, and performed very well in clinical trial ^{[5] [6]}, it has a few key drawbacks as a general strategy to produce tissue-engineered products such as: 1) giving little control over the local or directional properties of the construct, 2) rolling/folding can produce a limited number of geometries and, 3) tissue cohesion depends on the cellular activity in a bioreactor to fuse the various layers together, a process that is costly, time consuming (months), and is patient/cell line dependent. By combining this tissue-engineered biomaterial with a textile approach, we eliminate the need for a bioreactor step and can have a faster, automatable, and very versatile assembly method to produce an array of biomedical products that will be completely biological, human, and available “off the shelf”. These human textiles will have an unprecedented ability to integrate in the host because the extracellular matrix will not have been chemically denatured and no exogenous material will create inflammation.

2. Material and methods

2.1. CAM Production

HSFs were isolated from adult normal human skin as previously described.^[4] Fibroblasts were grown in DMEM/F-12 media (Gibco, #31331-028) supplemented with 20% FBS (1:1 Biowest #S1810.500:Hyclone #SH30109.03) and 1X Pen/Strep (Gibco #15140-122) and used at passages 3 or 4. To produce the CAM, HSFs were cultured for 6 to 12 weeks with a supplementation of 500 μM of sodium L-ascorbate (Sigma, #A4034-500G) in 225 cm^2 flasks. To devitalize the tissue, CAM were quickly rinsed in distilled water and dried at room temperature under a biosafety cabinet. Dried CAM was stored at -80°C . Prior to use, CAM was rehydrated in water for at least 1 hr. This study was done in accordance with article L. 1243-3 of the code of public health and under the agreement DC-2008-412 with the University Hospital Center of Bordeaux, France (update 10/10/2014).

2.2. Yarns Production

Rehydrated CAMs were placed under a cutting device, blades were pressed on the sheet and the device was pushed to rotate the blades and cut the CAM to obtain 3 to 10-mm-wide ribbons of. For the 3-meter-long ribbon, CAM were dried on a thin sacrificial plastic sheet with a printed pattern and both sheets were cut with a scissor. For twisting, one extremity of a rehydrated ribbon was placed on a twisting device, while the manipulator held the other extremity. The calibrated motor was turned on and the ribbon was twisted while the manipulator dehydrated it by massage. Ribbons can be twisted at 2.5, 5 and 7.5 $\text{rev}\cdot\text{cm}^{-1}$. The 3-meter-long ribbon can be folded in 2 equal parts and twisted at 5 $\text{rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ to strengthen the circumferential thread used to weave the TEVG.

2.3. Histology

Masson's trichrome staining were performed as previously described.^[14] Images were acquired using an Eclipse 80i microscope (Nikon, Japan).

2.4. Transmission electron microscopy

Yarns were prepared as previously described.^[2] Samples were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80kV. Images were then analyzed with Image J.

2.5. Cryo-electron microscopy

Yarns were fixed with 2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer. Samples were mounted with “tissue freezing medium”/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”/10µA). Samples were then transferred to the microscope cryo-stage (CRYO-SEM PP3010T, Quorum Technologies, England). Observations were done at 3kV with a GeminiSEM 300_FESEM (ZEISS, Germany).

2.6. Yarns characterization

Diameter of yarns was determined with a laser micrometer (Xactum, AEROEL). Then, yarns were clamped in jaws of a tensile testing machine (MTS, Criterion 43, force sensor 250N), pre-tested at 20 mm/min until reaching 0.1N and then pulled until rupture.

2.7. Suture skin nude rat

Stitches in overlock were made in the back of an adult nude rat to close a wound of 3-cm-long with a curved surgical needle under gas anesthesia (isoflurane). Buprenorphine (30 µg/g) was administered intraperitoneally 30 min before and the day after the procedure. All procedures and the animal treatment complied with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research. The studies were carried out in accredited animal facilities at the University of Bordeaux and were approved by the Animal Research Committee of Bordeaux University.

2.8. TEVGs mechanical properties

TEVGs were cannulated and pressurized with water or gas. Permeability was calculated as previously described.^[15] Suture retention, compliance and burst pressure were performed as previously described.^[11]

2.9. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism, Version 6 (GraphPad Software Inc. USA). Data is presented as mean \pm standard deviation (SD). Differences between the groups were determined on basis of analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison tests. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

To produce the CAM, we preferentially used fibroblasts from normal adult human skin, although we have shown that other mesenchymal cells can be used.^[2] Fibroblasts, in a 225 cm² flask, formed a strong and cohesive 18 x 10 cm living sheet that was usually used for yarn making after 8 weeks of culture (Figure 1a). Strips of the CAM were produced by cutting the sheet longitudinally with a custom device equipped with a series of circular blades that were evenly spaced to achieve the desired width (Figure 1b). While these “ribbons” readily collapsed into a thin structure when taken out of the medium, they could also be twisted at various rates of revolutions per unit length to form more compact, uniform, threads (Figure 1c). The sheet could also be cut in two connected spiral patterns to obtain a 3-meter-long continuous ribbon (Figure 1d). Either yarn (ribbons or threads) could be dried, spooled, and stored at -80°C for extended periods of time with no apparent degradation. This process produced a robust new biological yarn without the need for any exogenous scaffolding or any chemical crosslinking that would denature this human ECM and make it a target for rapid degradation once implanted (Figure 1e).

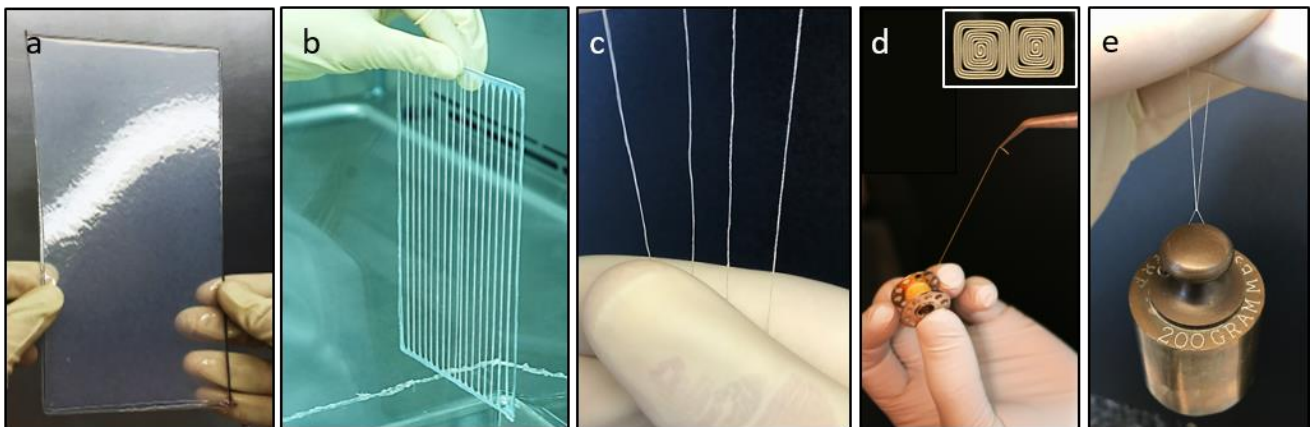


Figure 1. Human yarn production. a) A fresh sheet detached from the flask after 8 weeks of culture stretched over a frame. b) Seventeen 5-mm-wide ribbons obtained by longitudinally cutting a CAM sheet. c) Ribbons could be twisted to obtain threads. From left to right: ribbon (no twist), 2.5, 5 and 7.5 rev·cm⁻¹. d) One continuous 3-meter-long ribbon was obtained by cutting a sheet in two connected spirals (inset). The biological yarn could be dried, spooled, and stored until needed. e) A thread (7.5 rev·cm⁻¹) tied to, and lifting, a metal weight of 200 g.

Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) revealed the smooth and homogenous surface of the CAM of ribbons after a drying-freezing-rehydration cycle (Figure 2a). Despite this devitalization and storage process, no cracks, nor holes, nor cell or ECM debris detaching from the CAM were observed. At this magnification, the decrease in diameter of the yarn as the result of twisting was obvious. These observations suggest that tissue compaction was increased until 5 rev-cm⁻¹ but seemed to plateau thereafter. Cross sections of paraffin-embedded yarn illustrated how the CAM layers are compacted into a thread. The *vert lumière* Masson's trichrome staining specifically stained the collagen in blue-green highlighting the very dense network of fibers and the compaction of the matrix (Figure 2b). TEM imaging revealed the typical striation of collagen fibrils cut longitudinally as well as the very dense network of collagen fibrils organized in parallel bundles oriented in multiple directions, which is typical of physiological, strong, mature, human connective tissue (Figure 2c).^{[16] [17]} Furthermore, microfibrils, an important sub-component of most ECMs ^[18], were observed throughout the matrix demonstrating that the CAM is much more than a collagen network. In fact, using mass spectrometry, over 50 components of the ECM in the CAM were identified demonstrating how this very complex matrix has a physiological-like organization and composition, which suggests that it could support a variety of biological functions.^[19] TEM observation also clearly revealed that twisting led to an increase in fibril density and an orientation of the fibrils and microfibrils in the longitudinal axis of the thread.

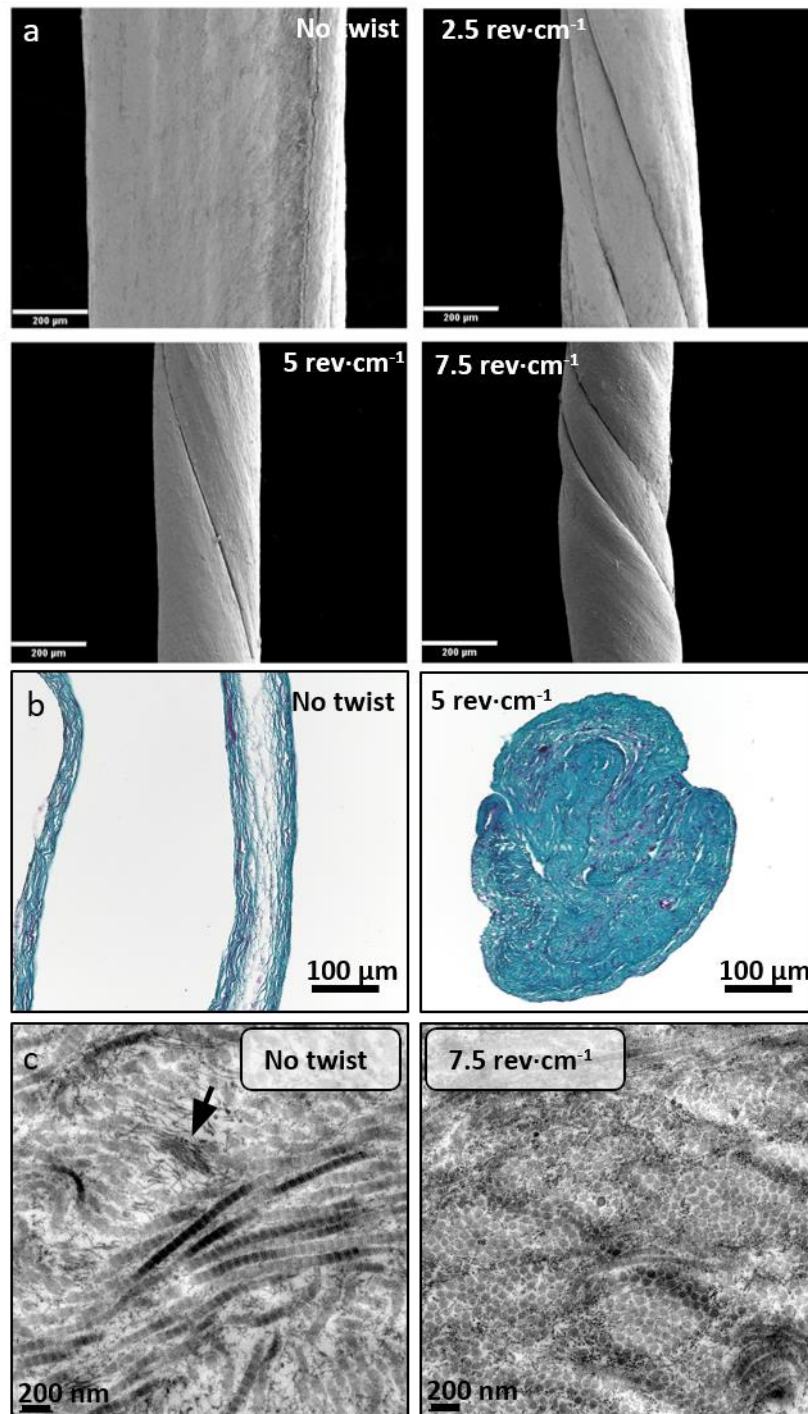


Figure 2. Microscopic view of yarns. a) Cryo-SEM shows the smooth surface of the yarns and the changes induced by twisting. Scale bar = 200 μm. b) Cross sections of yarns stained with Masson's trichrome revealed the dense collagen network (blue-green). Three layers of the ribbon are visible (2 are stuck together). Twisting at 5 rev-cm⁻¹ produced a very dense tissue. Scale bar = 100 μm. c) TEM shows the typical striated pattern of the collagen fibrils arranged in dense parallel arrays to form fibers. Microfibrils are also visible throughout the tissue but concentrated in some areas (arrow). Twisting clearly compacted the fibrils but also seemed to align them in the longitudinal direction (this is a cross section). Scale bar = 200 nm.

This native-like ultrastructure is in contrast with the well-known collagen gels produced from solubilized collagen where, obviously, only collagen is present and where only an extremely low density of normal collagen fibrils can be seen in TEM.^{[20] [21]} Tissues from processed collagens, even at high concentration of collagen, are rapidly degraded *in vivo* because the innate immune system recognizes this material as “damaged”.^{[12] [13]} There have been previous attempts to produce collagen yarn from solubilized collagen but these all had to resort to chemically cross-linking the collagen to achieve significant mechanical properties.^{[22] [23] [24] [25]} In addition, when TEM was presented, the structure of the collagen was far from normal.^{[22] [25]} Both these denaturation processes (solubilization and cross-linking) are very likely to bring about an aggressive degradation of the implant material. While, as mentioned before, this can be acceptable for some application, our goal is to produce a biomaterial that will integrate and persist in the host to avoid having to heavily depend on rapid remodeling responses from the patient since these can be very variable dependent on age, sex, health status and other unknown factors.^[26]

In order to confirm the decreased in diameter seen in cryo-SEM, rehydrated yarn diameters were measured with a biaxial laser micrometer (Figure 3a). Indeed, twisting reduced ribbons diameter ($549 \pm 90 \mu\text{m}$) significantly and the effect also appeared to plateau at $5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($355 \pm 32 \mu\text{m}$) although this level was not significantly different from 2.5 or $7.5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$. Twisting increased somewhat the force at failure and the effect also seemed to peak or plateau at $5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figure 3b). The ultimate tensile stress (UTS) increased more than the force at failure (also seemed to peak at $5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$) highlighting the considerable tissue compaction (Figure 3b). As would be expected, strain at failure was increased with twisting, with the effect becoming significant and maximal at $7.5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figure 3c). Higher twist levels were not tested because they started creating secondary coiling that made handling more difficult but these could still be produced if needed to achieve specific mechanical properties for specific applications. A simple way to increase yarn strength is to increase the width of the initial strip of CAM (Figure 3d). Using CAM from cell lines from 4 donors, a linear relationship between ribbon width and force at failure was demonstrated, as one would expect with any material.

Finally, another way to control yarn strength is to control CAM sheet age (time of culture) since the tissues will get stronger practically linearly with time in culture (Figure 3e). These experiments exemplify how a wide range of qualities and mechanical properties can be achieved when creating human yarn.

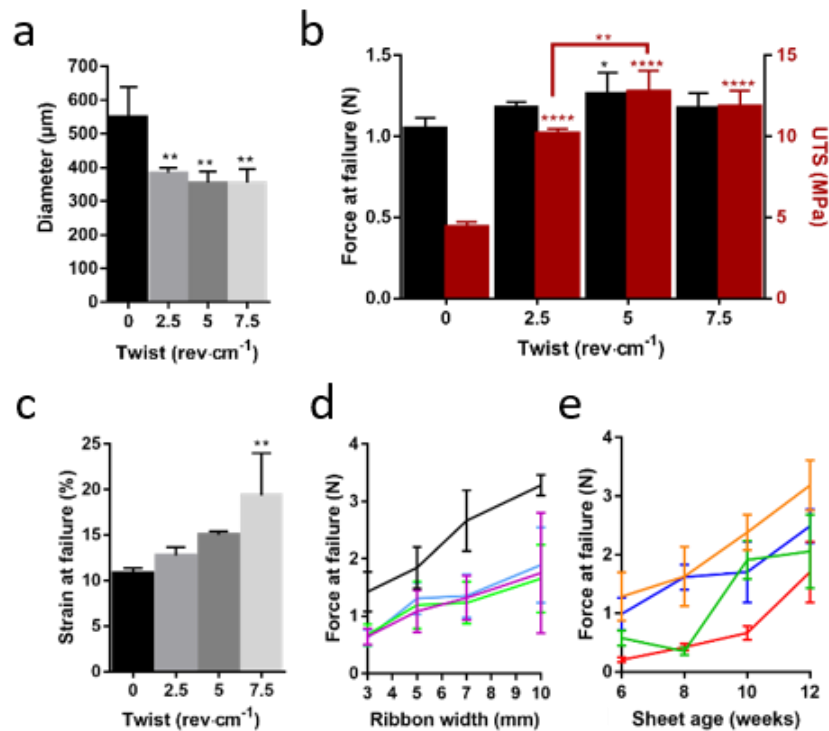


Figure 3. Factors influencing the mechanical properties of yarns. a) Biaxial laser micrometry confirmed that twisting produced significantly more compact and uniform yarn (**: $p < 0.01$, compared to 0, $n = 4$, 5-mm ribbons). b) The force at failure was significantly higher for 5 $\text{rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ threads from for ribbons (by $\approx 17\%$). The UTS also appeared to peak at 5 $\text{rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$, compared to 0 unless otherwise indicated, $n = 4$, 5-mm ribbons). c) Twisting also increased the strain at failure which became significant at 7.5 $\text{rev}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($p < 0.01$, compared to 0, $n = 4$, 5-mm ribbons). d) The strength of 5-mm-wide ribbons could also be tuned by changing ribbons width as demonstrated here with 4 different cell lines ($n = 5-18$). Correlation R^2 ranged from 0.91 to 0.98. e) The strength of the yarn could also be controlled by the culture time of the sheet (sheet age) as seen here with 5-mm-wide ribbons using 4 different cell lines ($n = 8-16$). Correlation R^2 ranged from 0.77 to 0.97.

These human yarns are suitable for any assembly techniques classically used for creating textiles (Figure 4). For example, multifilament yarn can be created by braiding or twisting individual ribbons or threads in order to achieve a set of specific mechanical properties as is commonly done in the suture industry (Figure 5a). The yarn can be tied off using different types of knots as would be done with standard sutures (Figure 5b). Knot-based assembly techniques such as crocheting and knitting can be performed to create truly tridimensional geometries as is currently done in the medical implant industry (Figure 5c). The yarn could also be tightly wound around a synthetic surface to create a hybrid implant with increased integration/biocompatibility potential (Figure 5d). Weaving is an age-old assembly method where a set of tensed yarn filaments (called “warp”) is intertwined with a single moving filament (called “weft”) to produce a dense structure without using knots (Figure 4e). As seen here, the warp and the weft can be made of different yarns (the warp can even contain multiple types of yarn), which allows for directional control of mechanical properties.

Our strategy is to work with devitalized yarn for ease of storage and manufacturing considerations. Our clinical work with vascular grafts using devitalized CAM ^[7] ^[27], as well as current animal work (data not shown), strongly suggest that the fibroblast remnants, even allogeneic, do not create a significant immune response. While this approach offers the commercially attractive “off the shelf” option, in some cases, living cells maybe be needed to achieve a therapeutic goal. In Figure 4f and g, the CAM yarns were shown to be easily seeded with cells suggesting that they could be used as a delivery system of adherent cells that could outperform injection of cells in suspension since the latter is associated with a very low survival rate.^[28] Of course, this is also a proof-of-principle to demonstrate that any complex human textile could be seeded with the relevant cells.

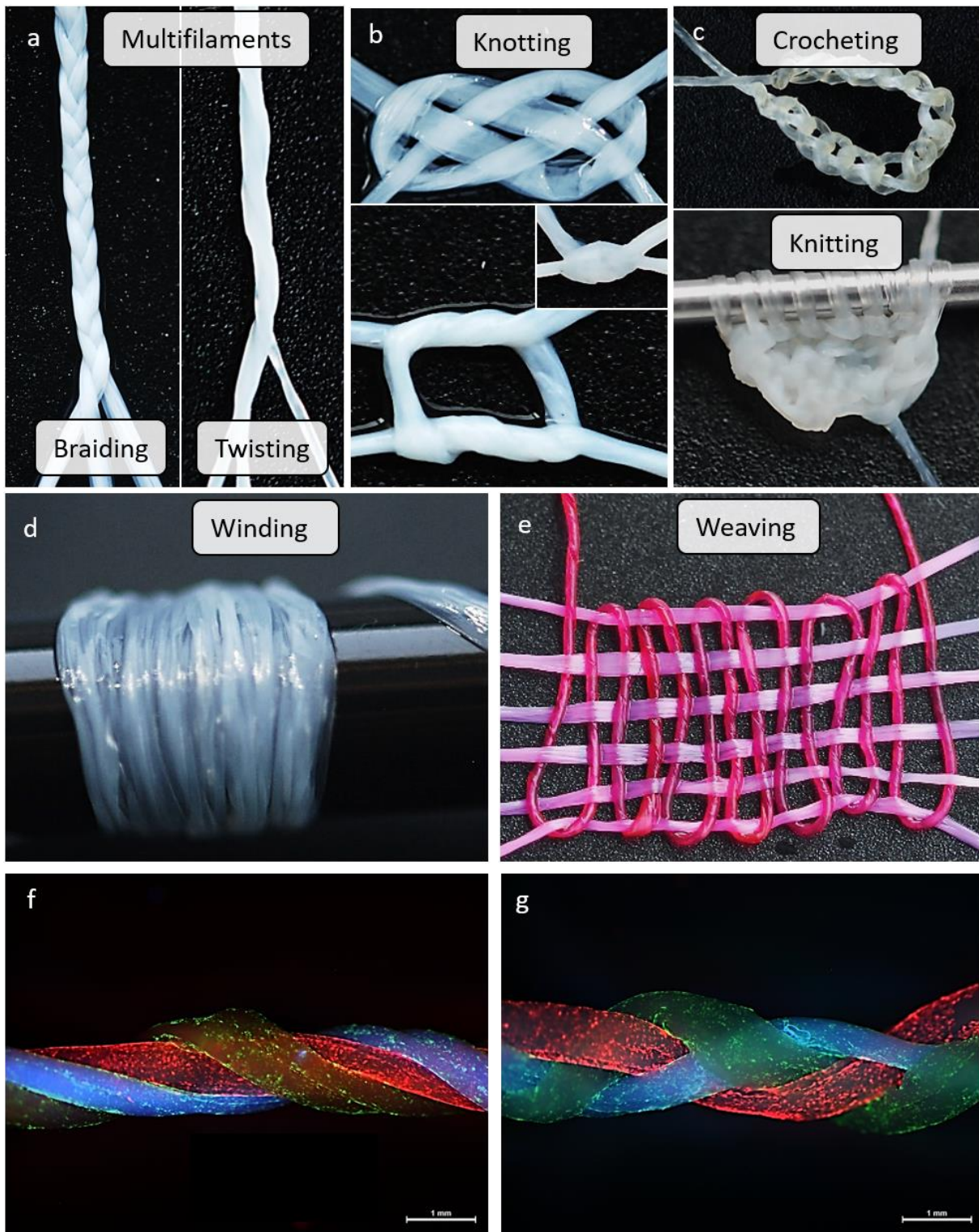


Figure 4. Human textiles. a) More complex yarns could be produced by braiding and twisting ribbons. b) Complex or surgical knots could be tied and firmly tightened (inset) without breaking the yarn. c) Crocheting and knitting could be used to produce complex structure. d) One ribbon was wound around a mandrel to cover its surface. e) A loose weave is shown with colored yarn to show the assembly principle. Six ribbons (light pink) were woven with a two-filament thread (dark pink). f, g) Three ribbons, each seeded with a separate culture of human endothelial cells (labeled in red, green or blue), were assembled into a multi-cell-line construct by twisting (f) or braiding (g).

There have recently been exciting efforts to create living fibers and to assemble those using textile approaches.^{[29] [30] [31]} However, these approaches still rely significantly on the use of exogenous biomaterials which will create an inflammatory response that will disrupt tissue architecture once implanted. While demonstrating a very fine resolution, these fibers, and resulting tissues, lack the mechanical strength needed to produce tissues that play a significant and sustained mechanical role. The uniqueness of the approach described here is that, based on our previous animal and clinical work with the CAM^{[4] [5] [6] [7] [27]}, the tissue that will be implanted will largely remain intact and will only be very slowly remodeled.

To demonstrate the basic usability of the human yarn, a 5-mm-wide ribbon was used to close a wound on the back of a nude rat (Figure 5). The ribbon was used as a typical suture material and tied off using a classic surgeon's knot. The "suture" dried and fell off naturally, not unlike the remnant of the umbilical cord (Figure 5b, c). By two weeks, practically all the external parts of the sutures were gone and wound remained closed and healed normally.

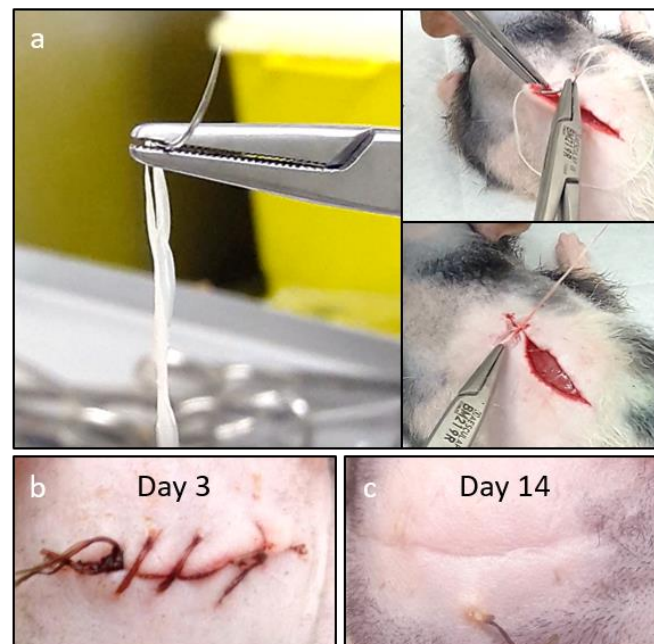


Figure 5. Human yarn could be used as a suture material. a) A 5-mm-wide ribbon was threaded on a curved surgical needle to suture a wound on the back of a nude rat. The ribbon could be firmly pulled to close the wound. b) 3 days after the suture, knots were still visible and the wound was solidly closed, no macroscopic inflammation was visible. c) At 14 days, the external part of the suture was all but gone and the wound was closed.

A tissue-engineered vascular graft was developed as a proof of concept that this technology can be used to create complex tissues and organs. One of the key advantages of a textile approach is the possibility to automate tissue fabrication. In Figure 6a and b, a tube was automatically braided with dried human threads using a 48-carrier braiding machine. The result was a tube that was too porous to be used as a vascular graft but this assembly method could be useful for other applications. By using a basic weaving method (Figure 6c) and a circular loom (Figure 6d), a TEVG was produced with an internal diameter of 4.2 mm, a very dense wall, and ends suitable for suturing (Figure 6e, f and g)). The longitudinal thread count of the graft was $16.3 \pm 0.9 \text{ cm}^{-1}$ (n=5 individual vessels), i.e. a 5.5% coefficient of variation indicating already a very good reproducibility for these hand-made prototypes. The primary challenge for completely biological TEVG is to display sufficient mechanical strength. The burst pressure of these TEVGs was $5968 \pm 732 \text{ mmHg}$ (n=5) which compares favorably to that of the human internal thoracic artery ($3196 \pm 1264 \text{ mmHg}$), a vessel widely used for heart bypass surgery.^[11] This value was also superior to that of other biological TEVGs.^{[32] [33] [34] [35]} While this supra-physiological strength may seem overkill, this safety margin could compensate for any partial weakening due to some level of remodeling *in vivo*. Another important mechanical property of a vascular graft is its ability to resist pull out of the sutures used for anastomosis. The suture pullout strength of these grafts was actually superior to that needed to break the synthetic sutures used for the test (>6N, n=5), which is 3 to 5-fold higher than that of human arteries or other biological TEVGs.^{[11] [34] [35]} Transmural permeability is an obvious concern for a woven TEVG. These grafts had a water permeability of $10 \pm 8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (n=4), which is far below the threshold where a pre-clothing step is required ($350 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$).^[36] Taken together, these results show that this novel, faster, tunable, automatable, and highly tunable assembly strategy can produce completely biological, human, TEVG with the requisite properties for *in vivo* use.

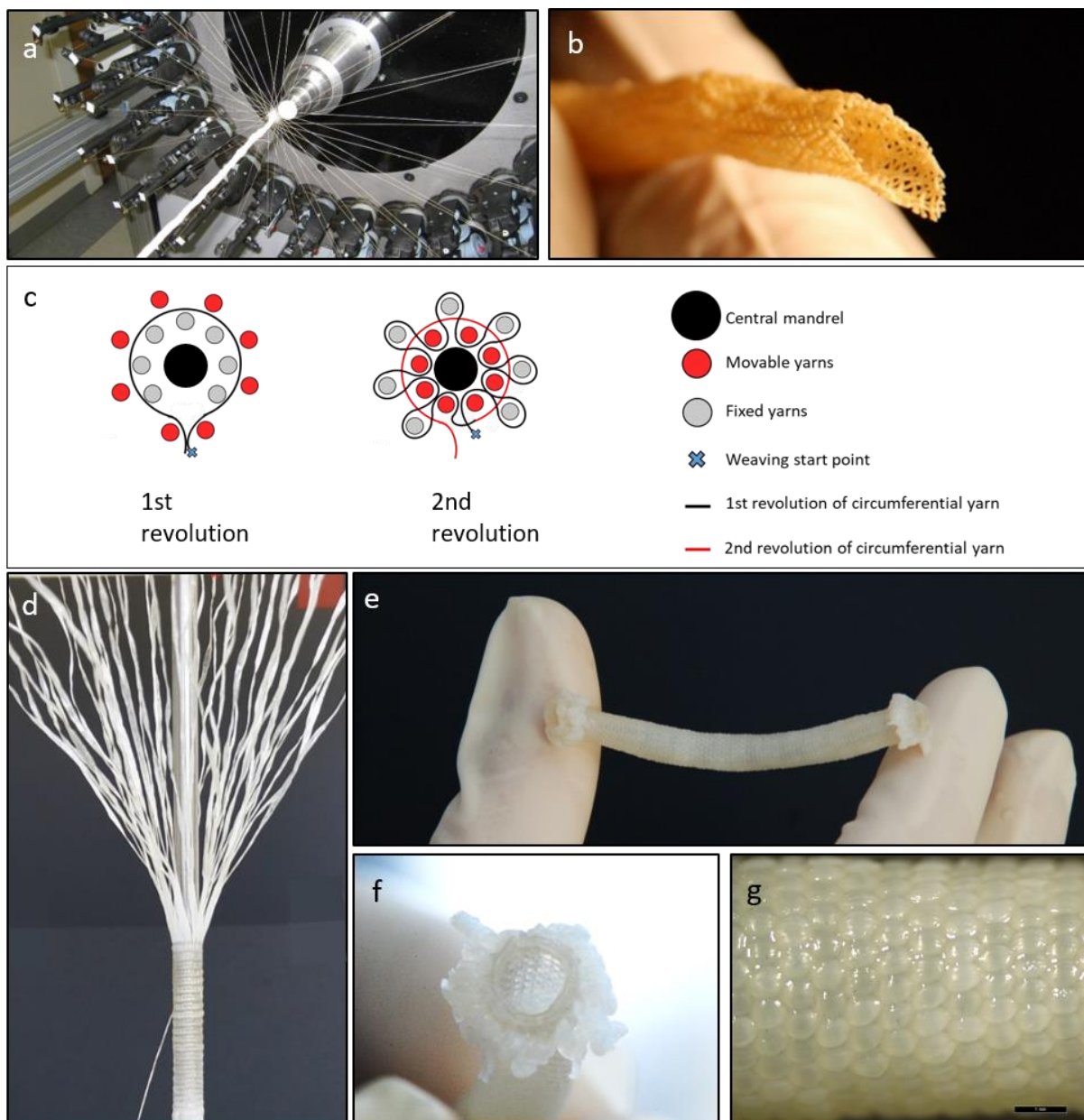


Figure 6. Completely biological, human, textile-based, tissue-engineered vascular grafts. a, b) Automated manufacturing of a braided tube with human threads (48 spools). While this demonstrated the feasibility of automation, the resulting tube was clearly too porous for use as a vascular graft. c) Schematic representation of the basic weaving technique used with a manual circular loom. One circumferential yarn (weft) was inserted between a movable and a fixed set of tensioned yarns (warp) to create the woven tube. d) Production of the TEVG with, partly rehydrated, devitalized yarns: 49 longitudinal ribbons and one double-filament thread (2 ribbons twisted together at $5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$) as circumferential thread. e) Vascular grafts were fully rehydrated before removal from the mandrel yielding a robust and flexible tube. f) The ends of the graft were “finished” to produce a clear and even ring for suturing (internal diameter of 4.2 mm). The luminal surface can be seen. g) The tightly packed yarn produced a dense, homogenous, and watertight wall.

4. Conclusion

Future avenues of research include long-term *in vivo* remodeling of the CAM in a textile form. Indeed, while clinical data proved that the CAM is long-lived *in vivo* ^{[5] [6] [7] [27]}, the clinical setting was not conducive to a systematic and mechanistic study of the remodeling process. In addition, the porosity of the textile constructs, which is very different from a sheet-based construct, may lead to different remodeling dynamics. Of particular interest would be to determine if CAM-based textiles can grow, which is critical for pediatric applications where permanent synthetic materials often have to be replaced at great risk to the patient. Another avenue to explore would be to determine if the CAM can be sterilized without significantly damaging its native-like structure. Indeed, while yarn can be produced and assembled sterilely, the manufacturing process of complex tissues would be considerably simplified if terminal sterilization were an option.

In this study, we demonstrated how a tissue-engineering strategy can produce yarns of unmodified, human, native-like ECM that have substantial and highly tunable mechanical properties. This yarn was shown to be compatible with many textile assembly strategies and easily seeded with cells. To illustrate its potential, we used this yarn as a simple suture material *in vivo* as well as to produce a robust, yet completely biological, TEVG. This rapid, automatable, and highly tunable platform technology can create constructs with a wide range of shapes, mechanical properties and porosities. These human textiles offer a unique level of biocompatibility and represent a new generation of completely biological tissue-engineered products.

Acknowledgments

This work was supported by *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur* in 2015, *Chaire seniore de l'Initiative d'Excellence de l'Université de Bordeaux (IdEx Bordeaux)* in 2015 and *Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE18-0024-01)* in 2016 of France.

We thank Patrick Guitton and Nicolas Da Silva for their technical help.

References

- [1] R. Klopffleisch, F. Jung, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **n.d.**, 105, 927.
- [2] N. L'heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, F. A. Auger, *The FASEB Journal* **1998**, 12, 47.
- [3] A. Satyam, P. Kumar, X. Fan, A. Gorelov, Y. Rochev, L. Joshi, H. Peinado, D. Lyden, B. Thomas, B. Rodriguez, M. Raghunath, A. Pandit, D. Zeugolis, *Advanced Materials* **2014**, 26, 3024.
- [4] 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, *Nature Medicine* **2006**, 12, 361.
- [5] N. L'Heureux, T. N. McAllister, L. M. de la Fuente, *New England Journal of Medicine* **2007**, 357, 1451.
- [6] 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, *Lancet* **2009**, 373, 1440.
- [7] W. Wystrychowski, L. Cierpka, K. Zagalski, S. Garrido, N. Dusserre, S. Radochonski, T. N. McAllister, N. L'Heureux, *The Journal of Vascular Access* **2011**, 12, 67.
- [8] A. B. Voorhees, A. Jaretzki, A. H. Blakemore, *Ann. Surg.* **1952**, 135, 332.
- [9] J. CHLUPÁ, E. FILOVÁ, **2009**, 58, 21.
- [10] D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, D. Mantovani, *Nature Reviews Cardiology* **2013**, 10, 410.
- [11] 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, *Biomaterials* **2009**, 30, 1542.
- [12] X. Wang, Y. Yan, R. Zhang, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2006**, 21, 39.
- [13] K. Anselme, C. Bacques, G. Charriere, D. J. Hartmann, D. Herbage, R. Garrone, *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, 24, 689.
- [14] M. Maisani, S. Ziane, C. Ehret, L. Levesque, R. Siadous, J.-F. Le Meins, P. Chevallier, P. Barthélémy, H. De Oliveira, J. Amédée, D. Mantovani, O. Chassande, *J Tissue Eng Regen Med* **2018**, 12, e1489.
- [15] T. Morota, S. Takamoto, *Annals of Vascular Diseases* **2013**, 6, 67.
- [16] A. Colige, L. Nuytinck, I. Hausser, A. J. van Essen, M. Thiry, C. Herens, L. C. Adès, F. Malfait, A. D. Paepe, P. Franck, G. Wolff, J. C. Oosterwijk, J. H. S. Smitt, C. M. Lapière, B. V. Nusgens, *J. Invest. Dermatol.* **2004**, 123, 656.
- [17] F. Malfait, S. Symoens, N. Goemans, Y. Gyftodimou, E. Holmberg, V. López-González, G. Mortier, S. Nampoothiri, M. Petersen, A. De Paepe, *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2013**, 8, 78.
- [18] J. Halper, M. Kjaer, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, 802, 31.

- [19] L. Magnan, G. Labrunie, S. Marais, S. Rey, N. Dusserre, M. Bonneu, S. Lacomme, E. Gontier and N. L'Heureux, *Acta Biomater* **2018**, In press, DOI 10.1016/j.actbio.2018.10.006.
- [20] C. A. Pacak, J. M. Powers, D. B. Cowan, *Tissue Engineering Part C: Methods* **2011**, *17*, 879.
- [21] T. Schuetz, N. Richmond, M. E. Harmon, J. Schuetz, L. Castaneda, K. Slowinska, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *101*, 118.
- [22] J. F. Cavallaro, P. D. Kemp, K. H. Kraus, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 781.
- [23] K. G. Cornwell, P. Lei, S. T. Andreadis, G. D. Pins, *J Biomed Mater Res A* **2007**, *80*, 362.
- [24] D. I. Zeugolis, G. R. Paul, G. Attenburrow, *J Biomed Mater Res A* **2009**, *89*, 895.
- [25] M. Younesi, A. Islam, V. Kishore, J. M. Anderson, O. Akkus, *Advanced Functional Materials* **2014**, *24*, 5762.
- [26] S. M. Alaish, D. A. Bettinger, O. O. Olutoye, L. J. Gould, D. R. Yager, A. Davis, M. C. Crossland, R. F. Diegelmann, I. K. Cohen, *Wound Repair Regen* **1995**, *3*, 292.
- [27] W. Wystrychowski, T. N. McAllister, K. Zagalski, N. Dusserre, L. Cierpka, N. L'Heureux, *Journal of Vascular Surgery* **2014**, *60*, 1353.
- [28] C. Qi, Y. Li, P. Badger, H. Yu, Z. You, X. Yan, W. Liu, Y. Shi, T. Xia, J. Dong, C. Huang, Y. Du, *Biomaterials* **2017**, *126*, 1.
- [29] M. Akbari, A. Tamayol, V. Laforte, N. Annabi, A. H. Najafabadi, A. Khademhosseini, D. Juncker, *Advanced Functional Materials* **2014**, *24*, 4060.
- [30] S. Wu, Y. Wang, P. N. Streubel, B. Duan, *Acta Biomaterialia* **2017**, *62*, 102.
- [31] H. Onoe, T. Okitsu, A. Itou, M. Kato-Negishi, R. Gojo, D. Kiriya, K. Sato, S. Miura, S. Iwanaga, K. Kuribayashi-Shigetomi, Y. T. Matsunaga, Y. Shimoyama, S. Takeuchi, *Nature Materials* **2013**, *12*, 584.
- [32] 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, *Science Translational Medicine* **2011**, *3*, 68ra9.
- [33] Z. H. Syedain, L. A. Meier, M. T. Lahti, S. L. Johnson, R. T. Tranquillo, *Tissue Engineering Part A* **2014**, *20*, 1726.
- [34] 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, *Lancet* **2016**, *387*, 2026.
- [35] Z. H. Syedain, M. L. Graham, T. B. Dunn, T. O'Brien, S. L. Johnson, R. J. Schumacher, R. T. Tranquillo, *Science Translational Medicine* **2017**, *9*, eaan4209.
- [36] R. Guidoin, C. Gosselin, L. Martin, M. Marois, F. Laroche, M. King, K. Gunasekera, D. Domurado, M. F. Sigot-Luizard, P. Blais, *J. Biomed. Mater. Res.* **1983**, *17*, 1049.

ARTICLE 3

***In vivo* remodeling of yarns produced from human cell-assembled extracellular matrix (CAM).**

L. Magnan, G. Labrunie, J. Izotte, S. Marais, M.-P. Foulc, M. Lafourcade, L. Couraud and N. L'Heureux

Biomaterials, En préparation

Title:

In vivo remodeling of yarns produced from human cell-assembled extracellular matrix (CAM).

Author names and affiliations:

Laure Magnan, Gaëlle Labrunie, Julien Izotte, Sébastien Marais, Marie-Pierre Foulc, Mickaël Lafourcade, Lionel Couraud and Nicolas L'Heureux.

Laure Magnan¹

laure.magnan@hotmail.com

Gaëlle Labrunie¹

Nicolas L'Heureux¹

¹146 rue Léo Saignat, Univ. Bordeaux, Inserm, Laboratory for the Bioengineering of Tissues, INSERM U1026, F-33076, Bordeaux, France

Julien Izotte²

²Animal facility A2, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

Sébastien Marais³

³UMS 3420 CNRS, US4 INSERM, Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Marie-Pierre Foulc³

Mickaël Lafourcade³

³Société de recherche Rescoll, 8 allée Geoffroy Saint-Hilaire, CS 30021, F-33615 Pessac, France

Lionel Couraud⁴

⁴LAPVSO, F-31201, Toulouse Cedex 2, France

Corresponding author:

Nicolas L'Heureux

nicolas.lheureux@inserm.fr, Tel: 33 (0)5 57 57 14 88 Fax: 33 (0)5 56 90 05 17

¹146 rue Léo Saignat, Univ. Bordeaux, Inserm, Laboratory for the Bioengineering of Tissues, INSERM

U1026, F-33076, Bordeaux, France

Abstract

Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) was used to produce vascular grafts without the need for any exogenous materials. These completely biological vascular grafts performed well in clinical trials but little is known about the *in vivo* remodeling and the inflammatory response to this “bio-material”. In this study, we performed subcutaneous implantation of CAM yarns in nude rats to analyze the innate immune response. Effects of processing steps (devitalization, twisting, decellularization, gamma sterilization) that are relevant to the manufacturing strategy of human textiles were analyzed. We demonstrated that the devitalization and decellularization did not affect yarn strength while twisting and gamma sterilization did slightly (-30% and -23%). Gamma sterilization also affected the histological appearance and handling of the yarn. All yarns, except twisted, lost some mechanical strength after 2 weeks of implantation. At 6 months, no additional loss of strength was observed except for gamma-sterilized yarn as it became significantly weaker. Gamma sterilization triggered an intense inflammatory response, dominated by M1 macrophages, while the other yarns only caused a minor peripheral reaction. At 3 and 6 months, all types of yarn were sparsely populated with fibroblastic cells and occasional blood vessels. They were well integrated in non-inflamed, loose connective tissue suggesting a stable remodeling. This is the first study to formally demonstrate that devitalized CAM is very long-lived *in vivo* and does not trigger a degradative response, but rather is very slowly remodeled. This data supports a textile-based strategy to rapidly produce human textiles for a variety of applications.

Keywords: Tissue-engineered yarn, cell-assembled extracellular matrix, inflammatory response, *in vivo* remodeling, mechanical strength

1. Introduction

In the last 10 years, vascular tissue engineering has flourished with two approaches reaching clinical trials [1] [2]. We pioneered the use of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM), synthesized by normal, human, skin fibroblasts *in vitro*, as a strong biological “scaffold” to produce vascular grafts without the need for any exogenous materials [3] [4]. Autologous and living blood vessels constructed with this CAM were the first tissue-engineered vascular grafts (TEVGs) to be implanted in the human arterial circulation [5] [1]. Moreover, allogeneic TEVGs, that were devitalized by simple dehydration, have been implanted in patients without any signs of rejections, which opens the door to an “off the shelf” approach [6]. While these CAM-based vascular grafts rapidly reached the clinic, and had successful outcomes, very little is known about the *in vivo* remodeling and the inflammatory response to this unique material. Indeed, tissue samples were rarely retrieved during the clinical trial because the TEVGs were implanted as arteriovenous shunts in complex patients with multiple comorbidities. Furthermore, the intense inflammatory environment of a failed arteriovenous shunt, that was punctured 3 times per week with two large-bore needle, likely masked the body’s normal response to the CAM.

The production of TEVGs by rolling sheets of CAM required the use of a bioreactor and two lengthy maturation periods of 8-10 weeks to allow cells to fuse the various layers of the vessel. In order to provide a much faster, and cheaper strategy, we recently developed TEVGs based on an innovative textile approach [7]. Biological yarns were produced by cutting strips of CAM in order to obtain ribbons, which could be further processed by twisting them into threads. These yarns were then devitalized, by simple dehydration, and stored frozen until needed. By weaving this human yarn, devitalized TEVGs with impressive mechanical strength were produced in only a few days. This approach could be readily automated, which would further shorten the production time.

In this study, we wanted to analyze the host’s response to the CAM in a controlled environment using a simple implant geometry. In addition, we wanted to determine if various types of CAM processing

that are relevant to various manufacturing strategies would adversely affect its remodeling *in vivo*. For that purpose, we used yarns of CAM that were subcutaneously implanted in nude rats for up to 6 months. Evaluating the responses to these yarns will give us indications about what processing steps are acceptable for the manufacturing of a woven TEVG or other human textiles. This well-established animal model allowed the evaluation of the innate immune response without interference from the adaptive immune system that would reject the human tissue. The results revealed that the CAM was very long-lived *in vivo* and did not trigger a degradative response, but rather was very slowly remodeled.

2. Material and methods

2.1. CAM Production

HSFs were isolated from adult normal human skin as previously described [4]. Fibroblasts were grown in DMEM/F-12 media (Gibco, #31331-028) supplemented with 20% FBS (1:1 Biowest #S1810.500:Hyclone #SH30109.03) and 1X Pen/Strep (Gibco #15140-122) and used at passages 3 or 4. To produce the CAM, HSFs were cultured for 6 to 12 weeks with a supplementation of 500 μM of sodium L-ascorbate (Sigma, #A4034-500G) in 225 cm^2 flasks. To devitalize the tissue, CAM were quickly rinsed in distilled water and dried at room temperature under a biosafety cabinet. Dried CAM was stored at -80°C . Prior to use, CAM was rehydrated in water for at least 1 hr.

2.2. Yarns Production

Rehydrated CAMs were placed under a cutting device, blades were pressed on the sheet and the device was pushed to rotate the blades and cut the CAM to obtain 3 to 10-mm-wide ribbons of. For the 3-meter-long ribbon, CAM were dried on a thin sacrificial plastic sheet with a printed pattern and both sheets were cut sterilely with a scissor. For twisting, one extremity of a rehydrated ribbon was placed on a twisting device, while the manipulator held the other extremity. The calibrated motor was turned on and the ribbon was twisted while the manipulator dehydrated it by massage. Ribbons can be twisted at $7.5 \text{ rev}\cdot\text{cm}^{-1}$. Three-mm-width commercial bovine collagen membrane (Biomend® #0107, Zimmer Biomet Dental) was used as a positive control.

2.3. Yarns processing

Yarns can be devitalized by dehydration, decellularized with a chemical treatment and gamma-sterilized. Briefly, for the decellularization process, rehydrated CAMs were placed in a bath of 8 mM CHAPS, 1 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.12 M NaOH, 1X PBS during 6 hours under strong agitation and then rinsed three times in 1X PBS during 30 min and finally once in distilled water overnight. Gamma-sterilization was obtained after 3 hours with an irradiation of 25 KGy.

2.4. Subcutaneous implantation in nude rats

Yarn was previously rehydrated and then inserted in the eye of a 17-cm-long needle. This was passed through 2 incisions made below the ears and above the tail with a 16 gauge needle in the skin of the back a nude rat under gas anesthesia (isoflurane), previously disinfected with ethanol. Antibiotics were sprayed on the incisions.

2.5. Yarns characterization

Diameter of yarns was determined with a laser micrometer (Xactum, AEROEL). Then, yarns were clamped in jaws of a tensile testing machine (MTS, Criterion 43, force sensor 250N), pre-tested at 20 mm/min until reaching 0.1N and then pulled until rupture.

2.6. Histology

Samples were fixed in 4% PFA overnight. After 2 rinses in PBS, samples were dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin sections (7 μm) were deparaffinized in toluene for 3 \times 5 minutes, followed by a descending series of ethanol and those were colored with H&E or processed for immunofluorescence.

The following antibodies used for staining were purchased from Abcam: rabbit polyclonal antibodies against collagen-I (ab34710), fibronectin (ab23750), thrombospondin (ab85762), CCR7 (ab32527) and CD206 (ab64693); mouse polyclonal antibodies against CD68 (ab31630). Deparaffinized sections were pretreated with citrate (pH 6.0) for 20 minutes at 95°C and then were washed with PBS. To block non-specific binding sites, 3% goat normal serum in PBS was used for 30 minutes at room temperature. Antibodies diluted in 3% goat serum in PBS (1:50 – 1:200) were applied on sections overnight at 4°C. Negative controls had no primary antibodies. Secondary antibodies Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen, A-11036) and anti-mouse (Invitrogen, A-1104) as well as Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (Invitrogen, A-11001) were diluted (1:300) in presence of DAPI (1:1000) and applied during 2h at ambient temperature. Cross sections of human skin were used as positive

control. Images were acquired using an epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i). Quantification of M1 (CD68+CCR7) and M2 (CD68+CD206) was done using a macro in ImageJ software.

2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism, Version 6 (GraphPad Software Inc. USA). Data is presented as mean \pm standard deviation (SD). Differences between the groups were determined on basis of analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison tests. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

In order to assess both the histological and mechanical changes due to the remodeling process, we subcutaneously implanted long segments of CAM yarn that ran from the lower back to the upper shoulders of nude rats using a 17 cm-long needle (Fig. 1A, B). The insertion of the needle created a tunnel where the yarn was simply left for 2 weeks, 1, 3 and 6 months. This simple implantation process illustrates how this material can be used just as any other yarn. Even 6 months after implantation, the yarns were easy to find and displayed no macroscopic sign of degradation or inflammation (Fig. 1C). Yarn retrieval was somewhat challenging at longer implantation times because the material was well integrated in the surrounding tissue (Fig. 1D). Great care was taken to only explant the original yarn and remove surrounding tissue. We implanted strips of a commercially available membrane made from purified collagen as a positive control (Fig. 1E). After 1 month of implantation, the membrane was so significantly degraded that it could not be retrieved for mechanical testing despite being quite sturdy at implant. (Fig. 1F) Clearly, it had triggered an inflammatory response as seen by the brown color of the remaining parts of the sample. This confirmed that nude rats have a functional innate immune system capable of rapidly degrading ECM when it is denatured.

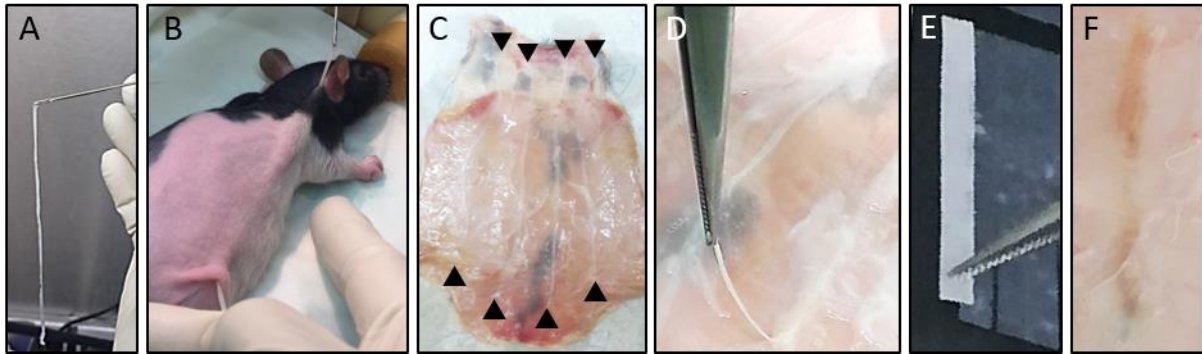


Fig. 1. Subcutaneous implantation in nude rats. (A,B) Yarns were inserted in the eye of a 17-cm-long needle that was used to create a tunnel under the skin of the rat. The yarn was simply pulled in place and left for up to 6 months. (C) Macroscopic view of the underside of the skin of a rat where 4 ribbons were easily identified after 6 months (arrow heads). No macroscopic sign of degradation, inflammation, scarring or calcification was visible. (D) Even after 6 months of implantation, yarns could be pullout from the surrounding tissue although it required careful dissection because the material was very well integrated. (E) The commercial collagen membrane was white before implantation. (F) Degradation of a commercial collagen membrane only 1 month after implantation by the innate immune system of the rat leading to a brown color under the skin. The tissue could not be recovered in one strip for mechanical testing.

In a first experiment, we implanted living 5-mm-wide ribbons and devitalized ribbons to assess if the devitalization processing (dehydration / storage at -80°C / rehydration) was “denaturing” the CAM (Fig. 2A). Samples of around 10 cm of each yarn were harvested to determine their tensile strength and stress (UTS) after up to 6 months of *in vivo* remodeling. Fresh living yarns were shown to maintain their mechanical strength (force at failure) over the 6-month implantation period. Standard deviations were larger at later time points, which may be the results of some damage made to the yarn during implantations that became more challenging with time. The devitalized ribbons also showed no statistically significant changes in strength, which confirmed that the devitalization process did not denature the CAM enough to trigger an innate immune response. Analysis of the UTS showed a drastic increase with longer periods of implantation, which is the result of a decrease in yarn diameters since the breaking force did not change (Fig. 2B). This is suggestive of tissue compaction.

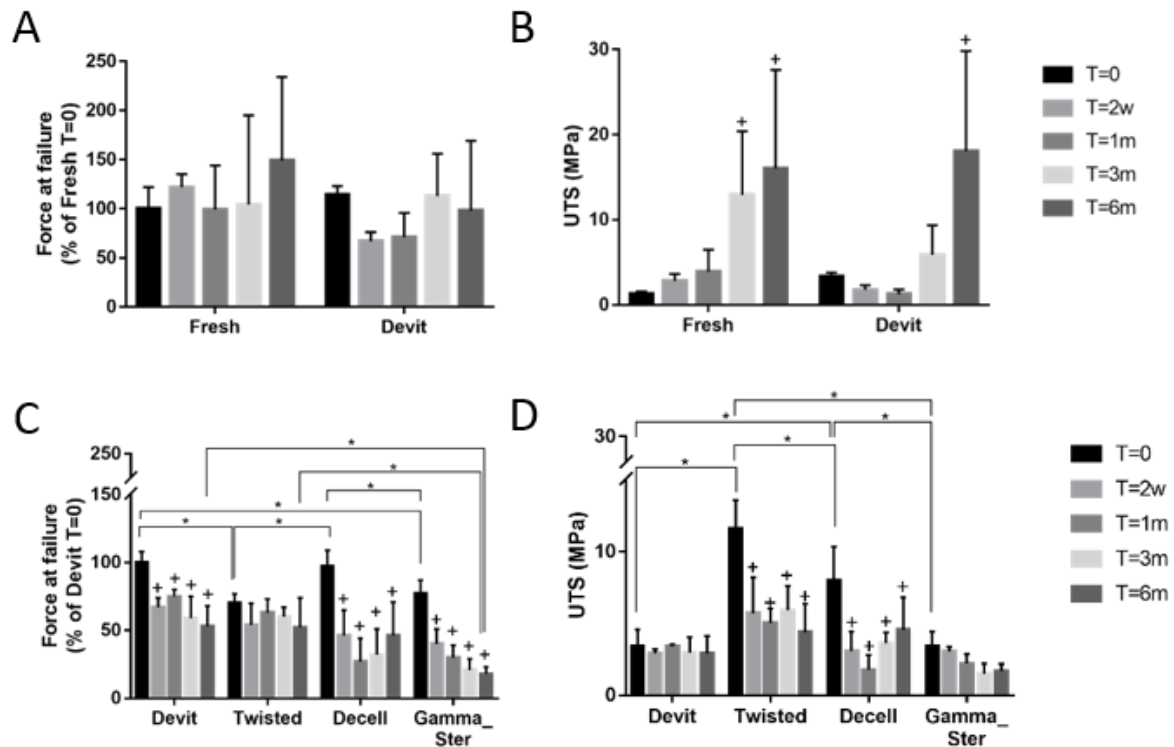


Fig. 2. Tensile force at failure and ultimate tensile stress (UTS) before and after implantation. (A) The devitalization process had no significant effect on the strength of fresh ribbons. Both type of ribbons remained strong up to 6 months. (B) UTS was significantly increased in fresh and devitalized ribbons due to the decrease of the diameter at late time point. (C) The strength of all yarns decreased after implantation, except for twisted yarns, suggesting that the latter's high compaction made it resistant to initial remodeling. Our decellularization process had no immediate effect but caused a transient loss of strength after implantation. The gamma sterilization decreased significantly the strength before implantation and increased the loss of strength after implantation suggesting damage to the CAM that triggered a degradative response. (D) Even if the strength of twisted yarns was stable over the time, the UTS decreased after implantation due to an initial increase in diameter which might be due to some untwisting upon implantation. + = $p < 0.05$ compared to T=0, * = $p < 0.05$, n=16 for pre-implants, n=4-8 for implants.

In a second set of experiments, we wanted to examine the effects of additional processing steps that are relevant to the manufacturing strategy of a tissue-engineered construct. These included: twisting the ribbons into threads, active decellularization to remove cellular debris, and gamma sterilization (Fig. 2C). In this experiment, devitalized ribbons were used as control since this is the form most conducive to a commercially viable strategy. We can observe that the measurement variability of this experiment was lower, maybe due to a less aggressive dissection at explant causing less damage to the

yarn. This better resolution allowed us to see a statistically significant loss of strength of the devitalized ribbon upon implantation but this loss of strength was not dependent on implantation time. In this experiment, a large increase in UTS at late time points was not observed (Fig. 2D). This may also be due to a less aggressive tissue dissection at explant of later time points, which would leave more surrounding loose tissue, which in turn would increase the diameter of the yarn without providing additional strength.

Ribbon twisting at 7.5 rev/cm, which is a high level of twisting, decreased somewhat the strength of the yarn (Fig. 2C). However, we can see that these threads, unlike ribbons, did not significantly lose strength upon implantation at any time point (Fig. 2C). Interestingly, at 6 months, both ribbons and threads had the same stable strength which was just above 50% of the initial strength of the ribbons. The UTS of the threads dropped upon implantation which may be due to an increase in diameter following some unwinding at the time of, or shortly after, implant (Fig. 2D). While threads would readily unwind if not physically restrained before implantation, explanted threads would remain twisted even after only two weeks of implantation. The decellularization process had no immediate effect on mechanical strength (Fig. 2C). Decellularized ribbons had a similar statistically significant loss of strength over the 6-month implantation period as devitalized ribbons. Decellularization increased UTS at T=0 because it had a compaction effect on the matrix that resulted in smaller yarn diameter (Fig. 2D). However, after implantation, UTS decreased to devitalized levels and changed following the change pattern observed for the strength, which indicated a stable diameter. Gamma sterilization caused a decrease in strength of the ribbons ($77 \pm 10\%$ of devitalized) that was significant compared to both devitalized and decellularized ribbons (Fig. 2C). After implantation, the gamma-sterilized ribbons loss strength in what appeared to be a progressive process throughout 6 months. UTS did not significantly change after sterilization or over the implantation period although it trended down with time.

To observe structural changes in processed yarns, we performed histological analysis of cross sections before implantation (Fig. 3). Devitalized ribbons were composed of dead fibroblasts that could still be clearly identified in the dense collagen network. The twisting compacted the devitalized matrix and gave a corrugated appearance to the collagen fibers and bent the nuclei. The decellularization removed all traces of nuclei and made the staining of the CAM slightly less intense. The gamma sterilization clearly increased the delamination in the CAM and also decreased the eosin staining as well as caused the apparition of some grayish area. In addition, the matrix and the nuclei appeared “fuzzy” (a phenomenon also seen, but to a lesser extent with decellularized yarn). This is in line with the adverse impact on the mechanical strength of the sterilized yarn seen in Fig. 2.

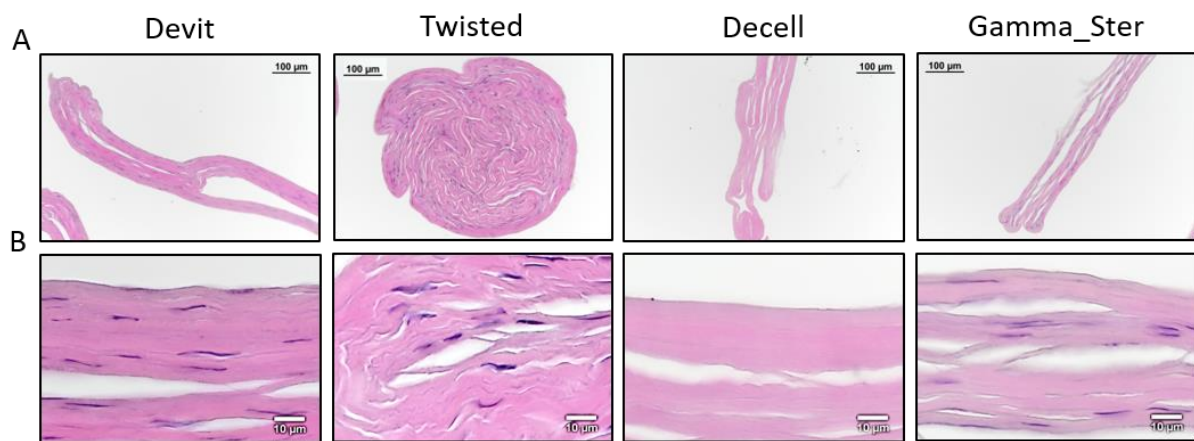


Fig. 3. Histological cross sections of processed yarns stained with ribbons unfolded during histological processing. The devitalized ribbon displayed picnotic and hyperchromatic nuclei, suggesting cell death, embedded in a dense striated collagen network. The twisting led to the compaction of the tissue and the matrix became corrugated. The decellularization removed all visible traces of nuclei and slightly reduced staining of the matrix. The gamma sterilization had denaturing effects on both cells and matrix: the nuclei and the matrix became blurred; the dye had a decreased affinity for collagen suggesting fibers collagen degeneration. Moreover, this process led to an increase in the delamination of the matrix. Scale bar = 100 µm (A), 10 µm (B).

We then looked at the histology of implanted yarns to evaluate the inflammatory response and remodeling process. At 2 weeks, devitalized ribbons, our preferred yarn for manufacturing, were already well integrated in the surrounding tissue as judged by the close apposition to the native tissue (despite the histological processing), and the presence of migrating fibroblastic cells between and within the CAM layers (Fig. 4A). Some poorly stained cells were observed within the matrix and, we hypothesize, could have been human fibroblasts remnants. Only mild inflammation was seen in the periphery of the implant (no inflammatory foci, no giant cells, no phagocytizing macrophages). Even at this early time point, new blood vessels were seen within the CAM layer (Fig. 4A, inset). By 1 month (Fig. 4B), the yarn was tightly connected to the surrounding tissue, colonizing fibroblastic host cells were seen deeper in the implant (Fig. 4B, inset), many blood vessels surrounded the yarn, and some rare immune cells could still be identified around the tissue. No signs of degradation were visible. By 3 months, the density of host cells and blood vessels within the yarn decreased but were still present throughout the yarn. The tissue around the yarn looked like normal, loose, connective tissue and not a dense fibrous encapsulation. By 6 months, similar observations could be made suggesting a stable remodeling. Fresh ribbons underwent a similar remodeling process (Suppl. Fig.). Conversely, the purified collagen membrane was extensively degraded at only 2 weeks and actively phagocytizing macrophages can be easily identified throughout the implant site (Fig. 4E, F).

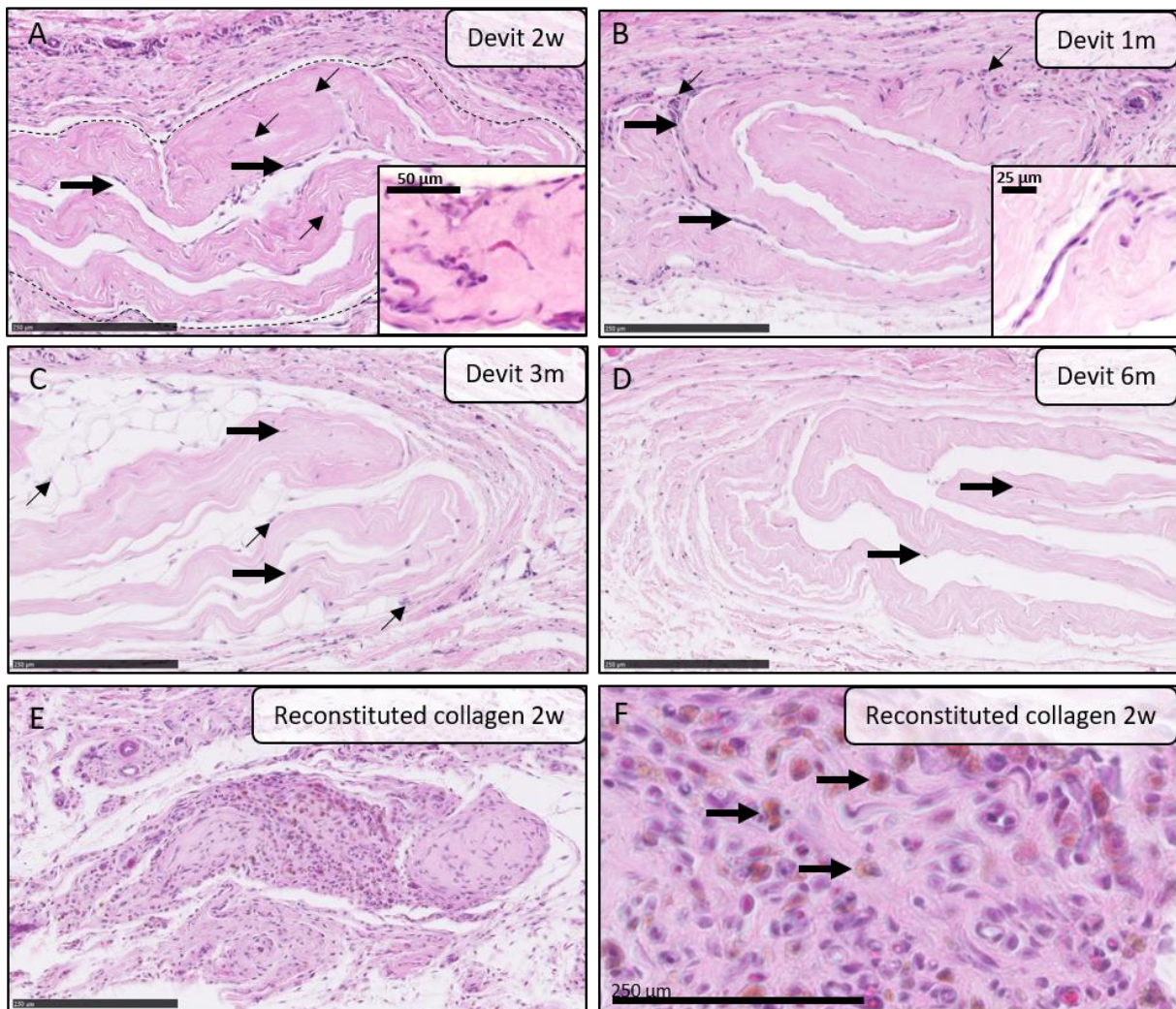


Fig. 4. Remodeling of devitalized ribbons in nude rats. (A) At 2 weeks, mild inflammation was observed around the implant but no inflammatory foci, nor giant cells, nor phagocytizing macrophages were observed. Fibroblastic cells were seen within the yarn structure at the surface (large arrows) and within the CAM layers. Poorly stained nuclei were noted within the CAM layers (small arrows), which could be degraded human cells. (Inset) Vascularization of the outer layer of CAM was revealed by the presence of red blood cells. (B) At 1 month, repopulating cells were observed deeper in the yarn structure (inset) while multiple blood vessels and a less inflammatory cells surrounded the implant. (C, D) After 3 and 6 months, only sparse fibroblastic cells (large arrows) and occasional blood vessels (C, small arrows) were present within the yarn. The implants were surrounded by loose connective tissue with no signs of inflammation. Adipocytes were sometimes seen within the yarns and were accompanied by numerous blood vessels (C, small arrows). (E) The commercial reconstituted collagen membrane was highly cellularized, mostly degraded, and brownish actively phagocytic macrophages (black arrows) were seen at higher magnification (F). Scale bars = 250 μm.

Like unprocessed ribbons, processed ribbons underwent an *in vivo* remodeling that involved an inflammatory reaction that was resolved at 3 to 6 months (Fig. 5). At 6 months, all tissues appeared paler. Twisting of the matrix reduce the number of cells that initially migrated in the yarn as a result of CAM compaction (Fig. 5A). However, by 6 months, the yarn appeared less compact. Decellularized ribbons were already repopulated by the hosts' cells after 2 weeks (Fig. 5C) with cells clearly visible within the CAM layers (inset) supporting our interpretation of the histology of devitalized ribbons. In contrast to other yarn, gamma-sterilized ribbons caused a more intense inflammatory reaction with abundant immune cells deep inside the yarn structure, although generally not penetrating the CAM itself (Fig. 5E). At 6 months, the yarn was also sparsely populated with cells, lodged in a loose conjunctive tissue, and showed no signs of inflammation. However, the layers of CAM were clearly thinner than that of other yarns (Fig. 5F), which is consistent with the loss of mechanical strength reported in Fig. 2.

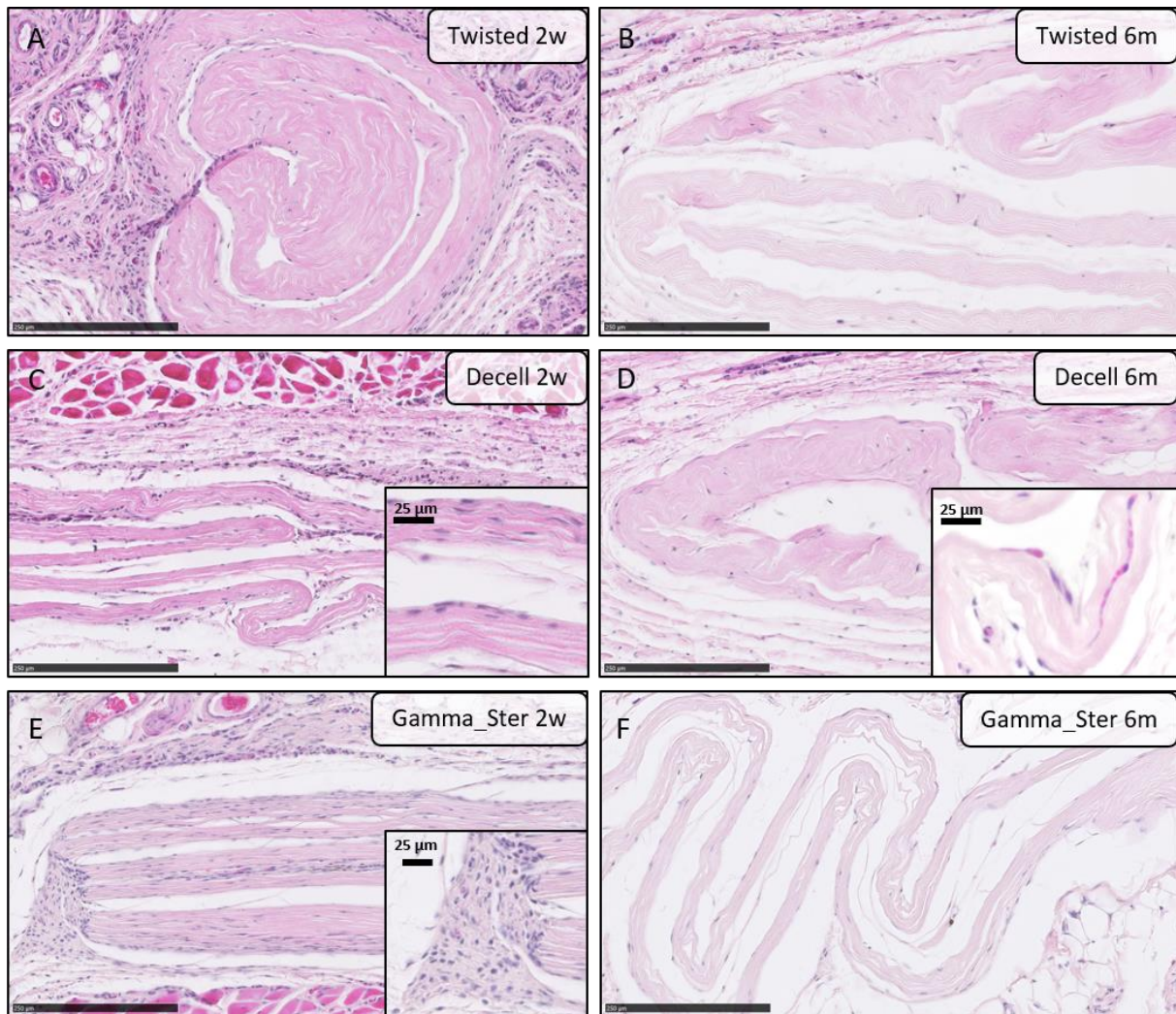


Fig. 5. Effect of processing on yarn remodeling process in nude rats. (A) At 2 weeks, twisted threads appeared compact and were less colonized by the hosts' cells. Mild inflammation was observed around the implant. (B) At 6 months, the thread was sparsely populated with fibroblastic cells and surrounded by loose conjunctive tissue. (C) Decellularized ribbons were rapidly repopulated by rat cells, which could be seen within the CAM layers (inset). (D) By 6 months, the ribbons looked similar to other yarns. (Inset) vessels could occasionally be seen deep in the center of the yarn. (E) Gamma-sterilized ribbons caused a more intense inflammatory response (inset) with abundant immune cells deep within the yarn. (F) By 6 months, the inflammation had subsided but the CAM layers were clearly thinner than other yarns. Scale bars = 250 µm (25µm in inset).

Next, to further study the remodeling process, the distribution of three key ECM proteins was analyzed by immunofluorescence. Collagen I was homogeneously distributed through the thickness of all yarn and its distribution did not appear to change over time after implantation. Fig. 6A-D shows the case of the twisted thread but similar observations were made for all yarns. However, thrombospondin, which was highly expressed in the CAM [8], disappeared after 1 month of implantation from all yarns except from the gamma-sterilized threads which still stained positively after 6 months (Fig. 6E-H). In the case of fibronectin, which was concentrated on the outer surfaces of the CAM, the protein was slowly lost over the 6 months of implantation similarly in all yarns (Fig. 6I-L).

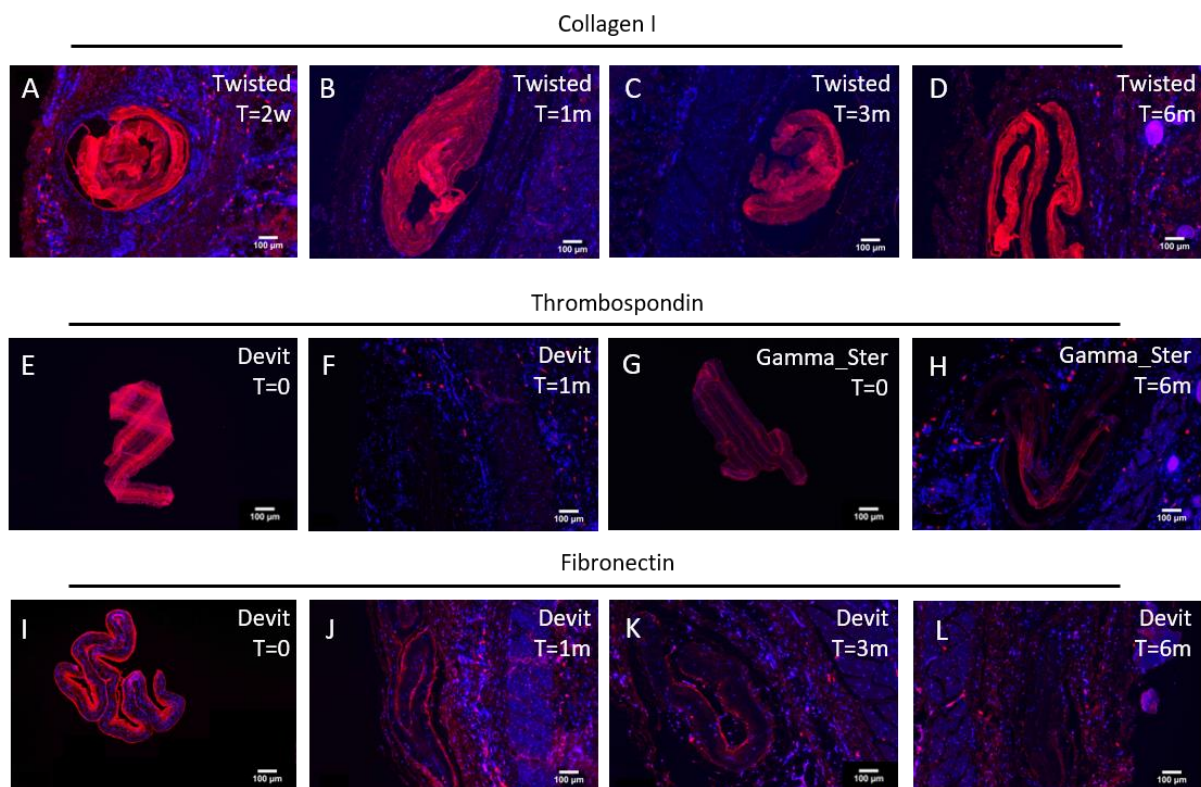


Fig. 6. Distribution of collagen I, thrombospondin, and fibronectin in yarns before and after. (A-D) Collagen I (red) was abundant and homogeneously distributed in all twisted ribbons, and appeared unchanged over the time. (Nuclei = blue) (E, F) Thrombospondin was abundantly expressed in layers in the CAM but was completely absent from devitalized yarns at 1 month. (G, H) Conversely, gamma-sterilized ribbons were less intensely stained for thrombospondin at T=0 but remained positive for thrombospondin through 6 month. (I-L) Fibronectin was concentrated at the surface of the CAM before implantation but it slowly disappeared over the 6 month implantation. Scale bar = 100 µm.

To analyze the inflammatory response to the various types of yarn, we quantified M1 (inflammatory) and M2 (remodeling) macrophages (Fig. 7). First, we compared the inflammatory response of fresh and devitalized ribbons (Fig. 7A, B). Macrophage density was low, similar for M1 and M2, and decreased over time. There was no significant difference between yarns for the density of M1 or M2 macrophages, or their ratios, at any time point. Next, we compared processed yarn to devitalized ribbons (Fig. 7C). Gamma-sterilized ribbons had a statistically significant higher density of macrophage expressing an inflammatory M1 phenotype than other yarns. M1 density significantly decreased over time and was similar to other yarns at 6 months, suggesting inflammation resolution.

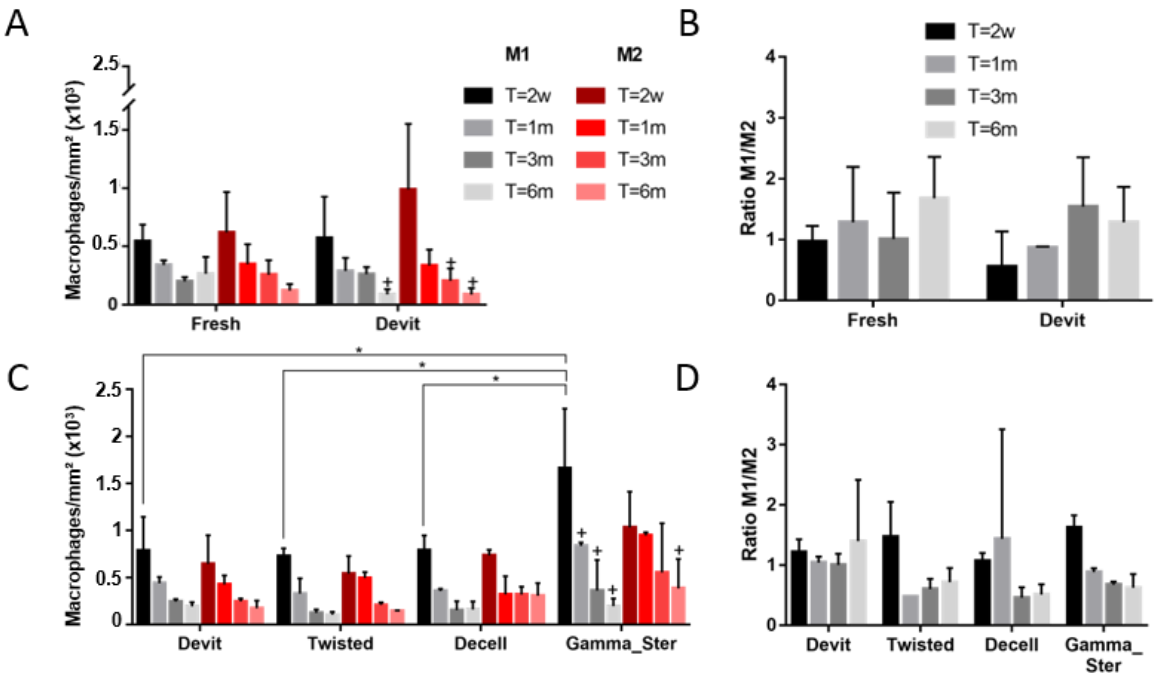


Fig. 7. Macrophage density and phenotypes after implantation. (A) The inflammatory response for both fresh and devitalized ribbons was low and decreased with time. No difference was observed for M1 or M2 macrophages density. (B) M1/M2 ratios were not statistically different. (C) The inflammatory response for devitalized, twisted and decellularized ribbons were low and very similar. However, gamma-sterilized ribbons caused an initial accumulation of M1 macrophages that was significantly higher than other yarn. After 6 months, that number reached the same level than other yarns. (D) M1/M2 ratios did not statistically vary between yarns. + : $p < 0.05$ when compared with T=2w, * : $p < 0.05$, $n = 3$.

4. Discussion

We have previously shown that CAM-based TEVG, obtained by rolling sheets of CAM, can be functional arteriovenous shunts in humans for over 20 months (up to 36 months, data not shown) [1]. However, this is only an indirect demonstration of the CAM's ability to persist *in vivo*. In this study, we wanted to analyze the remodeling of the CAM in a much more controlled environment and using a simpler implant. We demonstrated that the human CAM is, indeed, very long-lived *in vivo*. We used an immunodeficient rat model to avoid any rejection of the xenogeneic material by the adaptive immune system since this would not be relevant to the clinical setting. We used a sturdy, clinically available, reconstituted collagen membrane as a control to prove that the innate immune system of the nude rats was functional. As expected, because the collagen had been solubilized then reconstituted, the innate immune system of the rat identified it as damaged or denatured and aggressively destroyed it. The membrane, which has a predicted life of 8 weeks in humans according to the manufacturer, was already unretrievable 2 weeks after implantation (Fig. 1E, F). In contrast, our human "bio-material" was easily identified and could be explanted after 6 months (Fig. 1C, D).

We wanted to evaluate both the histological and mechanical manifestations of the inflammatory response to provide a comprehensive picture of the *in vivo* remodeling. However, the explantations of the entire yarn were sometimes challenging, especially at longer time points, because the tissue was so well integrated in the host. In the first series of implantations, we attempted to remove as much surrounding tissue as possible to avoid interference with the mechanical evaluation of the yarn. This may have led us to damage the yarn and could explain the variability observed in the mechanical properties of this set of yarns (Fig. 2A, B). With subsequent implants, a much less aggressive dissection gave much smaller standard deviations and likely did not affect the values of the strength measurement because the surrounding tissue was quite loose conjunctive tissue as seen in histology (Fig. 2C, D). However, this excess tissue would have increased the apparent diameter of the yarn and may have masked or underestimate the UTS.

Mechanically, fresh and devitalized ribbons were not significantly different before or after implantation. This is in agreement with our previous histological observations showing that the organization of the CAM is not substantially affected by the devitalization process [8]. The remodeling of fresh ribbons was slightly different in that they had: 1) more cells present at all times, suggesting that human cells can survive the transplant, and 2) more blood vessels in the yarn, which may be the consequence of having more cells that sent signals to attract needed vascularization. While fresh CAM remodeling is interesting, we focused our study on the devitalized yarns because these are much more compatible with a commercially viable production strategy for human textiles.

We compared devitalized ribbons with ribbons that were further processed by either, tightly twisting the ribbon into a thread, decellularizing the matrix with chemicals, or gamma-sterilizing. These are all processing steps that are very relevant to a tissue engineering approach since they would allow, respectively, tuning of the mechanical properties, possibly reducing the inflammatory response and, allowing non-sterile yarn production and assembly. Twisting somewhat decreased the force at failure but more than doubled the UTS of the yarn. It also protected it from the initial inflammatory response of the host which caused a significant early (within the first 2 weeks) decrease in mechanical strength of all yarns. Histological analysis suggests that this was due to tissue compaction that prevented access of the inflammatory cells to much of the CAM at the early time point. At later time points, the thread appeared less compacted on histology (probably due to a lack of mechanical constraints) but, by then, the mild and transient inflammatory response was over. Nonetheless, the threads felt strong and compact at explantation, which made the process easier than for other yarns.

Decellularized tissue had similar mechanical strength and *in vivo* remodeling process than devitalized thread. This clearly demonstrates that the remnants from the dead human fibroblasts did not cause an additional non-specific immune reaction. While debris from cell death are often cited as important inflammatory mediators [9] [10], this was not the case here. This may be because cells died quickly without going into apoptosis or other types of programmed cell death, or because the density of cells

is low, and the type different, compared to what would be found in a dead native tissue like muscle. While this decellularization process did not seem to denature the matrix significantly, it appears to be an unnecessary processing step that could damage some quality of the matrix that was not evaluated here, while creating a risk of leaving some chemical residues. The remodeling process of the decellularized ribbons showed a rapid repopulation of the matrix, which confirmed the histological observations from the decellularized implants. This is in agreements with other implant studies of matrix produced *in vitro* [11] [12].

Gamma irradiation is a widely-used sterilization scheme for biological products [13] [14]. However, we showed that this treatment clearly affected the CAM by decreasing its mechanical strength, changing its histological appearance, modifying its affinity for stains, and even affecting the remodeling of a matrix protein. The yarn even looked and felt different at the time of implantation, as it was more transparent, stiffer and more hydrophobic. This processing also influenced the remodeling process as it significantly increased the density of M1 macrophages at early time points as well as increased the loss of strength and led to a clear thinning of the CAM after 6 months of implantation. Moreover, it has been described as cytotoxic for cells in a context of human bone allografts [14], deleterious for the mechanical properties of cruciate ligament and tendon allografts [15] [16]. This is in contrast with the remodeling of the other 3 yarns tested, which did not lose strength after the initial 2-week period. Nonetheless, the inflammatory response to the gamma-sterilized yarn was resolved by 3 to 6 months, which leaves the possibility of using this process if these changed are account in the product design. But ideally, other sterilization methods, such as ethylene oxide, e-beam, supercritical CO₂ or liquid chemicals, should be explored to find a less denaturing strategy.

5. Conclusion

This study was the first formal evaluation of the CAM's remodeling *in vivo*. At the end of the 6-month implantation, all the yarns were well-integrated in a loose conjunctive tissue with no signs of chronic inflammation (no inflammatory foci, no giant cells, no phagocytizing macrophages or calcification). No dense or acellular fibrous encapsulation was observed. All yarns were characterized by a sparse population of fibroblastic cells throughout the tissue and occasional blood vessels, which did not appear to evolve between 3 and 6 months suggesting a stable environment. Taken together, these results demonstrate that the CAM is a long-lived biological material that causes very low inflammation and can play a long-term mechanical role after implantation. Hence, yarns of CAM can be used to produce completely biological human textiles for a variety of applications where low inflammatory responses, sustained mechanical strength, and a slow remodeling process are essential.

Acknowledgments

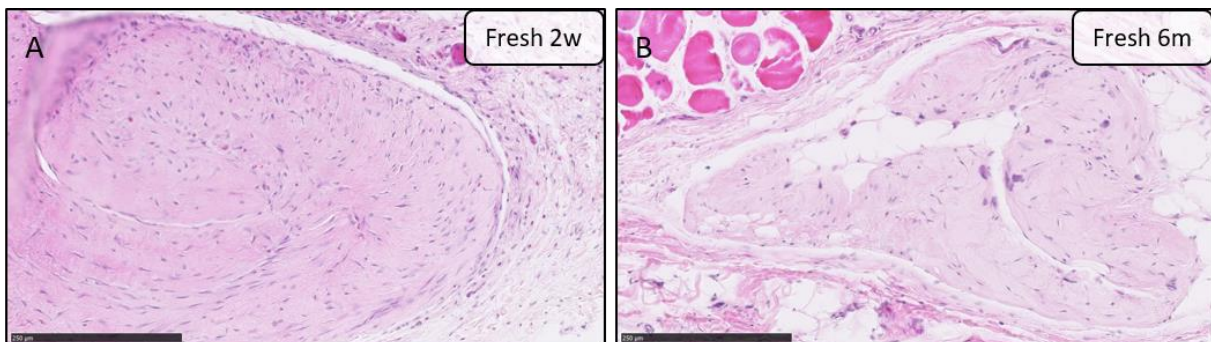
This work was supported by *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur* in 2015, *Chaire seniore de l'Initiative d'Excellence de l'Université de Bordeaux (IdEx Bordeaux)* in 2015 and *Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE18-0024-01)* in 2016 of France.

We thank Sylvie Rey, Niki Sarika, Yoann Torres, Agathe Grémare and *CIC-IT Biomatériaux et dispositifs médicaux implantables* for their technical support.

References

- [1] 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*. 373 (2009) 1440–1446. doi:10.1016/S0140-6736(09)60248-8.
- [2] 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, *Lancet*. 387 (2016) 2026–2034. doi:10.1016/S0140-6736(16)00557-2.
- [3] N. L'heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, F.A. Auger, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *The FASEB Journal*. 12 (1998) 47–56.
- [4] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. König, 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, *Nature Medicine*. 12 (2006) 361–365. doi:10.1038/nm1364.
- [5] N. L'Heureux, T.N. McAllister, L.M. de la Fuente, Tissue-Engineered Blood Vessel for Adult Arterial Revascularization, *New England Journal of Medicine*. 357 (2007) 1451–1453. doi:10.1056/NEJMc071536.
- [6] 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, *Journal of Vascular Surgery*. 60 (2014) 1353–1357. doi:10.1016/j.jvs.2013.08.018.
- [7] L. Magnan, G. Labrunie, M. Fénelon, N. Dusserre, M.-P. Foulc, M. Lafourcade, I. Svahn, E. Gontier, T.N. McAllister and N. L'Heureux, Tissue-Engineered Yarn: a New Bio-Material for the Production of Entirely Human Textiles, *Adv. Mater.* (2018), in preparation.
- [8] L. Magnan, G. Labrunie, S. Marais, S. Rey, N. Dusserre, M. Bonneau, S. Lacomme, E. Gontier and N. L'Heureux, Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process, *Acta Biomaterialia*. (2018). In press, doi:10.1016/j.actbio.2018.10.006.
- [9] E. Vénéreau, C. Ceriotti, M.E. Bianchi, DAMPs from Cell Death to New Life, *Front Immunol*. 6 (2015) 422. doi:10.3389/fimmu.2015.00422.
- [10] J.P. Kolb, T.H. Oguin, A. Oberst, J. Martinez, Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming, *Trends Immunol*. 38 (2017) 705–718. doi:10.1016/j.it.2017.06.009.
- [11] 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, *Science Translational Medicine*. 3 (2011) 68ra9-68ra9. doi:10.1126/scitranslmed.3001426.
- [12] 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, *Science Translational Medicine*. 9 (2017) eaan4209. doi:10.1126/scitranslmed.aan4209.
- [13] S.-S. Gouk, T.-M. Lim, S.-H. Teoh, W.Q. Sun, Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: Histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 84B (2008) 205–217. doi:10.1002/jbm.b.30862.
- [14] M.F. Moreau, Y. Gallois, M.F. Baslé, D. Chappard, Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells, *Biomaterials*. 21 (2000) 369–376.
- [15] H.E. Schwartz, M.J. Matava, F.S. Proch, C.A. Butler, A. Ratcliffe, M. Levy, D.L. Butler, The effect of gamma irradiation on anterior cruciate ligament allograft biomechanical and biochemical properties in the caprine model at time zero and at 6 months after surgery, *Am J Sports Med*. 34 (2006) 1747–1755. doi:10.1177/0363546506288851.
- [16] B.P. Conrad, M. Rappé, M. Horodyski, K.W. Farmer, P.A. Indelicato, The effect of sterilization on mechanical properties of soft tissue allografts, *Cell and Tissue Banking*. 14 (2013) 359–366. doi:10.1007/s10561-012-9340-2.



Suppl. fig. Histology of fresh ribbons. (A) At 2 weeks, fresh ribbons contained more cells than devitalized ribbons suggesting that human cells survived the implantation process. They also had more blood vessels. They induced a similar inflammatory response than devitalized ribbons. (B) At 6 months, the inflammation was resolved and the ribbons had a more sparse cell population. Some adipocytes were visible in this samples as was sometimes the case with other yarn.

XI. DISCUSSION

Quelques éléments de cette thèse méritent d'être discutés.

Grâce à cette thèse, nous avons pu définir le fil de *CAM* comme un vrai « bio-matériau » : il combine une véritable biocompatibilité avec une facilité d'emploi qui permet le stockage, l'automatisation et la création d'une variété de structures avec des propriétés mécaniques adéquates pour des applications diverses. Elle est riche en protéines de la MEC organisées en réseau complexe de façon similaire à une matrice naturelle, permettant ainsi de conserver les sites d'interaction, et ce, même lorsque la matrice est dévitalisée. Cette propriété lui permet de supporter la croissance d'autres types cellulaires, de ne pas entraîner de réponse inflammatoire significative, de ne pas être dégradée *in vivo* et de ne pas être reconnue comme un corps étranger. De plus, elle possède une résistance mécanique impressionnante.

Autant d'avantages qui prouvent que la *CAM* ne se limite pas à une utilisation cardiovasculaire. En effet, ses propriétés peuvent être mises à profit pour de nombreuses autres applications : création de biotextiles grâce aux fibres créées par découpage de la *CAM* (régénération tissulaire de tendon et ligaments, par exemple), utilisation comme fil de suture, comme *patch* ou comme transporteur de médicaments. Le *catgut* par exemple, est un fil de suture chirurgical obtenu par entrelacement de fibres de collagène purifié à partir du petit intestin de ruminants. Il est naturellement et entièrement dégradé par les enzymes protéolytiques et la réaction inflammatoire après 70-90 jours d'implantation et garde sa force pendant 7 jours (236). Il est interdit en France à cause de la possibilité de transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine.

Par ailleurs, plusieurs produits commerciaux à base de collagène purifié sont actuellement disponibles (237). Le GENTA-COLL® resorb de la société Resorba est une éponge de collagène équin utilisée pour la cicatrisation des tissus mous, les infections associées aux implants et l'hémostase par exemple. Il permet également de délivrer un antibiotique localement. Dans ces cas, la *CAM* pourrait être considérée comme une bonne alternative, qu'elle soit sous forme de fils ou de patch. Néanmoins, le coût de production de la *CAM* pourrait constituer un frein pour une telle utilisation.

De plus, la stratégie d'utilisation de cellules autologues pour la synthèse de MEC *in vitro* a également montré très récemment son efficacité grâce à l'implantation de substituts de peau chez des grands brûlés (238). Ces greffons, grâce à leur excellente biocompatibilité, ont pris dans 98% des cas et gardaient leur intégrité pendant 3,2 ans en moyenne.

Certaines considérations sont à prendre concernant la culture de fibroblastes. En effet, les fibroblastes sont un type cellulaire de choix car ils sont faciles d'accès (par biopsies de peau par exemple), ubiquitaires, disponibles pour des traitements autologues, ont une fonction immunosuppressive, ne posent pas de problème de rejet et ont la propriété de différenciation multipotente (196). Toutefois, les fibroblastes ne possèdent pas de marqueurs spécifiques. Ce paramètre est un problème pour notre étude puisqu'aucune distinction n'a été possible entre les fibroblastes humains, présents dans la CAM, et les fibroblastes de rat, présents dans la peau ou qui colonisent la CAM. Néanmoins, l'implantation d'une CAM décellularisée a permis de montrer la recolonisation par les cellules de l'hôte et donc de mettre en avant la migration des fibroblastes de rat dans une matrice humaine (voir Article 3, Figure 5).

Une autre remarque quant à la culture de fibroblastes, est la nécessité d'utiliser une source de sérum. Dans notre étude, nous utilisons du sérum de veau fœtal. Bien que la culture de cellules en présence de sérum ne soit pas sans risque (235), de nombreux produits commerciaux ou en essais cliniques font appel à cette procédure. Comme évoqué précédemment, l'équipe du laboratoire LOEX a mené une étude clinique sur l'utilisation de substituts de peau obtenus par synthèse de MEC *in vitro*. Cette équipe utilise du sérum de veau fœtal et aucune réponse indésirable n'a été déplorée à ce jour (238). L'équipe de Niklason utilise également ce sérum pour produire ses substituts vasculaires (113). De plus, la société Organogenesis commercialise un substitut de peau sous le nom d'Apligraf®. Ce substitut vise à traiter les ulcères veineux des jambes et les ulcères du pied diabétique. Il est également produit par culture de fibroblastes et de kératinocytes sur du collagène de type I bovin et avec de l'extrait pituitaire (247). Ce produit commercial utilise la cryopréservation de ses cellules avant le développement du substitut. Cette stratégie leur permet d'obtenir un grand nombre de produits à partir d'une seule lignée cellulaire pour le développement de modèles allogéniques.

Dans cette étude, nous avons utilisé la déshydratation comme stratégie de dévitalisation. La congélation entraîne, au même titre que la dévitalisation, la mort des cellules à l'intérieur du substitut. De plus, la déshydratation de films de collagène a été réalisée dans le cadre de régénération de la cornée et ne modifiait pas la biocompatibilité du matériau (248). Ainsi, l'implantation de tissu dévitalisé, stratégie que l'on souhaite utiliser dans notre étude, ne semble pas être une ineptie puisque, ni la présence de cellules mortes, ni le séchage des protéines de la MEC, ne semble être un problème pour l'implantation.

Un argument concernant la viabilité des cellules sur un tissu dévitalisé est l'observation de l'amélioration de la prolifération et de la migration de cellules sur notre tissu. En effet, des impressions par jet d'encre de cellules endothéliales humaines ont été réalisées sur la *CAM* dévitalisée et réensemencée avec des fibroblastes frais. Une étude menée au laboratoire repose sur l'évaluation de l'utilisation du feuillet de *CAM* comme *bio-paper*. Cette technique a permis de créer des réseaux interconnectés de cellules endothéliales comparable aux résultats obtenus lorsque l'impression est effectuée sur un gel de collagène. L'avantage de la *CAM* par rapport au collagène purifié repose sur ses bonnes propriétés mécaniques permettant sa manipulation et son application pour la régénération de réseaux vascularisés.

XII. CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse repose sur la combinaison d'une approche textile avec la CAM de fibroblastes pour permettre la fabrication de structures biologiques complexes, humaines et implantables. Cette thèse a permis de mettre en évidence la composition très riche en protéines de la CAM et notamment en collagènes. En effet, cette CAM est organisée en un réseau très dense de plusieurs familles de collagènes. Cette propriété lui confère une résistance mécanique impressionnante, sans avoir recours à un matériau exogène. Sous forme de feuillet, elle est capable de supporter jusqu'à 1000 gf après 10 semaines de culture.

Par ailleurs, sa synthèse entièrement réalisée par des cellules, permet d'obtenir une organisation similaire à celle d'une matrice biologique naturelle. Contrairement aux matrices obtenues à partir de protéines purifiées, la CAM est une matrice biologique intacte et préserve donc ses sites d'interaction biologiques avec les cellules. En effet, elle est capable de supporter la croissance d'autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales par exemple. Ces propriétés font de la CAM un vrai bio-matériau pour supporter différentes activités biologiques.

En outre, elle constitue également un excellent environnement pour l'intégration et le remodelage *in vivo*. En effet, son implantation sous-cutanée a entraîné une faible réponse inflammatoire sans dégradation notable et ce, même pour un tissu dévitalisé dont les cellules ont été tuées par séchage.

De plus, l'utilisation de cette CAM sous forme de rubans et de fils a permis de développer pour la première fois des textiles humains aux structures complexes. Cette approche a notamment permis de créer un substitut vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire 3 fois plus rapidement que précédemment (142) (143) et dont les propriétés sont contrôlables à plusieurs niveaux : diamètre, porosité, épaisseur, force directionnelle (par changement de la densité, orientation et propriétés des fils). Ce substitut a montré des valeurs de pression à l'éclatement et de résistance à l'arrachement des sutures, paramètres critiques pour la réussite d'un greffon vasculaire, supraphysiologiques.

Par ailleurs, les effets de la dévitalisation sur la matrice ont été analysés. Ce procédé permet le stockage de la matrice sèche et permet de s'affranchir de l'utilisation d'un tissu frais lors de la construction d'un tissu tissé par exemple. En effet, les études menées sur l'organisation de la CAM ont montré que la dévitalisation n'entraînait pas de changements significatifs.

Mais de façon plus importante, cette thèse a montré que la dévitalisation n'entraînait pas de réaction inflammatoire supérieure à celle causée par le tissu frais. De plus, elle a permis de mettre en évidence des résultats similaires entre une matrice dévitalisée vs décellularisée, quant à la réponse inflammatoire et l'intégration *in vivo* ainsi qu'à la résistance mécanique. Cette analyse souligne que la décellularisation représente une étape supplémentaire qui est peut-être superflue puisqu'une simple déshydratation n'entraîne pas de résultats inférieurs.

Pour conclure, cette thèse a permis le développement, par une approche innovante, d'un substitut vasculaire textile issu de l'ingénierie tissulaire qui est entièrement biologique, humain, non dénaturé, aux propriétés mécaniques remarquables, et qui a le potentiel de s'intégrer sans effets indésirables *in vivo*.

XIII. PERSPECTIVES

Plusieurs études complémentaires seraient nécessaires pour améliorer et poursuivre nos travaux.

L'un des inconvénients de l'utilisation de la CAM est le temps de production. En effet, 2 mois de culture cellulaire sont nécessaires pour obtenir une matrice suffisamment résistante pour être manipulée, avec une force pertinente pour le développement d'un greffon vasculaire par exemple. Bien que l'utilisation de la CAM sous forme de fils permette de contrôler la force (torsadage, épaisseur, etc.), l'optimisation du temps de production du collagène est un paramètre important, tant sur le plan sanitaire que sur le plan économique. L'utilisation de l'ascorbate, cofacteur essentiel pour l'hydroxylation des prolines et lysines, permet d'augmenter la synthèse de collagène *in vitro*. Des acides aminés tels que l'arginine et la glutamine sont connus pour améliorer le dépôt de collagène mais sont déjà présents dans les milieux de culture (239). L'utilisation de compléments serait à envisager pour améliorer la production de collagène. Par exemple, l'ajout de TGF- β 1 ou de TGF- β 3 permet la formation d'un tissu fibreux lorsqu'il est ajouté à une culture de fibroblastes dermiques humains (240) (241). Certains groupes complètent le milieu de culture avec de l'insuline (242), du sulfate de cuivre (243) et des facteurs de croissance tels que du FGF, de l'EGF et du PDGF-BB afin d'améliorer la synthèse et la réticulation du collagène *in vitro* (113) (124). Néanmoins, ces facteurs sont très coûteux et peuvent augmenter jusqu'à 150% (pour l'utilisation de TGF- β 1 par exemple) le coût par rapport au coût de production sans facteur. Ces groupes cultivent également les fibroblastes en condition pulsatile ce qui augmente la synthèse de collagène. Néanmoins, cette condition requiert l'utilisation de bioréacteurs coûteux et difficiles à contrôler.

Concernant l'amélioration des conditions de culture des fibroblastes, une des possibilités repose sur la culture de cellules sur un motif permettant leur alignement dans une seule direction. Cette stratégie permettrait d'obtenir un tissu complètement anisotropique et obtenir des fils de CAM ayant toutes les fibres de collagène longitudinales et ainsi augmenter leur résistance. Une étude de 2017 a réalisé cette procédure en utilisant un élastomère thermoplastique mis en relief par photolithographie (149). La matrice extracellulaire obtenue était anisotropique et possédait des propriétés mécaniques plus fortes dans cette direction par rapport à une matrice non alignée.

L'augmentation de la production de collagène et des propriétés mécaniques ne sont pas la seule préoccupation en ingénierie tissulaire vasculaire. En effet, l'augmentation de la production d'élastine est aussi un enjeu important pour améliorer les propriétés élastiques de la matrice, même si nous avons réussi à identifier sa présence au sein de la CAM. Ce résultat est intéressant puisque, *in vivo*, la majorité de la synthèse de l'élastine a lieu au stade fœtal et dans les étapes précoces après la naissance (249). La production d'élastine est donc difficile *in vitro* (250). Une des stratégies pour répondre à ce problème consisterait à tester différents sérums et différentes concentrations pour la culture des fibroblastes et choisir celui qui entraîne la meilleure production d'élastine. L'utilisation d'une source de fibroblastes provenant d'un patient très jeune, comme le prépuce, pourrait également améliorer la production d'élastine (251). De plus, le rétinol est une forme de la vitamine A et a été utilisé pour l'induction de la synthèse de fibres élastiques dans la peau (252). Un marquage supplémentaire Verhoeff aurait été nécessaire afin de mettre en évidence la localisation de cette protéine.

La variabilité des fibroblastes est également un des inconvénients de l'utilisation de ce type cellulaire. En effet, cette population cellulaire peut avoir un comportement différent selon le passage utilisé, l'état de santé et l'âge du donneur, la localisation de prélèvement, *etc.* (196) (245) (246). Ces caractéristiques peuvent poser problème pour la reproductibilité des tissus en terme de composition, d'organisation et de propriétés mécaniques. C'est pourquoi, une étude supplémentaire consisterait à analyser, par spectrométrie de masse, la composition en protéines de la MEC de CAM issues de différents patients. Cette étude permettrait d'établir le profil moléculaire de chaque patient et de voir s'il y a une corrélation entre les protéines produites, les caractéristiques des donneurs et les propriétés des tissus. L'équipe de Niklason utilise un *pool* de cellules issues de plusieurs donneurs pour produire ses greffons vasculaires à base de CAM (113). Cette stratégie permet de composer avec la variabilité inter-individus mais peut poser des problèmes du point de vue des autorités régulatrices.

Par ailleurs, la fabrication de la CAM, même sans avoir recours à des bioréacteurs, est une technique coûteuse puisqu'elle demande un changement de milieu 3 fois par semaine sur une longue période. Pour répondre à ce problème, une alternative est actuellement développée au laboratoire et consiste à utiliser la membrane amniotique comme feuillet de matrice extracellulaire. En effet, cette membrane naturelle et riche en protéines de la MEC (majoritairement du collagène I) est un déchet opératoire, disponible gratuitement et en grande quantité. De plus, elle possède des propriétés anti-inflammatoires, elle est peu immunogène et montre des propriétés mécaniques similaires à la CAM. Elle est déjà largement utilisée en ingénierie tissulaire et comme produit médical (244). Néanmoins, l'une des limites à l'utilisation de ce tissu est la variabilité intra-membranaire et inter-membranaire.

D'autre part, concernant l'utilisation de fils de CAM, nous avons déjà montré que l'ensemencement de cellules sur ces fils était possible mais il serait important de poursuivre cette analyse. Une étude supplémentaire à apporter à cette thèse serait l'évaluation du comportement de plusieurs types de cellules sur les fils de CAM en comparaison avec leur comportement sur du plastique. Des meilleurs taux de prolifération et de migration sur les fils, par rapport à la culture sur plastique, constitueraient la preuve de la biocompatibilité de la CAM, qui constitue un environnement propice pour le développement des cellules.

D'ailleurs, une étude supplémentaire à développer serait l'analyse microscopique de la taille des pores par microscopie électronique à balayage. Après ensemencement de cellules, cette technique permettrait d'évaluer l'infiltration cellulaire et la taille adéquate des pores. En effet, si un échafaudage est trop dense, sa structure non poreuse empêchera la colonisation cellulaire au sein du matériau (253).

La taille des pores n'est pas le seul paramètre important dans la construction d'un substitut issu de l'ingénierie tissulaire. Pour le développement d'un greffon vasculaire par exemple, des tests supplémentaires devraient être effectués. Malgré la composition entièrement biologique de la CAM, des analyses d'hémocompatibilité seraient intéressantes. En effet, le collagène est très thrombogène lorsqu'il est en contact direct avec le sang (254). Ainsi, l'évaluation de l'agrégation plaquettaire au contact de la CAM et l'activation du complément seraient des informations importantes à obtenir. La norme internationale NF EN ISO 10993 - partie 4 (évaluation biologique des dispositifs médicaux - sélection des tests d'interactions avec le sang) aborde 5 paramètres: hématologie, thrombose, coagulation, plaquettes et système du complément. Les normes américaines ASTM F2888-13 et ASTM F 756-00 sont également utilisées pour l'évaluation de la formation de thrombus et de l'hémolyse, respectivement. Par ailleurs, pour améliorer l'hémocompatibilité du substitut vasculaire tissé, plusieurs techniques pourraient être développées : un revêtement anti-plaquettes pourrait être déposé sur la surface luminale du substitut ou l'ensemencement préalable de cellules endothéliales pourrait être réalisé *in vitro*. Cette dernière technique est longue, coûteuse et fastidieuse car elle nécessite l'extraction de cellules endothéliales autologues. La meilleure solution consisterait à recruter les cellules endothéliales *in vivo* via le domaine RGD par exemple au niveau de la lumière du greffon (255).

Par ailleurs, d'autres tests mécaniques pourraient être réalisés afin de caractériser plus précisément la résistance du substitut vasculaire tissé. En effet, nous avons réalisé les tests les plus importants mais il existe des tests complémentaires tels que le test de traction longitudinal, le test de traction circonférentiel ou le test de fatigue. Ces tests sont basés sur la norme standard ISO 7198:1998.

D'autre part, un paramètre important à améliorer quant à la fabrication du greffon vasculaire est la finition de la structure tissée. En effet, les extrémités d'un greffon vasculaire sont un enjeu car ils seront déterminants pour la suturabilité. Les greffons synthétiques utilisés pour la plupart des pontages vasculaires, par exemple, sont biseautés afin d'adoucir l'effet d'angle à l'anastomose pour minimiser les perturbations de flux sanguin (205). Ainsi, il faudrait envisager une finition alternative permettant à la fois d'attacher les fils tous ensemble et d'obtenir des extrémités moins droites. Idéalement, il faudrait développer une façon de permettre au chirurgien de couper le greffon lui-même.

Un des problèmes rencontrés lors de cette thèse a été la technique de stérilisation aux rayons gamma. En effet, comme nous l'avons montré, ce traitement entraîne une diminution significative de la force du tissu et augmente la réaction inflammatoire observée au début de l'implantation. Les dommages causés par l'irradiation gamma sont critiques pour l'intégration *in vivo*. En effet, un tel traitement altère la conformation tridimensionnelle des protéines de la matrice, ayant pour effet leur dénaturation (256). C'est pourquoi, des solutions alternatives sont actuellement recherchées au laboratoire. Parmi elles, la stérilisation à l'oxyde d'éthylène, l'utilisation de CO₂ supercritique ou l'irradiation par faisceaux d'électrons peuvent être citées. Néanmoins, la stérilisation terminale n'est pas obligatoire puisque nous sommes capables de produire le tissu entièrement de manière stérile. Cette stratégie demanderait une installation coûteuse (chambre blanche de travail) et un protocole très complexe. La stérilisation terminale d'un produit simplifie énormément son contrôle de qualité et son acceptation au niveau des agences régulatrices.

Une des perspectives de ce projet repose sur l'implantation du greffon vasculaire tissé. Dans un premier temps, l'implantation sera réalisée dans un modèle de rat immunodéficient afin d'évaluer la réussite du greffon sous flux. En effet, le premier paramètre analysé sera la suturabilité du greffon. La perméabilité, la résistance à la thrombose et les propriétés mécaniques seront également déterminés grâce à ce modèle. Le rat immunodéficient a été choisi pour permettre l'implantation d'un greffon humain. Néanmoins, ce modèle n'est pas idéal. Les propriétés du vaisseau implanté seront totalement différentes de celles nécessaires pour l'implantation chez l'humain : diamètre, longueur, épaisseur de la paroi, etc. Par ailleurs, le remodelage et les forces hémodynamiques seront également biaisés. C'est pourquoi, en parallèle, un modèle allogénique est développé chez le gros animal au laboratoire. La culture de fibroblastes de peau de mouton a permis d'obtenir un feuillet de MEC aux propriétés mécaniques suffisantes pour le développement d'un greffon vasculaire par tissage.

Grâce à ce modèle, des propriétés plus similaires vont pouvoir être atteintes et la preuve de concept de l'utilisation de cellules allogéniques va être établie. Néanmoins, l'utilisation du modèle animal entrave l'étude de l'endothélialisation spontanée du greffon *in vivo*, car ce phénomène existe chez les animaux contrairement à ce qui est observé chez l'humain. Pour conclure, il n'existe pas de modèle idéal pour l'implantation de greffons humains car elle requiert une immunosuppression forte et souvent létale chez les gros animaux.

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

XIV. COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

1. Communications orales nationales

- **Tissue Engineering of Blood Vessels by Cell-Assembled Extracellular Matrix (CAM) Thread Weaving**
06/2016, Journée de la FR TecSan à Bordeaux
10/2016, 2nd Workshop on Regenerative Medicine à Bordeaux
- **Development of a Completely Biological, Tissue-Engineered Vascular Graft (TEVG), by Weaving Threads of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM)**
05/2018, Journée de la FR TecSan à Bordeaux
- **Development of a completely biological and human tissue-engineered vascular graft using a textile approach**
11/2018, 3rd Workshop on Regenerative Medicine à Bordeaux

2. Communications orales internationales

- **Characterization of a Cell-Assembled Matrix (CAM) in the Development of a Completely Biological Tissue-Engineered Vascular Graft**
06/2017, congrès international TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) à Davos
- **Next Generation of Tissue-Engineered Vascular Graft: Completely Biological TEVG by Weaving Yarns of Cell-Assembled extracellular Matrix**
09/2018, congrès international ISACB (International Society for Applied Cardiovascular Biology) à Bordeaux, 2^{ème} place de la compétition « flash presentation »

3. Publications

- Accepté : **Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process.** Laure Magnan, Gaëlle Labrunie, Sébastien Marais, Sylvie Rey, Nathalie Dusserre, Marc Bonneau, Sabrina Lacomme, Etienne Gontier et Nicolas L'Heureux. *Acta Biomaterialia*, 2018.
- En préparation : **Tissue-Engineered Yarn: a New Bio-Material for the Production of Entirely Human Textiles.** Laure Magnan, (en préparation). *Advanced Materials*.
- En préparation : ***In vivo* remodeling of yarns produced from human cell-assembled extracellular matrix (CAM).** Laure Magnan, (en préparation). *Biomaterials*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015 | European Heart Journal | Oxford Academic [Internet]. [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/eurheartj/article/36/40/2696/2293417>
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 26 janv 2016;133(4):447-54.
3. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res*. juill 2015;46(5):408-26.
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. mai 2011;473(7347):317-25.
5. Akin I, Nienaber CA. Treatment of coronary in-stent restenosis—evidence for universal recommendation? *J Thorac Dis*. 2015;7(10):4.
6. Medalion B, Mohr R, Ben-Gal Y, Neshet N, Kramer A, Eliyahu S, et al. Arterial coronary artery bypass grafting is safe and effective in elderly patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. sept 2015;150(3):607-12.
7. Desai M, Seifalian AM, Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. août 2011;40(2):394-8.
8. Kirkton RD, Prichard HL, Santiago-Maysonet M, Niklason LE, Lawson JH, Dahl SLM. Susceptibility of ePTFE vascular grafts and bioengineered human acellular vessels to infection. *J Surg Res*. janv 2018;221:143-51.
9. Conte MS. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. janv 1998;12(1):43-5.
10. Hsia K, Yao C-L, Chen W-M, Chen J-H, Lee H, Lu J-H. Scaffolds and Cell-Based Tissue Engineering for Blood Vessel Therapy. *Cells Tissues Organs*. 2016;202(5-6):281-95.
11. Bachleda P, Kalinova L, Utikal P, Kolar M, Hricova K, Stosova T. Infected Prosthetic Dialysis Arteriovenous Grafts: A Single Dialysis Center Study. *Surg Infect*. déc 2012;13(6):366-70.
12. Pisoni RL, Arrington CJ, Albert JM, Ethier J, Kimata N, Krishnan M, et al. Facility Hemodialysis Vascular Access Use and Mortality in Countries Participating in DOPPS: An Instrumental Variable Analysis. *Am J Kidney Dis*. 1 mars 2009;53(3):475-91.
13. Silva C, Reis AH. Structure and adaptation of arteries to pulsatile flow: the case of the ascending aorta. *Med Phys*. juin 2014;41(6):063701.
14. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;8.

15. Patel A, Honoré E. Polycystins and renovascular mechanosensory transduction. *Nat Rev Nephrol.* sept 2010;6(9):530-8.
16. The Cardiovascular System: Blood Vessels : Anatomy & Physiology [Internet]. [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: <http://anatomyandphysiology.com/cardiovascular-system-blood-vessels/>
17. Sandow SL, Gzik DJ, Lee RMKW. Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function? *J Anat.* févr 2009;214(2):258-66.
18. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1385-400.
19. Masuoka T, Hayashi N, Hori E, Kuwayama N, Ohtani O, Endo S. Distribution of Internal Elastic Lamina and External Elastic Lamina in the Internal Carotid Artery: Possible Relationship With Atherosclerosis. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2010;50(3):179-82.
20. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, et al. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2013;75(1):23-47.
21. Sorrell JM, Caplan AI. Chapter 4 Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2009 [cité 9 juill 2018]. p. 161-214. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644809760046>
22. Paszkowiak JJ, Dardik A. Arterial Wall Shear Stress: Observations from the Bench to the Bedside. *Vasc Endovascular Surg.* janv 2003;37(1):47-57.
23. Amaya R, Pierides A, Tarbell JM. The Interaction between Fluid Wall Shear Stress and Solid Circumferential Strain Affects Endothelial Gene Expression. *West J, éditeur. PLOS ONE.* 6 juill 2015;10(7):e0129952.
24. Kliche K, Jeggle P, Pavenstädt H, Oberleithner H. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* août 2011;462(2):209-17.
25. Ezzati M, Obermeyer Z, Tzoulaki I, Mayosi BM, Elliott P, Leon DA. Contributions of risk factors and medical care to cardiovascular mortality trends. *Nat Rev Cardiol.* sept 2015;12(9):508-30.
26. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015. *Eur Heart J.* 21 oct 2015;36(40):2696-705.
27. Matsuo Y, Takumi T, Mathew V, Chung W-Y, Barsness GW, Rihal CS, et al. Plaque characteristics and arterial remodeling in coronary and peripheral arterial systems. *Atherosclerosis.* août 2012;223(2):365-71.
28. Kalz J, ten Cate H, Spronk HMH. Thrombin generation and atherosclerosis. *J Thromb Thrombolysis.* janv 2014;37(1):45-55.
29. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* mars 2011;12(3):204-12.
30. Mylonaki I, Allain E, Strano F, Allémann E, Corpataux J-M, Meda P, et al. Evaluating intimal hyperplasia under clinical conditions. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 1 sept 2018;27(3):427-36.

31. Mills B, Robb T, Larson DF. Intimal hyperplasia: slow but deadly. *Perfusion*. nov 2012;27(6):520-8.
32. Kijani S, Vázquez AM, Levin M, Borén J, Fogelstrand P. Intimal hyperplasia induced by vascular intervention causes lipoprotein retention and accelerated atherosclerosis. *Physiol Rep*. juill 2017;5(14):e13334.
33. Balaz P, Björck M. True aneurysm in autologous hemodialysis fistulae: definitions, classification and indications for treatment. *J Vasc Access*. déc 2015;16(6):446-53.
34. Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies. *Heart*. 1 oct 2014;100(19):1498-505.
35. Starke R, Chalouhi N, Ali M, Jabbour P, Tjoumakaris S, Gonzalez L, et al. The Role of Oxidative Stress in Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Curr Neurovasc Res*. 1 juin 2013;10(3):247-55.
36. Holzer T, Deglise S, Ballabeni P, Corpataux J-M, Saucy F. Who Should Be Operated When Presenting with a Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm? A Monocentric Study in a Tertiary Hospital. *Ann Vasc Surg*. 1 mai 2018;49:158-63.
37. Lu H, Rateri DL, Bruemmer D, Cassis LA, Daugherty A. Novel Mechanisms of Abdominal Aortic Aneurysms. *Curr Atheroscler Rep*. oct 2012;14(5):402-12.
38. Nienaber CA, Clough RE, Sakalihasan N, Suzuki T, Gibbs R, Mussa F, et al. Aortic dissection. *Nat Rev Dis Primer*. 21 juill 2016;2:16053.
39. Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection. *Lancet Lond Engl*. 28 févr 2015;385(9970):800-11.
40. Jankowski P, Czarnecka D, Wolfshaut-Wolak R, Łysek R, Łukaszewska A, Bogacki P, et al. Secondary prevention of coronary artery disease in contemporary clinical practice. *Cardiol J*. 2015;22(2):219-26.
41. Leung TW, Wabnitz AM, Miao Z, Chimowitz MI. Angioplasty and Stenting. *Intracranial Atheroscler Pathophysiol Diagn Treat*. 2016;40:152-63.
42. Maurel B, Chai F, Maton M, Blanchemain N, Haulon S. In stent restenosis and thrombosis assessment after EP224283 injection in a rat model. *Atherosclerosis*. 1 août 2013;229(2):462-8.
43. Vermet G, Degoutin S, Chai F, Maton M, Flores C, Neut C, et al. Cyclodextrin modified PLLA parietal reinforcement implant with prolonged antibacterial activity. *Acta Biomater*. avr 2017;53:222-32.
44. Acarturk G, Albayrak R, Melek M, Yuksel S, Uslan I, Atli H, et al. The relationship between arteriovenous fistula blood flow rate and pulmonary artery pressure in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2008;40(2):509-13.
45. Santoro D, Benedetto F, Mondello P, Spinelli F, Ricciardi C, Cernaro V, et al. Vascular access for hemodialysis: current perspectives. *Int J Nephrol Renov Dis*. juill 2014;281.
46. Lew SQ, Nguyen B-N, Ing TS. Hemodialysis Vascular access Construction in the Upper Extremity: A Review: *J Vasc Access* [Internet]. 9 avr 2014 [cité 28 sept 2018]; Disponible sur: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.5301/jva.5000299>

47. Stone PA, Mousa AY, Campbell JE, AbuRahma AF. Dialysis Access. *Ann Vasc Surg.* 1 juill 2012;26(5):747-53.
48. Hemodialysis Fistulas [Internet]. Clinical Gate. 2015 [cité 12 juill 2018]. Disponible sur: <https://clinicalgate.com/hemodialysis-fistulas/>
49. Reddan D. National Profile of Practice Patterns for Hemodialysis Vascular Access in the United States. *J Am Soc Nephrol.* 1 août 2002;13(8):2117-24.
50. Leriche R, Kunlin J. [Not Available]. *Lyon Chir.* févr 1949;44(1):13.
51. Harskamp RE, Lopes RD, Baisden CE, de Winter RJ, Alexander JH. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann Surg.* mai 2013;257(5):824-33.
52. Kaczynski J, Gibbons CP. Experience with Femoral Vein Grafts for Infra-inguinal Bypass. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* mai 2011;41(5):676-8.
53. Baikoussis NG, Papakonstantinou NA, Apostolakis E. Radial artery as graft for coronary artery bypass surgery: Advantages and disadvantages for its usage focused on structural and biological characteristics. *J Cardiol.* mai 2014;63(5):321-8.
54. Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, et al. Substituts vasculaires. *Ann Chir.* juin 2004;129(5):301-9.
55. Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Taylor PC, Goormastic M, Peper W, et al. Fifteen hundred coronary reoperations. Results and determinants of early and late survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* juin 1987;93(6):847-59.
56. Seki T, Kitamura S, Kawachi K, Morita R, Kawata T, Mizuguchi K, et al. A quantitative study of postoperative luminal narrowing of the internal thoracic artery graft in coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* déc 1992;104(6):1532-8.
57. Fahner PJ, Idu MM, van Gulik TM, Legemate DA. Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *J Vasc Surg.* sept 2006;44(3):518-24.
58. Lin C-H, Hsia K, Ma H, Lee H, Lu J-H, Lin C-H, et al. In Vivo Performance of Decellularized Vascular Grafts: A Review Article. *Int J Mol Sci.* 19 juill 2018;19(7):2101.
59. Wilson CH, Stansby G, Haswell M, Cunningham AC, Talbot D. Evaluation of eight preservation solutions for endothelial in situ preservation. *Transplantation.* 15 oct 2004;78(7):1008-13.
60. Faggioli GL, Gargiulo M, Giardino R, Pasquinelli G, Preda P, Fini M, et al. Long-term cryopreservation of autologous veins in rabbits. *Cardiovasc Surg Lond Engl.* avr 1994;2(2):259-65.
61. Raithel D, Schweiger H, Gentsch HH. Late results with Dardik-biograft in peripheral arterial surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino).* juin 1984;25(3):222-4.
62. Dardik H, Wengerter K, Qin F, Pangilinan A, Silvestri F, Wolodiger F, et al. Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization: An analysis of 1275 cases. *J Vasc Surg.* janv 2002;35(1):64-71.

63. Rosenberg DM, Glass BA, Rosenberg N, Lewis MR, Dale WA. Experiences with modified bovine carotid arteries in arterial surgery. *Surgery*. déc 1970;68(6):1064-73.
64. Lindsey P, Echeverria A, Cheung M, Kfoury E, Bechara CF, Lin PH. Lower Extremity Bypass Using Bovine Carotid Artery Graft (Artegraft): An Analysis of 124 Cases with Long-Term Results. *World J Surg*. 2018;42(1):295-301.
65. Katzman HE, Glickman MH, Schild AF, Fujitani RM, Lawson JH. Multicenter Evaluation of the Bovine Mesenteric Vein Bioprostheses for Hemodialysis Access in Patients with an Earlier Failed Prosthetic Graft. *J Am Coll Surg*. 1 août 2005;201(2):223-30.
66. Martin B-J, Kaestner M, Peng M, Ross DB, Urschel S, West LJ, et al. Glutaraldehyde Treatment of Allografts and Aortic Outcomes Post-Norwood: Challenging Surgical Decision. *Ann Thorac Surg*. 1 oct 2017;104(4):1395-401.
67. Naso F, Gandaglia A, Bottio T, Tarzia V, Nottle MB, d'Apice AJF, et al. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. *Xenotransplantation*. 1 juill 2013;20(4):252-61.
68. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. avr 2011;32(12):3233-43.
69. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong D-S, Chen C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*. 1 avr 2002;24(3):173-83.
70. Quint C, Arief M, Muto A, Dardik A, Niklason LE. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *J Vasc Surg*. mars 2012;55(3):790-8.
71. Field PL. The chemically treated bovine ureter—clinical performance of a novel biological vascular prosthesis. *Cardiovasc Surg*. 1 févr 2003;11(1):30-4.
72. CHLUPÁ J, FILOVÁ E. Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. 2009;58:21.
73. Shemesh D, Goldin I, Hijazi J, Zaghal I, Berelowitz D, Verstandig A, et al. A prospective randomized study of heparin-bonded graft (Propaten) versus standard graft in prosthetic arteriovenous access. *J Vasc Surg*. juill 2015;62(1):115-22.
74. Singh C, Wong C, Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J Funct Biomater*. 30 juin 2015;6(3):500-25.
75. Quiñones-Baldrich WJ, Moore WS, Ziomek S, Chvapil M. Development of a “leak-proof,” knitted Dacron vascular prosthesis. *J Vasc Surg*. juin 1986;3(6):895-903.
76. Bolia A, Miles KA, Brennan J, Bell PR. Percutaneous transluminal angioplasty of occlusions of the femoral and popliteal arteries by subintimal dissection. *Cardiovasc Intervent Radiol*. déc 1990;13(6):357-63.
77. Ouriel K. Peripheral arterial disease. *The Lancet*. 13 oct 2001;358(9289):1257-64.
78. Sandford RM, Bown MJ, Sayers RD, London JN, Naylor AR, McCarthy MJ. Is Infrainguinal Bypass Grafting Successful Following Failed Angioplasty? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. juill 2007;34(1):29-34.

79. Brewster DC. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease. *J Vasc Surg.* févr 1997;25(2):365-79.
80. Roddy SP, Darling III RC, Ozsvath KJ, Mehta M, Chang BB, Paty PSK, et al. Choice of material for internal carotid artery bypass grafting: vein or prosthetic? Analysis of 44 procedures. *Cardiovasc Surg.* 1 déc 2002;10(6):540-4.
81. Chard RB, Johnson DC, Nunn GR, Cartmill TB. Aorta-coronary bypass grafting with polytetrafluoroethylene conduits. Early and late outcome in eight patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* juill 1987;94(1):132-4.
82. Hadinata IE, Hayward PAR, Hare DL, Matalanis GS, Seevanayagam S, Rosalion A, et al. Choice of Conduit for the Right Coronary System: 8-Year Analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes Trial. *Ann Thorac Surg.* nov 2009;88(5):1404-9.
83. Hehrlein FW, Schlepper M, Loskot F, Scheld HH, Walter P, Mulch J. The use of expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts for myocardial revascularization. *J Cardiovasc Surg (Torino).* déc 1984;25(6):549-53.
84. Solaković E, Totić D, Solaković S. Femoro-popliteal bypass above knee with saphenous vein vs synthetic graft. *Bosn J Basic Med Sci.* nov 2008;8(4):367-72.
85. Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg.* févr 2009;49(2):352-62.
86. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J, et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev.* 7 août 2015;44(15):5680-742.
87. Thébaud NB, Bareille R, Daculsi R, Bourget C, Rémy M, Kerdjoudj H, et al. Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor-derived endothelial cells to remain functional under shear stress in vitro. *Acta Biomater.* avr 2010;6(4):1437-45.
88. Paternotte E, Kerdjoudj H, Kokten T, Stoltz J-F, Kearney-Schwartz A, Voegel J-C, et al. Endothelialized and preconditioned natural umbilical arteries with long term patency open the route for future human uses. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1 janv 2013;54(3):223-34.
89. Berger K, Wood SJ. Healing of Arterial Prostheses in Man: Its Incompleteness. *175(1):10.*
90. Keough EM, Callow AD, Connolly RJ, Weinberg KS, Aalberg JJ, O'Donnell TF. Healing pattern of small caliber dacron grafts in the baboon: an animal model for the study of vascular prostheses. *J Biomed Mater Res.* mars 1984;18(3):281-92.
91. Liu RH, Ong CS, Fukunishi T, Ong K, Hibino N. Review of Vascular Graft Studies in Large Animal Models. *Tissue Eng Part B Rev.* avr 2018;24(2):133-43.
92. Menu P, Stoltz JF, Kerdjoudj H. Progress in vascular graft substitute. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53(1-2):117-29.
93. Brat R, Horacek J, Sieja J. Endoscopic vs open saphenous vein harvest for coronary artery bypass grafting: A leg-related morbidity and histological comparison. *Biomed Pap.* 1 mars 2013;157(1):70-4.

94. Hashmi SF, Krishnamoorthy B, Critchley WR, Walker P, Bishop PW, Venkateswaran RV, et al. Histological and immunohistochemical evaluation of human saphenous vein harvested by endoscopic and open conventional methods. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. févr 2015;20(2):178-85.
95. Simard T, Jung RG, Motazedian P, Di Santo P, Ramirez FD, Russo JJ, et al. Progenitor Cells for Arterial Repair: Incremental Advancements towards Therapeutic Reality [Internet]. *Stem Cells International*. 2017 [cité 9 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/8270498/>
96. Lawson JH, Glickman MH, Ilzecki M, Jakimowicz T, Jaroszynski A, Peden EK, et al. Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials. *Lancet Lond Engl*. 14 mai 2016;387(10032):2026-34.
97. Ziegler KR, Muto A, Eghbalieh SDD, Dardik A. Basic Data Related to Surgical Infrainguinal Revascularization Procedures: A Twenty Year Update. *Ann Vasc Surg*. avr 2011;25(3):413-22.
98. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 14 mai 1993;260(5110):920-6.
99. Simon-Yarza T, Bataille I, Letourneur D. Cardiovascular Bio-Engineering: Current State of the Art. *J Cardiovasc Transl Res*. avr 2017;10(2):180-93.
100. Carrabba M, Madeddu P. Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 17 avr 2018 [cité 13 juill 2018];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00041/full>
101. Hoerstrup SP, Mracs IC, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S, et al. Functional Growth in Tissue-Engineered Living, Vascular Grafts: Follow-Up at 100 Weeks in a Large Animal Model. *Circulation*. 4 juill 2006;114(1 suppl):I-159-I-166.
102. Cummings I, George S, Kelm J, Schmidt D, Emmert MY, Weber B, et al. Tissue-engineered vascular graft remodeling in a growing lamb model: expression of matrix metalloproteinases. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. mai 2011 [cité 18 juill 2018]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/ejcts/article-lookup/doi/10.1016/j.ejcts.2011.02.077>
103. In Jeong S, Kim SY, Cho SK, Chong MS, Kim KS, Kim H, et al. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials*. févr 2007;28(6):1115-22.
104. Yokota T, Ichikawa H, Matsumiya G, Kuratani T, Sakaguchi T, Iwai S, et al. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *J Thorac Cardiovasc Surg*. oct 2008;136(4):900-7.
105. Nieponice A, Soletti L, Guan J, Hong Y, Gharaibeh B, Maul TM, et al. *In Vivo* Assessment of a Tissue-Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Elastomeric Scaffold and Muscle-Derived Stem Cells in a Rat Model. *Tissue Eng Part A*. avr 2010;16(4):1215-23.
106. Wu W, Allen RA, Wang Y. Fast-degrading elastomer enables rapid remodeling of a cell-free synthetic graft into a neoartery. *Nat Med*. juill 2012;18(7):1148-53.
107. Chan AHP, Tan RP, Michael PL, Lee BSL, Vanags LZ, Ng MKC, et al. Evaluation of synthetic vascular grafts in a mouse carotid grafting model. *Jour d'heuil D, éditeur. PLOS ONE*. 29 mars 2017;12(3):e0174773.

108. Ong CS, Fukunishi T, Liu RH, Nelson K, Zhang H, Wieczorek E, et al. Bilateral Arteriovenous Shunts as a Method for Evaluating Tissue-Engineered Vascular Grafts in Large Animal Models. *Tissue Eng Part C Methods*. 25 juill 2017;23(11):728-35.
109. Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M, Konuma T, et al. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. juin 2005;129(6):1330-8.
110. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y, Breuer C, et al. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. févr 2010;139(2):431-436.e2.
111. E. Niklason L, S. Langer R. Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol*. déc 1997;5(4):303-6.
112. Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, et al. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J Vasc Surg*. mars 2001;33(3):628-38.
113. Dahl SLM, Kypson AP, Lawson JH, Blum JL, Strader JT, Li Y, et al. Readily Available Tissue-Engineered Vascular Grafts. *Sci Transl Med*. 2 févr 2011;3(68):68ra9-68ra9.
114. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986;231(4736):397-400.
115. Li X, Xu J, Nicolescu CT, Marinelli JT, Tien J. Generation, Endothelialization, and Microsurgical Suture Anastomosis of Strong 1-mm-Diameter Collagen Tubes. *Tissue Eng Part A*. avr 2017;23(7-8):335-44.
116. Marelli B, Alessandrino A, Farè S, Freddi G, Mantovani D, Tanzi MC. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting. *Acta Biomater*. oct 2010;6(10):4019-26.
117. Marcolin C, Draghi L, Tanzi M, Faré S. Electrospun silk fibroin–gelatin composite tubular matrices as scaffolds for small diameter blood vessel regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 1 mai 2017;28(5):80.
118. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg*. janv 2010;51(1):155-64.
119. Lovett M, Eng G, Kluge J, Cannizzaro C, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts. *Organogenesis*. oct 2010;6(4):217-24.
120. Elsayed Y, Lekakou C, Labeed F, Tomlins P. Fabrication and characterisation of biomimetic, electrospun gelatin fibre scaffolds for tunica media-equivalent, tissue engineered vascular grafts. *Mater Sci Eng C*. avr 2016;61:473-83.
121. Aussel A, Montembault A, Malaise S, Foulc MP, Faure W, Cornet S, et al. In Vitro Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development. *J Cardiovasc Transl Res*. déc 2017;10(5-6):480-8.
122. Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Brizzi V, Delmond S, Bareille R, et al. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed Mater*. 3 oct 2017;12(6):065003.

123. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J Biomed Mater Res.* 15 juin 2002;60(4):607-12.
124. Syedain ZH, Meier LA, Lahti MT, Johnson SL, Tranquillo RT. Implantation of Completely Biological Engineered Grafts Following Decellularization into the Sheep Femoral Artery. *Tissue Eng Part A.* juin 2014;20(11-12):1726-34.
125. Syedain Z, Reimer J, Lahti M, Berry J, Johnson S, Tranquillo RT. Tissue engineering of acellular vascular grafts capable of somatic growth in young lambs. *Nat Commun.* 27 sept 2016;7:12951.
126. Syedain ZH, Graham ML, Dunn TB, O'Brien T, Johnson SL, Schumacher RJ, et al. A completely biological "off-the-shelf" arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Sci Transl Med.* 1 nov 2017;9(414):eaan4209.
127. Haghjooy Javanmard S, Anari J, Zargar Kharazi A, Vatankhah E. In vitro hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers
In vitro hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers. *J Biomater Appl.* 1 sept 2016;31(3):438-49.
128. Bertram U, Steiner D, Poppitz B, Dippold D, Köhn K, Beier JP, et al. Vascular Tissue Engineering: Effects of Integrating Collagen into a PCL Based Nanofiber Material. *BioMed Res Int.* 2017;2017:9616939.
129. Jiang Y-C, Jiang L, Huang A, Wang X-F, Li Q, Turng L-S. Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell-matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds. *Mater Sci Eng C.* févr 2017;71:901-8.
130. Wise SG, Byrom MJ, Waterhouse A, Bannon PG, Ng MKC, Weiss AS. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater.* janv 2011;7(1):295-303.
131. Zhang Y, Li XS, Guex AG, Liu SS, Müller E, Malini RI, et al. A compliant and biomimetic three-layered vascular graft for small blood vessels. *Biofabrication.* 2017;9(2):025010.
132. Zhao J, Qiu H, Chen D, Zhang W, Zhang D, Li M. Development of nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* mai 2013;56:106-13.
133. Ju YM, Ahn H, Arenas-Herrera J, Kim C, Abolbashari M, Atala A, et al. Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study. *Acta Biomater.* sept 2017;59:58-67.
134. Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, Tanios F, Schnoering H, Deichmann T, et al. Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials.* juin 2010;31(17):4731-9.
135. Fukunishi T, Best CA, Sugiura T, Shoji T, Yi T, Udelsman B, et al. Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model. Forsythe JS, éditeur. *PLOS ONE.* 28 juill 2016;11(7):e0158555.

136. Tillman BW, Yazdani SK, Neff LP, Corriere MA, Christ GJ, Soker S, et al. Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. *J Vasc Surg.* sept 2012;56(3):783-93.
137. Olausson M, Patil PB, Kuna VK, Chougule P, Hernandez N, Methe K, et al. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *The Lancet.* 21 juill 2012;380(9838):230-7.
138. Peng H, Schlaich EM, Row S, Andreadis ST, Swartz DD. A Novel Ovine ex vivo Arteriovenous Shunt Model to Test Vascular Implantability. *Cells Tissues Organs.* 2012;195(1-2):108-21.
139. Amensag S, Goldberg LA, O'Malley KA, Rush DS, Berceci SA, McFetridge PS. Pilot assessment of a human extracellular matrix-based vascular graft in a rabbit model. *J Vasc Surg.* 1 mars 2017;65(3):839-847.e1.
140. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev [Internet].* 8 oct 2015 [cité 16 févr 2018]; Disponible sur: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2015.0100>
141. L'heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 1998;12(1):47–56.
142. L'Heureux N, Dusserre N, König G, Victor B, Keire P, Wight TN, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med.* mars 2006;12(3):361-5.
143. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet Lond Engl.* 25 avr 2009;373(9673):1440-6.
144. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. Case Study: First Implantation of a Frozen, Devitalized Tissue-engineered Vascular Graft for Urgent Hemodialysis Access. *J Vasc Access.* janv 2011;12(1):67-70.
145. Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg.* nov 2014;60(5):1353-7.
146. Zhao J, Liu L, Wei J, Ma D, Geng W, Yan X, et al. A Novel Strategy to Engineer Small-Diameter Vascular Grafts From Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Artif Organs.* 36(1):93-101.
147. Vallières K, Laterreur V, Tondreau MY, Ruel J, Germain L, Fradette J, et al. Human adipose-derived stromal cells for the production of completely autologous self-assembled tissue-engineered vascular substitutes. *Acta Biomater.* sept 2015;24:209-19.
148. König G, McAllister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials.* mars 2009;30(8):1542-50.
149. Bourget J-M, Laterreur V, Gauvin R, Guillemette MD, Miville-Godin C, Mounier M, et al. Microstructured human fibroblast-derived extracellular matrix scaffold for vascular media fabrication. *J Tissue Eng Regen Med.* 1 sept 2017;11(9):2479-89.

150. Kelm JM, Lorber V, Snedeker JG, Schmidt D, Broggini-Tenzer A, Weisstanner M, et al. A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: Self-assembly of microtissue building blocks. *J Biotechnol.* 1 juill 2010;148(1):46-55.
151. Norotte C, Marga F, Niklason L, Forgacs G. Scaffold-Free Vascular Tissue Engineering Using Bioprinting. *Biomaterials.* oct 2009;30(30):5910-7.
152. Geelhoed WJ, Moroni L, Rotmans JI. Utilizing the Foreign Body Response to Grow Tissue Engineered Blood Vessels in Vivo. *J Cardiovasc Transl Res.* avr 2017;10(2):167-79.
153. Eiken O. Autogenous connective tissue tubes for replacement of small artery defects. A preliminary report of an experimental study in dogs. *Acta Chir Scand.* 8 nov 1960;120:47-50.
154. Schilling JA, Shurley HM, Joel W, Richter KM, White BN. Fibrocollagenous tubes structured in vivo. Morphology and biological characteristics. *Arch Pathol.* mai 1961;71:548-53.
155. Sparks CH. Silicone Mandril Method for Growing Reinforced Autogenous Femoro-Popliteal Artery Grafts in Situ: *Ann Surg.* mars 1973;177(3):293-300.
156. Sparks CH. Autogenous grafts made to order. *Ann Thorac Surg.* août 1969;8(2):104-13.
157. Verhagen HJM, Heijnen-Snyder GJ, Pronk A, Vroom TM, Vroonhoven TJMVV, Eikelboom BC, et al. Thrombomodulin activity on mesothelial cells: perspectives for mesothelial cells as an alternative for endothelial cells for cell seeding on vascular grafts. *Br J Haematol.* 95(3):542-9.
158. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity. *Circ Res.* 3 déc 1999;85(12):1173-8.
159. Chue W-L, Campbell GR, Caplice N, Muhammed A, Berry CL, Thomas AC, et al. Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *J Vasc Surg.* avr 2004;39(4):859-67.
160. Tsukagoshi T, Yenidunya MO, Sasaki E, Suse T, Hosaka Y. Experimental vascular graft using small-caliber fascia-wrapped fibrocollagenous tube: short-term evaluation. *J Reconstr Microsurg.* févr 1999;15(2):127-31.
161. Watanabe T, Kanda K, Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. 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.* 98B(1):120-6.
162. Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, et al. Implantation study of small-caliber "biotube" vascular grafts in a rat model. *J Artif Organs.* mars 2013;16(1):59-65.
163. Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. 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.* mars 2016;19(1):54-61.
164. Damanik FFR, Rothuizen TC, van Blitterswijk C, Rotmans JI, Moroni L. Towards an in vitro model mimicking the foreign body response: tailoring the surface properties of biomaterials to modulate extracellular matrix. *Sci Rep [Internet].* mai 2015 [cité 20 juill 2018];4(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep06325>

165. Rothuizen TC, Damanik FFR, Lavrijsen T, Visser MJT, Hamming JF, Lalai RA, et al. Development and evaluation of in vivo tissue engineered blood vessels in a porcine model. *Biomaterials*. janv 2016;75:82-90.
166. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 15 déc 2010;123(24):4195-200.
167. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. févr 2016;97:4-27.
168. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* Maywood NJ. oct 2007;232(9):1121-9.
169. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. janv 2011 [cité 1 févr 2018];3(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003457/>
170. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. In: *Advances in Protein Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2005 [cité 1 août 2018]. p. 437-61. (Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers; vol. 70). Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323305700139>
171. Yeo GC, Keeley FW, Weiss AS. Coacervation of tropoelastin. *Adv Colloid Interface Sci*. sept 2011;167(1-2):94-103.
172. Cheng JK, Wagenseil JE. Extracellular matrix and the mechanics of large artery development. *Biomech Model Mechanobiol*. nov 2012;11(8):1169-86.
173. Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA, et al. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supraaortic stenosis. *Hum Mol Genet*. juill 1997;6(7):1021-8.
174. Gandhi NS, Mancera RL. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des*. 1 déc 2008;72(6):455-82.
175. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *J Biol Chem*. 15 févr 2002;277(7):4593-6.
176. Kostourou V, Papalazarou V. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. août 2014;1840(8):2403-13.
177. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. mars 2007;11(2):176-205.
178. Xu J, Shi G-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. nov 2014;1842(11):2106-19.
179. Hynes RO, Naba A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 janv 2012;4(1):a004903.
180. Lee M-H, Atkinson S, Murphy G. Identification of the Extracellular Matrix (ECM) Binding Motifs of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-3 and Effective Transfer to TIMP-1. *J Biol Chem*. 2 mars 2007;282(9):6887-98.

181. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* sept 2012;40(3):766-82.
182. Abdullah M, Attia FN. Vitamin, C (Ascorbic Acid). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [cité 3 août 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499877/>
183. Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 28 nov 2003;55(12):1531-46.
184. Exposito J-Y, Valcourt U, Cluzel C, Lethias C. The Fibrillar Collagen Family. *Int J Mol Sci.* 28 janv 2010;11(2):407-26.
185. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther.* mars 1999;79(3):308-19.
186. Svensson RB, Mulder H, Kovanen V, Magnusson SP. Fracture Mechanics of Collagen Fibrils: Influence of Natural Cross-Links. *Biophys J.* juin 2013;104(11):2476-84.
187. Osidak MS, Osidak EO, Akhmanova MA, Domogatsky SP, Domogatskaya AS. Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Curr Pharm Des.* 2015;21(9):1124-33.
188. Holzapfel GA. Collagen in Arterial Walls: Biomechanical Aspects. In: Collagen [Internet]. Springer, Boston, MA; 2008 [cité 6 août 2018]. p. 285-324. Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-73906-9_11
189. Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol.* mars 2012;11(3-4):461-73.
190. Chow M-J, Turcotte R, Lin CP, Zhang Y. Arterial Extracellular Matrix: A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen. *Biophys J.* juin 2014;106(12):2684-92.
191. Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *J R Soc Interface.* 22 févr 2006;3(6):15-35.
192. Danpinid A, Luo J, Vappou J, Terdtoon P, Konofagou EE. In vivo characterization of the aortic wall stress-strain relationship. *Ultrasonics.* juin 2010;50(7):654-65.
193. Patel JJ, Srivastava S, Siow RCM. Isolation, Culture, and Characterization of Vascular Smooth Muscle Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1430:91-105.
194. Simper D, Mayr U, Urbich C, Zampetaki A, Prokopi M, Didangelos A, et al. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2010;30(7):1325-32.
195. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* juill 1995;130(2):393-405.
196. Costa-Almeida R, Soares R, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 1 janv 2018;12(1):240-51.

197. Williams IR. Fibroblasts. In: Delves PJ, éditeur. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Elsevier; 1998 [cité 7 août 2018]. p. 905-9. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656002486>
198. Gogusev J, Teutsch B, Morin MT, Mongiat F, Haguenu F, Suskind G, et al. Inhibition of HLA class I antigen and mRNA expression induced by Rous sarcoma virus in transformed human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci*. 1 janv 1988;85(1):203-7.
199. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care*. mars 2016;5(3):119-36.
200. Umetsu DT, Katzen D, Jabara HH, Geha RS. Antigen presentation by human dermal fibroblasts: activation of resting T lymphocytes. *J Immunol*. 1 janv 1986;136(2):440-5.
201. Haniffa MA, Wang X-N, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2007;179(3):1595-604.
202. Frangogiannis NG. Fibroblast—Extracellular Matrix Interactions in Tissue Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep*. mars 2016;4(1):11-8.
203. Hinek A, Kim HJ, Wang Y, Wang A, Mitts TF. Sodium l-ascorbate enhances elastic fibers deposition by fibroblasts from normal and pathologic human skin. *J Dermatol Sci*. 1 sept 2014;75(3):173-82.
204. Alhosseini Hamedani B, Navidbakhsh M, Ahmadi Tafti H. Comparison between mechanical properties of human saphenous vein and umbilical vein. *Biomed Eng OnLine*. 2012;11(1):59.
205. Fitts MK, Pike DB, Anderson K, Shiu Y-T. Hemodynamic Shear Stress and Endothelial Dysfunction in Hemodialysis Access. *Open Urol Nephrol J*. 30 mai 2014;7(1):33-44.
206. Broderick SP, Houston JG, Walsh MT. The influence of the instabilities in modelling arteriovenous junction haemodynamics. *J Biomech*. 15 oct 2015;48(13):3600-7.
207. Walden R, L'Italien GJ, Megerman J, Abbott WM. Matched elastic properties and successful arterial grafting. *Arch Surg Chic Ill 1960*. oct 1980;115(10):1166-9.
208. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review. *J Biomater Appl*. 1 janv 2001;15(3):241-78.
209. Ballyk PD, Walsh C, Butany J, Ojha M. Compliance mismatch may promote graft–artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech*. 19 déc 1997;31(3):229-37.
210. Sarkar S, Hillery C, Seifalian A, Hamilton G. Critical parameter of burst pressure measurement in development of bypass grafts is highly dependent on methodology used. *J Vasc Surg*. oct 2006;44(4):846-52.
211. Madhavan K, Elliott WH, Bonani W, Monnet E, Tan W. Mechanical and biocompatible characterizations of a readily available multilayer vascular graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. mai 2013;101B(4):506-19.

212. Wang Z, Cui Y, Wang J, Yang X, Wu Y, Wang K, et al. The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(ϵ -caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration. *Biomaterials*. juill 2014;35(22):5700-10.
213. Guidoin R, Gosselin C, Martin L, Marois M, Laroche F, King M, et al. Polyester prostheses as substitutes in the thoracic aorta of dogs. I. Evaluation of commercial prostheses. *J Biomed Mater Res*. nov 1983;17(6):1049-77.
214. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. FOREIGN BODY REACTION TO BIOMATERIALS. *Semin Immunol*. avr 2008;20(2):86-100.
215. Klopfleisch R, Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 105(3):927-40.
216. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The complement system and innate immunity. *Immunobiol Immune Syst Health Dis 5th Ed* [Internet]. 2001 [cité 15 août 2018]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
217. Sridharan R, Cameron AR, Kelly DJ, Kearney CJ, O'Brien FJ. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Mater Today*. juill 2015;18(6):313-25.
218. Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. mars 2009;30(8):1482-91.
219. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. juill 2014;41(1):14-20.
220. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. avr 2016;86:68-82.
221. Hortensius RA, Harley BA. Naturally derived biomaterials for addressing inflammation in tissue regeneration. *Exp Biol Med*. mai 2016;241(10):1015-24.
222. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 15 mai 2008;453(7193):314-21.
223. Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Ann Biomed Eng*. mars 2015;43(3):577-92.
224. Morris AH, Stamer DK, Kyriakides TR. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials. *Semin Immunol*. févr 2017;29:72-91.
225. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. févr 2012;33(6):1771-81.
226. Niklason LE. Functional Arteries Grown in Vitro. *Science*. 16 avr 1999;284(5413):489-93.
227. Tondreau MY, Laterreur V, Vallières K, Gauvin R, Bourget J-M, Tremblay C, et al. In Vivo Remodeling of Fibroblast-Derived Vascular Scaffolds Implanted for 6 Months in Rats [Internet]. *BioMed Research International*. 2016 [cité 21 août 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3762484/>

228. The use of tubes constructed from vinyon « N » cloth in bridging arterial defects. [Internet]. [cité 23 août 2018]. Disponible sur: <https://insights-ovid-com.gate2.inist.fr/pubmed?pmid=14903863>
229. Moutos FT, Freed LE, Guilak F. A biomimetic three-dimensional woven composite scaffold for functional tissue engineering of cartilage. *Nat Mater.* févr 2007;6(2):162-7.
230. Akbari M, Tamayol A, Laforte V, Annabi N, Najafabadi AH, Khademhosseini A, et al. Composite Living Fibers for Creating Tissue Constructs Using Textile Techniques. *Adv Funct Mater.* juill 2014;24(26):4060-7.
231. Moutos FT, Estes BT, Guilak F. Multifunctional Hybrid Three-dimensionally Woven Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Macromol Biosci.* 10 nov 2010;10(11):1355-64.
232. Najafabadi AH, Tamayol A, Annabi N, Ochoa M, Mostafalu P, Akbari M, et al. Biodegradable Nanofibrous Polymeric Substrates for Generating Elastic and Flexible Electronics. *Adv Mater.* 1 sept 2014;26(33):5823-30.
233. Akbari M, Tamayol A, Bagherifard S, Serex L, Mostafalu P, Faramarzi N, et al. Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving. *Adv Healthc Mater.* 1 avr 2016;5(7):751-66.
234. Chen Y, Ding X, Li Y, King MW, Gao J, Zhao X. A bilayer prototype woven vascular prosthesis with improved radial compliance. *J Text Inst.* 1 janv 2012;103(1):106-11.
235. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet.* 2009;373(9673):1440–1446.
236. Biondo-Simões M de LP, Oda MH, Pasqual S, Robes RR. Comparative study of polyglactin 910 and simple catgut in the formation of intraperitoneal adhesions. *Acta Cir Bras.* févr 2018;33(2):102-9.
237. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 20 août 2018;e1801651.
238. Germain L, Larouche D, Nedelec B, Perreault I, Duranceau L, Bortoluzzi P, et al. AUTOLOGOUS BILAYERED SELF-ASSEMBLED SKIN SUBSTITUTES (SASSs) AS PERMANENT GRAFTS: A CASE SERIES OF 14 SEVERELY BURNED PATIENTS INDICATING CLINICAL EFFECTIVENESS. :14.
239. Barbul A. Proline Precursors to Sustain Mammalian Collagen Synthesis. *J Nutr.* 1 oct 2008;138(10):2021S-2024S.
240. Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM. TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol.* janv 1997;170(1):69-80.
241. Murata H, Zhou L, Ochoa S, Hasan A, Badiavas E, Falanga V. TGF-β3 Stimulates and Regulates Collagen Synthesis Through TGF-β1-Dependent and Independent Mechanisms. *J Invest Dermatol.* mars 1997;108(3):258-62.

242. Musselmann K, Kane B, Alexandrou B, Hassell JR. Stimulation of Collagen Synthesis by Insulin and Proteoglycan Accumulation by Ascorbate in Bovine Keratocytes In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 déc 2006;47(12):5260-6.
243. Makris EA, MacBarb RF, Responde DJ, Hu JC, Athanasiou KA. A copper sulfate and hydroxylysine treatment regimen for enhancing collagen cross-linking and biomechanical properties in engineered neocartilage. *FASEB J.* 1 mars 2013;27(6):2421-30.
244. Jerman UD, Veranič P, Kreft ME. Amniotic Membrane Scaffolds Enable the Development of Tissue-Engineered Urothelium with Molecular and Ultrastructural Properties Comparable to that of Native Urothelium. *Tissue Eng Part C Methods.* 15 août 2013;20(4):317-27.
245. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn JH. Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* août 1996;39(8):1338-46.
246. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol.* nov 2015;94(11):483-512.
247. Wilkins LM, Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF, Parenteau NL. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol Bioeng.* 5 avr 1994;43(8):747-56.
248. Liu Y, Ren L, Wang Y. Crosslinked collagen–gelatin–hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C.* 1 janv 2013;33(1):196-201.
249. Coenen AMJ, Bernaerts KV, Harings JAW, Jockenhoevel S, Ghazanfari S. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. *Acta Biomater.* oct 2018;79:60-82.
250. Annabi N, Mithieux SM, Boughton EA, Ruys AJ, Weiss AS, Dehghani F. Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 1 sept 2009;30(27):4550-7.
251. Sephel GC, Davidson JM. Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age. *J Invest Dermatol.* mars 1986;86(3):279-85.
252. Rossetti D, Kielmanowicz MG, Vigodman S, Hu YP, Chen N, Nkengne A, et al. A novel anti-ageing mechanism for retinol: induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. *Int J Cosmet Sci.* févr 2011;33(1):62-9.
253. Wang K, Zhu M, Li T, Zheng W, Li L, Xu M, et al. Improvement of cell infiltration in electrospun polycaprolactone scaffolds for the construction of vascular grafts. *J Biomed Nanotechnol.* août 2014;10(8):1588-98.
254. Cosemans JMEM, Kuijpers MJE, Lecut C, Loubele STBG, Heeneman S, Jandrot-Perrus M, et al. Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1 juill 2005;181(1):19-27.
255. Kang T-Y, Lee JH, Kim BJ, Kang J-A, Hong JM, Kim BS, et al. *In vivo* endothelialization of tubular vascular grafts through *in situ* recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins. *Biofabrication.* 20 janv 2015;7(1):015007.

256. Salehpour A, Butler DL, Proch FS, Schwartz HE, Feder SM, Doxey CM, et al. Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* nov 1995;13(6):898-906.