



HAL
open science

Développement de vaisseaux sanguins issus de l'ingénierie tissulaire et obtenus par tissage de fils de matrice extracellulaire ovine

Gaëtan Roudier

► **To cite this version:**

Gaëtan Roudier. Développement de vaisseaux sanguins issus de l'ingénierie tissulaire et obtenus par tissage de fils de matrice extracellulaire ovine. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0427 . tel-04768492

HAL Id: tel-04768492

<https://theses.hal.science/tel-04768492v1>

Submitted on 6 Nov 2024

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 Gaëtan ROUDIER

**Développement de vaisseaux sanguins
issus de l'ingénierie tissulaire et obtenus par tissage
de fils de matrice extracellulaire ovine**

Sous la direction de : Nicolas L'HEUREUX

Soutenue le 15 décembre 2023

Membres du jury :

Mme. LE VISAGE, Catherine
Mme. SALSAC, Anne-Virginie
M. MENASCHÉ, Philippe
M. CHAKFÉ, Nabil
M. L'HEUREUX, Nicolas

DR – INSERM, Université de Nantes
DR – CNRS, UTC Compiègne
PU-PH, Université Paris Cité
PU-PH, Université de Strasbourg
DR – INSERM, Université de Bordeaux

Présidente et Rapportrice
Rapportrice
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Développement de vaisseaux sanguins issus de l'ingénierie tissulaire et obtenus par tissage de fils de matrice extracellulaire ovine

Des greffons vasculaires sont implantés quotidiennement, en tant que pontages coronariens ou dans les membres inférieurs, ou en tant que greffons artérioveineux (GAV) pour les patients hémodialysés. Les vaisseaux sanguins autologues sont la référence, mais leur disponibilité est limitée, alors que les substituts synthétiques sont sujets à la thrombose, à l'hyperplasie intimale et aux infections. Pour surmonter ces limitations, notre équipe a produit un substitut vasculaire biologique issu de l'ingénierie tissulaire (TEVG), tissé à partir de fils de matrice extracellulaire assemblée par les cellules (MAC). Cette approche textile est très polyvalente car elle permet de contrôler finement les propriétés géométriques et mécaniques des TEVG. Le premier prototype de TEVG tissé avait des propriétés mécaniques supra-physiologiques, créant un décalage avec les vaisseaux sanguins natifs qui peut mener à l'échec du greffon. L'objectif de cette thèse était donc de produire un TEVG avec des propriétés mécaniques et structurales plus proches de celles des vaisseaux sanguins natifs, et de l'implanter comme greffon allogénique afin d'étudier sa performance à court terme dans un modèle de gros animal. Tout d'abord, nous avons étudié l'influence des paramètres de production sur les propriétés des TEVG. Les TEVG ont été tissés avec plusieurs combinaisons de paramètres de tissage et leurs propriétés géométriques et mécaniques ont été évaluées. Les résultats ont montré que la force de la MAC avait un effet sur la pression à l'éclatement, tandis que le nombre de fils de chaîne et l'épaisseur du fil de trame avaient un effet sur l'épaisseur de la paroi et l'ondulation de surface de la lumière. De plus, la compliance dépend principalement de la tension du fil de trame pendant le tissage. Ensuite, nous avons développé un greffon tissé avec des propriétés mécaniques et structurales plus proches de celles des vaisseaux sanguins natifs, et nous l'avons adapté à une implantation en tant que GAV allogénique chez le mouton. Les TEVG tissés optimisés présentaient une perméabilité transmurale inférieure aux 50 mL/min/cm² souvent suggérés pour une utilisation clinique (25 ± 8 mL/min/cm²), d'excellentes rétention à la suture et pression à l'éclatement (5 ± 1 N et 3492 ± 307 mmHg, respectivement), et une compliance plus élevée que celle des prothèses synthétiques commerciales (4,8 %/100 mmHg contre 1,2 %/100 mmHg). L'implantation des TEVG en tant que GAV a été réussie avec une hémostase rapide. Les greffons ont ensuite été prélevés à 4 et 8 semaines post-implantation ($n = 7$ animaux). Les TEVG étaient perméables à 8 semaines tandis que le néotissu formé était composé de cellules musculaires lisses, et qu'un endothélium a été observé dans la partie centrale d'un greffon. La réaction inflammatoire a diminué entre 4 et 8 semaines. En outre, les greffons ont été ponctionnés à 4 semaines avec succès. En conclusion, nous avons produit une boîte à outils qui nous a permis de tisser un TEVG biologique et allogénique avec des propriétés structurales et mécaniques plus proches de celles des vaisseaux sanguins natifs. Nous avons montré que nous pouvions l'implanter en tant que GAV et l'utiliser comme accès vasculaire dans un modèle de gros animal. Les résultats de cette étude à court terme nous aideront à améliorer le substitut pour qu'il soit performant à long terme *in vivo*.

Mots clés : Ingénierie tissulaire vasculaire, Matrice extracellulaire Assemblée par les Cellules, Assemblage textile, Propriétés mécaniques

Development of Tissue-Engineered Vascular Grafts woven from threads of ovine Cell-Assembled extracellular Matrix

Vascular grafts are implanted daily, whether it is as leg or coronary bypasses or as arteriovenous shunts (AVS) for patients on hemodialysis. Autologous blood vessels are the gold standard but have limited availability while synthetic materials are prone to thrombosis, intimal hyperplasia and infections. To overcome these limitations, our team produced a biological Tissue-Engineered Vascular Graft (TEVG) woven from threads of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM). This textile-based approach is very versatile because it gives fine control over the geometrical and mechanical properties of the TEVG. The first prototype woven TEVG had supraphysiological mechanical properties that would create a mismatch with native blood vessels and may lead to graft failure. Hence, the goal of this thesis was to produce a TEVG with mechanical and structural properties closer to those of native blood vessels, and to implant it as an allogeneic graft to study its short-term performance in a large animal model. First, we studied how changes in production parameters affect the properties of the TEVG. TEVGs were woven with several combinations of weaving parameters and evaluated for geometrical and mechanical properties. Results showed that CAM strength had an effect on burst pressure, whereas warp count and weft thickness had an effect on wall thickness and lumen waviness. Moreover, the compliance relied mainly on weft tension during weaving. Next, we developed a woven TEVG with mechanical and structural properties closer to those of native blood vessels, and adapted it for an implantation as an allogeneic AVS in a sheep model. Optimized woven TEVGs had lower water permeability than the 50 mL/min/cm² often suggested for clinical use (25 ± 8 mL/min/cm²), excellent suture retention strength and burst pressure (5 ± 1 N and 3492 ± 307 mmHg, respectively), and higher compliance than ePTFE prostheses (4.8 %/100 mmHg vs 1.2 %/100 mmHg). Implantation of TEVGs as AV shunts was successful with quick hemostasis. Then, grafts were harvested after 4 and 8 weeks post-implantation ($n = 7$ animals). TEVGs were patent at 8 weeks while the neotissue formed was composed of smooth muscle cells, and an endothelium was observed in the mid-graft region of one TEVG. Inflammatory response decreased between 4 and 8 weeks. In addition, grafts were successfully cannulated at 4 weeks. In conclusion, we produced a toolbox that helped us weaving a biological, allogeneic TEVG with structural and mechanical properties closer to those of native blood vessels. We showed that we can implant it as AVS and use it as a vascular access conduit in a large animal model. Results of this short-term study will help us improve the substitute to achieve long-term *in vivo* success.

Keywords: Vascular tissue engineering, Cell-Assembled extracellular Matrix, Textile assembly, Mechanical properties

*À tous ceux qui ont participé,
De manière infime ou infinie,
À cette aventure d'une vie,
Et au chemin qui m'y a mené.*

Merci.

TABLE DES MATIERES

I.	LISTE DES FIGURES.....	10
II.	LISTE DES TABLEAUX.....	12
III.	LISTE DES ABBREVIATIONS	13
IV.	INTRODUCTION GENERALE	15
V.	REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
1.	PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU SYSTÈME VASCULAIRE.....	17
1.1.	Vaisseaux sanguins	17
1.1.1.	Anatomie et fonctions.....	17
1.1.2.	Structure et composition.....	18
1.1.3.	Propriétés mécaniques.....	22
1.2.	Contextes pathologiques impliquant le besoin d'un substitut vasculaire	24
1.2.1.	Athérosclérose.....	24
1.2.1.1.	Définition et santé publique.....	24
1.2.1.2.	Mécanismes.....	24
1.2.2.	Maladies rénales chroniques.....	25
1.2.2.1.	Définition et implications	25
1.2.2.2.	Accès vasculaires pour hémodialyse	26
1.2.3.	Autres situations cliniques	28
1.3.	Substituts vasculaires utilisés en chirurgie vasculaire.....	29
1.3.1.	Substituts biologiques	29
1.3.1.1.	Substituts autologues.....	29
1.3.1.2.	Autres substituts biologiques.....	31
1.3.2.	Substituts synthétiques non dégradables	32
1.3.2.1.	Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE).....	32
1.3.2.2.	Polytéréphtalate d'éthylène (PET)	32
1.3.3.	Indications et performances des substituts actuels.....	33
1.3.4.	Phénomènes d'échecs et recherche de solutions	34
1.3.5.	Substitut vasculaire idéal.....	38
2.	INGÉNIERIE TISSULAIRE ET SUBSTITUTS VASCULAIRES.....	40
2.1.	Approche de l'ingénierie tissulaire	40
2.2.	Différentes stratégies en ingénierie tissulaire vasculaire.....	41
2.2.1.	In vitro	41
2.2.1.1.	Sans échafaudage biologique exogène	42
2.2.1.2.	Avec échafaudage biologique exogène.....	47

2.2.1.3.	Avec échafaudage synthétique résorbable	51
2.2.2.	In vivo	57
2.2.3.	In situ	61
2.2.3.1.	Polymères biologiques	61
2.2.3.2.	Polymères synthétiques biorésorbables	62
2.2.3.3.	Echafaudages dérivés de tissus natifs	66
2.3.	Modèles animaux pour l'évaluation d'accès vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire ..	71
3.	RÉPONSE DE L'HÔTE À DES ÉCHAFAUDAGES DE MATRICE EXTRACELLULAIRE SYNTHÉTISÉE PAR LES CELLULES	78
3.1.	MEC synthétisée par les cellules en ingénierie tissulaire	78
3.1.1.	Matrice extracellulaire	78
3.1.1.1.	Structure et fonctions	78
3.1.1.2.	Collagène	79
3.1.1.3.	Elastine	81
3.1.2.	Echafaudages de MEC synthétisée par des cellules en ingénierie tissulaire	83
3.2.	Réponse immunologique aux échafaudages de MEC	86
3.2.1.	Système immunitaire inné et adaptatif.....	86
3.2.2.	Réponse de l'hôte aux biomatériaux.....	87
3.2.3.	Echafaudages de MEC en études pré-cliniques et cliniques	89
3.2.3.1.	MEC dérivée de tissus natifs	89
3.2.3.2.	MEC synthétisée par des cellules in vitro.....	94
4.	APPROCHE TEXTILE : VERS DES SUBSTITUTS VASCULAIRES MODULABLES.....	99
4.1.	Approche d'assemblage textile pour les dispositifs médicaux.....	99
4.2.	Les biotextiles	100
4.3.	Substituts vasculaires assemblés par approche textile	103
4.4.	Influence des paramètres d'assemblage textile.....	107
VI.	OBJECTIFS	110
VII.	RESULTATS.....	113
1.	Article 1 : Effets des paramètres de tissage sur les propriétés de substituts vasculaires entièrement biologiques issus de l'ingénierie tissulaire	113
2.	Article 2 : Première utilisation d'un substitut vasculaire fait de matrice extracellulaire assemblée par les cellules en tant que pontage artérioveineux chez le mouton	162
VIII.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	213
IX.	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	227
1.	Publications	227
2.	Communications orales	227
3.	Communications affichées	227

X. BIBLIOGRAPHIE.....	229
-----------------------	-----

I. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les vaisseaux du système circulatoire [39].	17
Figure 2 : Parois des artères, des veines et des capillaires sanguins [39].	19
Figure 3 : Schéma d'une artère élastique de gros diamètre [49].	20
Figure 4 : Comportement mécanique physiologique des vaisseaux sanguins : relation entre la pression et le diamètre d'une artère. Les courbes de charge et de décharge représentent le phénomène d'hystérésis [51].	22
Figure 5 : Schéma des principales contraintes qui agissent sur la paroi d'un segment d'artère (adapté de [56]).	23
Figure 6 : Initiation, progression et complication de la plaque d'athérosclérose coronaire humaine [67].	25
Figure 7 : Dérivation artérioveineuse de Scribner [92].	27
Figure 8 : Accès vasculaires actuels pour l'hémodialyse [98].	28
Figure 9 : Substitut vasculaire en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE).	32
Figure 10 : Substitut vasculaire en polytéréphtalate d'éthylène (PET).	33
Figure 11 : Mécanismes possibles de l'endothélialisation des greffons vasculaires [150].	35
Figure 12 : Illustration des différentes stratégies en ingénierie tissulaire vasculaire [183].	40
Figure 13 : Premier substitut vasculaire biologique issu de l'ingénierie tissulaire et développé par Weinberg et Bell en 1986 [182].	41
Figure 14 : Substitut vasculaire développé par le groupe de L'Heureux [191].	43
Figure 15 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Tranquillo [17].	49
Figure 16 : Substitut vasculaire remodelé après 8 semaines d'implantation chez le rat et développé par le groupe de Vorp [223].	53
Figure 17 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Niklason [232].	54
Figure 18 : Matrice à tissu (« Tissue Die ») de Sparks [241].	57
Figure 19 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Nakayama [246].	59
Figure 20 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Rotmans [20].	60
Figure 21 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Shinoka [269].	63
Figure 22 : Greffon de 5 mm de diamètre fait à partir de sous-muqueuse d'intestin de chien [305].	67
Figure 23 : Substitut vasculaire fait à partir de sous-muqueuse d'intestin grêle de porc et développé par le groupe d'Andreadis [23].	68
Figure 24 : Implantation d'un substitut vasculaire en tant que pontage artérioveineux entre l'artère carotide et la veine jugulaire externe de brebis [326].	73
Figure 25 : Représentation de la synthèse, de la sécrétion et de l'assemblage du collagène [338].	80
Figure 26 : Représentation schématique de la localisation de la membrane basale et de la matrice interstitielle dans la paroi vasculaire [347].	81
Figure 27 : Illustration de la synthèse de la tropoélastine et de la formation de fibres élastiques [348].	82
Figure 28 : Stratégies de décellularisation des échafaudages de MEC [367].	85
Figure 29 : Vue d'ensemble de la réaction à un corps étranger [184].	88
Figure 30 : Schéma d'un tissu toile [442].	99
Figure 31 : Schéma de trois armures différentes de tissus [442].	100
Figure 32 : Différentes utilisations de méthodes textiles avec de la MAC humaine [201].	102
Figure 33 : Substitut vasculaire tricoté à partir de fils de collagène et développé par le groupe de King [453].	104
Figure 34 : Prothèse en fibroïnes de soie tricotée par Kiritani et al. [258].	105

Figure 35 : Substitut tissé à partir de fils de membrane amniotique humaine et développé par le groupe de L'Heureux [200].....	106
Figure 36 : Différents modèles de tressage utilisés par le groupe de Breuer [293].	107
Figure 37 : Illustration du guipage, procédé par lequel un fil dit « en âme » est entouré d'un fil dit « enrobant ».....	217
Figure 38 : Production d'un substitut tissé avec cosselage.....	220

II. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structure et composition de la paroi des vaisseaux sanguins en fonction du type de vaisseau [51].....	21
Tableau 2 : Evaluation pré-clinique chez le mouton d'accès vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire.	76
Tableau 3 : Source des tissus, domaine d'application et étapes de traitement post-décellularisation des échafaudages de MEC les plus courants disponibles dans le commerce [414].....	84

III. LISTE DES ABBREVIATIONS

α -Gal : Galactose- α -1,3-galactose

α -SMA : alpha actine des muscles lisses (*alpha smooth muscle actin*)

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

CML : Cellules musculaires lisses

eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale (*endothelial nitric oxyde synthase*)

ePTFE : Polytétrafluoroéthylène expansé

FAV : Fistule artérioveineuse

GA : Glutaraldéhyde

GAG : Glycosaminoglycanes

GAV : Greffon artérioveineux

IL : Interleukines

IFN- γ : Interféron gamma

IRCT : Insuffisance rénale chronique terminale

MAC : Matrice extracellulaire assemblée par les cellules

MEC : Matrice extracellulaire

MHC : Chaînes lourdes de myosine (*myosin heavy chains*)

MRC : Maladies rénales chroniques

PCL : Polycaprolactone

PET : Polytéraphthalate d'éthylène

PEUU : Urée de polyester uréthane (*poly(ester-urethane)urea*)

PG : Protéoglycanes

PGA : Acide polyglycolique (*polyglycolic acid*)

PGG : Pentagalloyl glucose

PGS : Sébacate de polyglycérol (*polyglycerol sebacate*)

PLA : Acide poly-L-lactique (*polylactic acid*)

PLCL : Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone)

P4HB : Poly-4-hydroxybutyrate

SDS : Dodécylsulfate de sodium (*sodium dodecyl sulfate*)

SIS : Sous-muqueuse de l'intestin grêle (*small intestinal submucosa*)

TEHV : Valves cardiaques issues de l'ingénierie tissulaire

TLR : Récepteur de type Toll (*Toll-like receptor*)

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor alpha*)

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*)

vWF : Facteur de von Willebrand

IV. INTRODUCTION GENERALE

Les substituts vasculaires sont utilisés quotidiennement par les chirurgiens, que ce soit en tant que substituts de petit diamètre (< 6 mm) pour des pontages coronariens ou des membres inférieurs, ou en tant que greffons de plus gros diamètre (> 6 mm), utilisés, entres autres, comme accès vasculaires pour les patients sous hémodialyse¹⁻⁶.

Les substituts synthétiques sont largement utilisés. Cependant, ils sont sujets à la thrombose et à l'hyperplasie intimale, s'obstruant d'autant plus facilement dans le cadre d'applications aux diamètres inférieurs à 6 mm⁷⁻⁹. De plus, lors de leur utilisation en tant qu'accès vasculaire chez les patients sous hémodialyse, leur nature synthétique les rend grandement vulnérables aux infections suite aux ponctions répétées plusieurs fois par semaine¹⁰⁻¹³. Les vaisseaux natifs autologues sont la référence dans le cadre de substituts de faibles diamètres, mais ils sont limités en termes de disponibilité^{4,14-16}. Dans le cadre des patients sous hémodialyse, la création d'une fistule artérioveineuse avec les vaisseaux du patient est généralement la première intention. Cependant, lorsque cette dernière n'est plus utilisable et que l'ensemble des sites de création de fistules chez le patient ont été utilisés, la pose d'un greffon artérioveineux est nécessaire. Ainsi, de nouvelles solutions sont nécessaires, tant pour des applications de faible diamètre que pour des accès vasculaires.

Ces dernières années, de nombreux groupes ont proposé des substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire¹⁷⁻²⁴. Cependant, au-delà même du coût de production de ces greffons, un des problèmes soulevés, tant pour les substituts synthétiques que pour ces solutions d'ingénierie tissulaire, est le décalage entre les propriétés mécaniques du substitut et des vaisseaux natifs. En effet, les propriétés mécaniques d'un greffon vasculaire sont connues pour avoir une influence importante sur la perméabilité et le devenir des prothèses à long terme^{25,26}. Plus les propriétés mécaniques d'un substitut vasculaire sont proches de celles des vaisseaux natifs, plus ce substitut sera performant à long terme²⁷⁻²⁹. Ce manque de perméabilité à long terme est notamment lié au développement d'hyperplasie intimale, accumulation anormale de cellules au niveau de la lumière du vaisseau, et qui est favorisée par les différences de diamètre et de rigidité entre le greffon implanté et le vaisseau natif^{30,31}.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse était de produire un substitut vasculaire entièrement biologique, aux propriétés mécaniques proches de celles des vaisseaux natifs, qui

puisse être utilisé tant pour des applications nécessitant un petit diamètre (< 6 mm) que pour des applications au plus gros diamètre, comme les accès vasculaires. Dans ce but, notre stratégie a reposé sur l'assemblage par tissage de fils de matrice extracellulaire assemblée par les cellules *in vitro* (MAC). En effet, ce matériau est entièrement biologique, peut être produit en grande quantité et a déjà été démontré en clinique comme pertinent immunologiquement^{18,32-34}. Le tissage, quant à lui, est une méthode d'assemblage rapide, automatisable et grandement adaptable, permettant de modifier et contrôler les propriétés du produit en faisant varier les paramètres de production.

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre parties :

Dans la première partie, une revue de la littérature est présentée. Cette revue décrit, dans un premier temps, les différentes problématiques rencontrées et les limites des substituts vasculaires actuels, ainsi que les différentes stratégies utilisées pour proposer de nouvelles solutions plus performantes. Ensuite, sont décrites les réponses immunologiques à des échafaudages biologiques. Aussi, une attention particulière est portée sur les différents travaux de production de substituts vasculaires par assemblage textile.

Dans la deuxième partie, les objectifs de ce travail de thèse sont présentés en détails.

Dans la troisième partie, les différents résultats sont présentés sous forme de publications scientifiques, acceptées pour publication ou en préparation. Le premier article porte sur l'étude de l'effet des paramètres de tissage sur les propriétés structurales et mécaniques des vaisseaux tissés avec des fils de matrice extracellulaire produite en laboratoire. Cet article présente ainsi un modèle de tissage optimisé pour produire des greffons plus pertinents cliniquement. Le deuxième article présente le développement de substituts vasculaires tissés et leur implantation en tant que pontage artérioveineux dans un modèle allogénique de gros animal. La première ponction d'un tel substitut *in vivo* est également montrée.

Enfin, dans la quatrième partie, une conclusion générale sur ces travaux de thèse précède une discussion ainsi que différentes perspectives futures.

V. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU SYSTÈME VASCULAIRE

1.1. Vaisseaux sanguins

1.1.1. Anatomie et fonctions

Le système vasculaire est composé de nombreux vaisseaux qui permettent le mouvement du flux sanguin à travers le système circulatoire du corps humain. Ce réseau est composé de trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires (**Figure 1**). Les artères ont pour but de transporter le sang du cœur vers les tissus du corps. Les veines, à l'inverse, ramènent le sang des tissus vers le cœur. Enfin, les capillaires, les plus petits des vaisseaux sanguins, permettent le passage des nutriments et de l'oxygène du sang aux tissus, et recaptent une partie des déchets métaboliques et le dioxyde de carbone³⁵⁻³⁸.

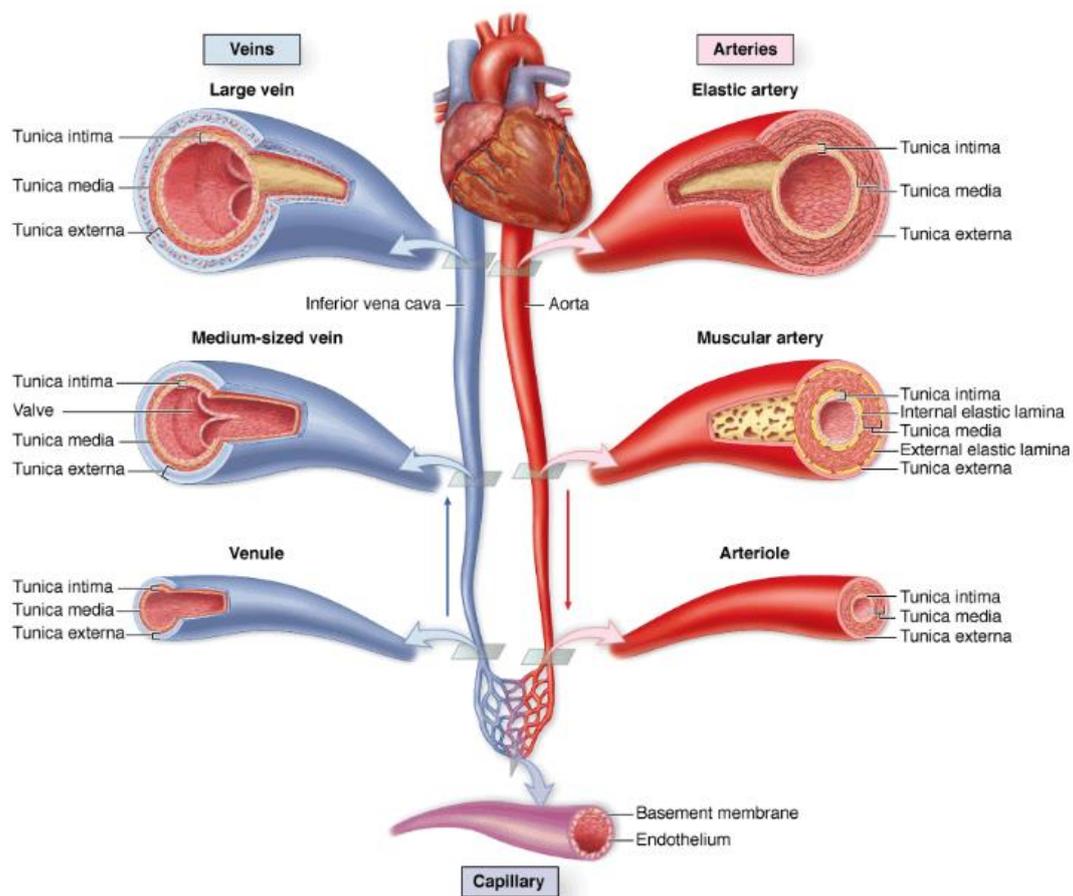


Figure 1 : Les vaisseaux du système circulatoire [39].

A travers son réseau de vaisseaux, le système vasculaire permet le fonctionnement de deux circuits : la grande circulation, aussi appelée circulation systémique, et la petite circulation, connue sous le nom de circulation pulmonaire. Les battements concomitants des oreillettes et des ventricules de la pompe cardiaque permettent une circulation sanguine simultanée à travers ces deux circuits.

La circulation systémique, ou grande circulation, permet l'envoi du sang oxygéné et des nutriments du cœur vers les tissus et les organes, et le retour du sang désoxygéné vers le cœur. La grande circulation est composée de quatre réseaux : artériel, artériolaire, capillaire et veineux³⁹. Ainsi, le sang quitte le côté droit du cœur en passant par l'aorte puis par des artères aux diamètres décroissants. Il traverse ensuite les artérioles, puis les capillaires, qui sont les réseaux d'échanges. De ces derniers, le sang passe dans les veinules, puis dans les veines, pour finalement rejoindre le côté droit du cœur via les veines caves supérieure et inférieure^{40,41}.

La circulation pulmonaire, en série avec la circulation systémique, permet la réoxygénation du sang. Ainsi, le sang venant des veines de la circulation systémique est envoyé par le cœur aux lobes pulmonaires via les deux artères pulmonaires, puis rentre en contact avec les alvéoles pulmonaires qui permettent sa réoxygénation. Il est ensuite renvoyé vers l'oreillette gauche du cœur via les veines pulmonaires, avant de s'écouler de nouveau dans la circulation systémique^{40,41}. La petite circulation est notamment caractérisée par une pression sanguine peu élevée.

1.1.2. *Structure et composition*

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches distinctes et concentriques, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 2**)^{40,42,43}.

L'intima consiste en une couche de cellules endothéliales liées à une membrane basale, et formant l'endothélium. Au contact direct du flux sanguin, les cellules endothéliales ont, entre autres, un rôle antithrombotique. Ces dernières sont orientées dans le sens du flux sanguin selon l'axe longitudinal du vaisseau. Les cellules endothéliales synthétisent également certains composants de la limitante élastique interne, couche séparant l'intima de la media^{42,44,45}.

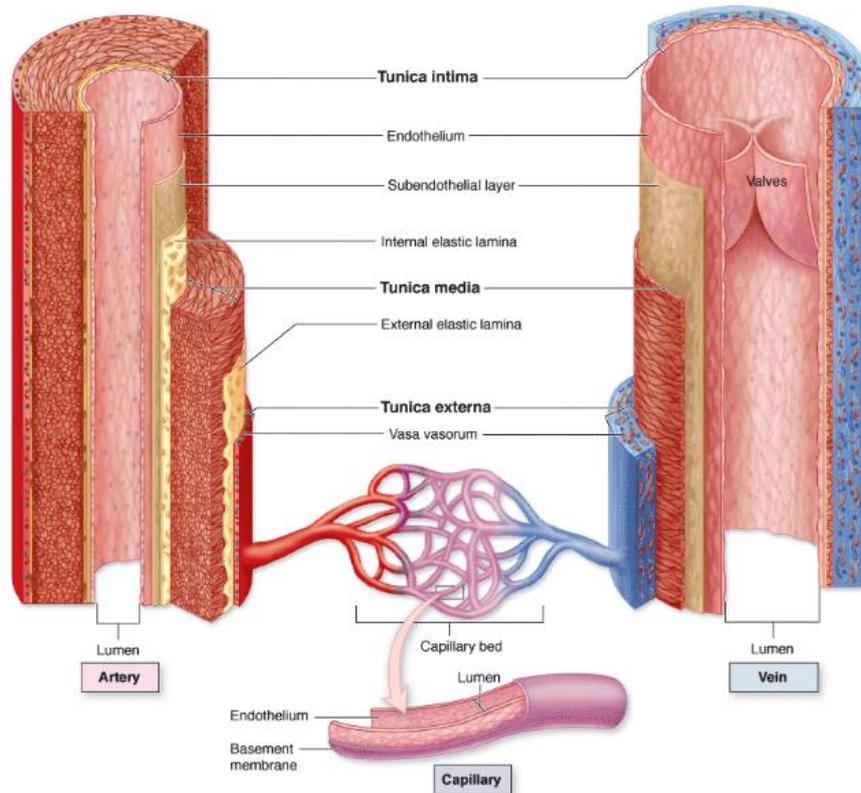


Figure 2 : Parois des artères, des veines et des capillaires sanguins [39].

La media, située entre l'intima et l'adventice, est la couche musculaire des vaisseaux^{40,42,45}. C'est notamment la couche la plus épaisse. Elle est composée principalement de cellules musculaires lisses (CML) et d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène, élastine et protéoglycanes. Elle a un rôle mécanique important, en particulier dans les artères de large diamètre, où elle permet de résister aux fortes pressions et de conserver l'élasticité. Les CML, orientées généralement perpendiculairement à l'axe des vaisseaux sanguins, sont responsables de la synthèse de la MEC de la media. Enfin, la limitante élastique externe sépare la media de l'adventice.

L'adventice, couche la plus externe de la structure des vaisseaux, a de nombreux rôles incluant le support mécanique aux vaisseaux, la réponse immunitaire ou encore le remodelage de la MEC⁴⁶. Sa composition ainsi que sa structure lui permettent de s'adapter à de nombreux changements mécaniques⁴⁷. Elle est composée d'une MEC riche en fibres de collagène qui sont produites par les fibroblastes, principal type cellulaire résidant au sein de cette couche⁴⁶. L'adventice contient également des cellules ayant un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire (p. ex. macrophages, cellules dendritiques)⁴⁶. Dans le cas des larges vaisseaux

sanguins (artères et veines dont le diamètre est supérieur à 5 mm), l'adventice intègre des *vasa vasorum*, petits vaisseaux sanguins servant à la vascularisation de la paroi (**Figure 3**)⁴⁸. Il a également été décrit que l'adventice est une importante niche pour des cellules souches et progénitrices, incluant les cellules progénitrices endothéliales, les cellules souches hématopoïétiques ou encore mésenchymateuses^{46,49}.

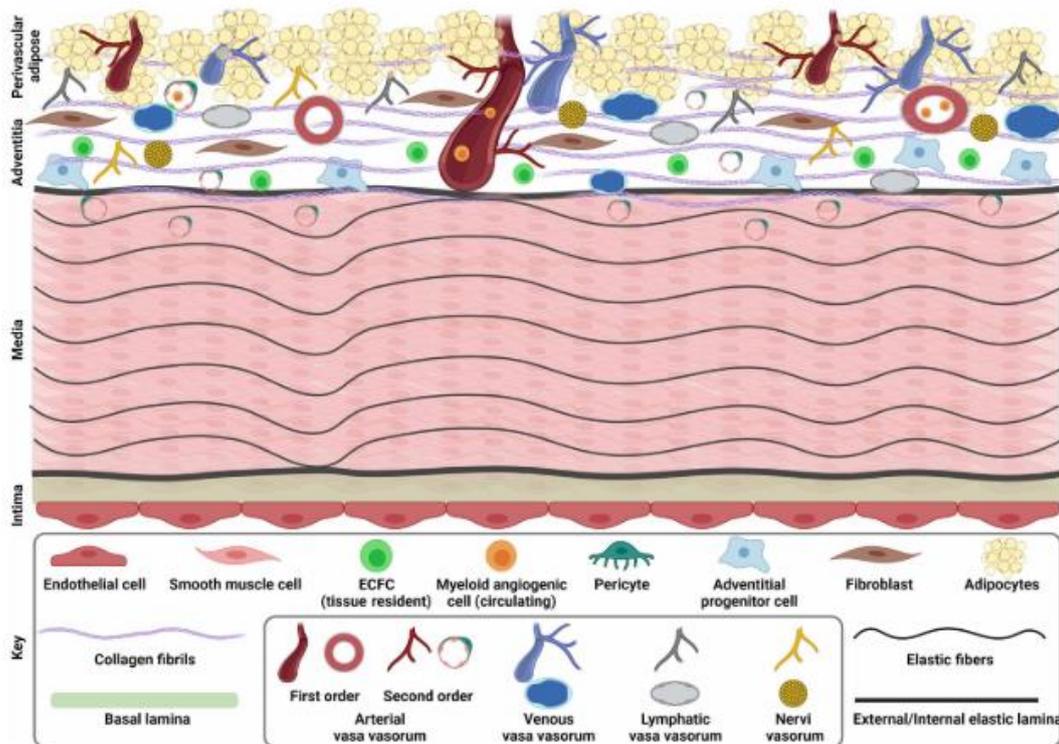
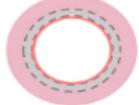


Figure 3 : Schéma d'une artère élastique de gros diamètre [49].

Toutefois, bien que la structure de la paroi des vaisseaux soit commune aux artères et aux veines, il existe certaines différences en fonction du type de vaisseau et de la fonction de ce dernier au sein du système circulatoire (**Tableau 1**). Ainsi, les artères possèdent une media plus large que celle des veines et une lumière plus étroite, alors que la couche la plus épaisse de ces dernières est l'adventice^{39,42}. Les artères élastiques, comme l'aorte ou la carotide, possèdent une matrice extracellulaire plus riche en élastine, permettant une résistance aux variations du flux sanguin (**Figure 4**)^{50,51}. Les artères musculaires ont, à l'inverse, une matrice plus riche en collagène, ce qui leur donne une plus grande résistance mécanique. Les veines possèdent des valvules créées par l'endothélium afin d'aider à la redirection du sang vers le cœur, empêchant ainsi son reflux à cause de la gravité ou des contractions. Également, l'adventice des larges artères est plus largement innervée que les autres vaisseaux.

Tableau 1 : Structure et composition de la paroi des vaisseaux sanguins en fonction du type de vaisseau [51].

	LARGE ARTERIES	MEDIUM ARTERIES	SMALL ARTERIES	LARGE VEINS	MEDIUM VEINS	SMALL VEINS
						
Diameter (mm)	> 10	6 - 10	1 - 6	> 15	6 - 15	1 - 6
Wall Thickness (µm)	1500	1000	125 - 800	1200	800	40 - 500
Total Length (mm)	400	8000	160000	400	8000	160000
Pressur. (mmHg)*	100	100	90 - 95	5	10	15
PERCENTAGE COMPOSITION						
	Large size		Medium size		Small size	
	Adventitia					
FBS	9.5 %					11.5 %
Collagen	77.5 %					64.0 %
Elastin	2.5 %					0
	Media					
SMCs	33.5 %					60.5 %
Collagen	37.0 %					12.0 %
Elastin	24.5 %					1.5 %

Les capillaires, dont la morphogénèse est guidée par la MEC et les besoins des cellules présentes, sont quant à eux constitués d'une couche de cellules endothéliales couverte d'une couche de péricytes⁵². Leur paroi fine permet le passage de l'oxygène et des nutriments du sang vers les tissus et le passage des déchets métaboliques des tissus vers le sang.

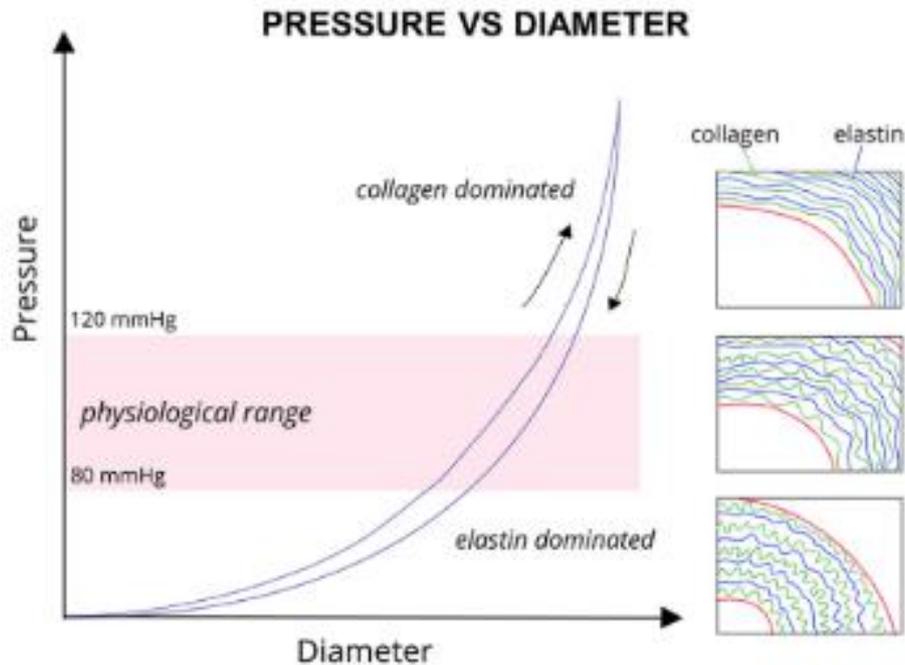


Figure 4 : Comportement mécanique physiologique des vaisseaux sanguins : relation entre la pression et le diamètre d'une artère. Les courbes de charge et de décharge représentent le phénomène d'hystérésis [51].

1.1.3. Propriétés mécaniques

L'écoulement du sang à travers le système circulatoire est permis par la différence de pression entre les artères et les veines. Le flux sanguin dépend de la capacité du cœur à pomper le sang vers les tissus et de la résistance fournie par les vaisseaux sanguins. Comme décrit par la loi de Poiseuille, le débit d'écoulement du sang est proportionnel au rayon du vaisseau et inversement proportionnel à la viscosité⁵³. Ainsi, pour un diamètre de vaisseau moindre, la résistance à l'écoulement augmente, réduisant le flux sanguin⁴⁰. Du fait du caractère pulsatile du flux sanguin, la pression artérielle varie, de la pression systolique (120 mmHg) quand le cœur se contracte à la pression diastolique (80 mmHg), lorsque le cœur est au repos. Ainsi, les vaisseaux ont une capacité de déformation afin de s'adapter à ces changements de pression. Les artères possèdent une paroi plus épaisse que les veines pour pouvoir résister à une plus forte pression.

La paroi des vaisseaux sanguins est soumise à plusieurs contraintes (**Figure 5**) : une contrainte de cisaillement en surface de la paroi qui est induite par l'écoulement, et des contraintes circonférentielles σ_θ et axiales σ_z intramuraux⁵⁴⁻⁵⁶. Ici, il est d'intérêt de noter que ces contraintes circonférentielles sont proportionnelles à la pression (P) au sein du

vaisseau sanguin ainsi qu'à son diamètre interne (a), et inversement proportionnelles à l'épaisseur de la paroi (h). On retrouve ainsi la relation suivante :

$$\sigma_{\theta} = \frac{Pa}{h}$$

Les contraintes de cisaillement sur la surface de la paroi ont un rôle méchanotransducteur et provoquent la libération d'agents vasodilatateurs permettant l'adaptation du diamètre des vaisseaux en réponse au flux⁵⁷. Ainsi, en réponse aux contraintes de cisaillement, les cellules endothéliales synthétisent l'oxyde nitrique via l'oxyde nitrique synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS)) et le libèrent dans la media, provoquant la relaxation des CML et régulant la vasodilatation⁵⁷. Les contraintes de cisaillement régulent d'autres événements comme la libération et l'action de facteurs de transcription, de croissance, ou encore d'enzymes⁵⁸. Des revues de la littérature ont déjà montré que la diminution ou l'augmentation de ces contraintes en dehors des valeurs physiologiques peut entraîner divers mécanismes pathologiques⁵⁸⁻⁶³.

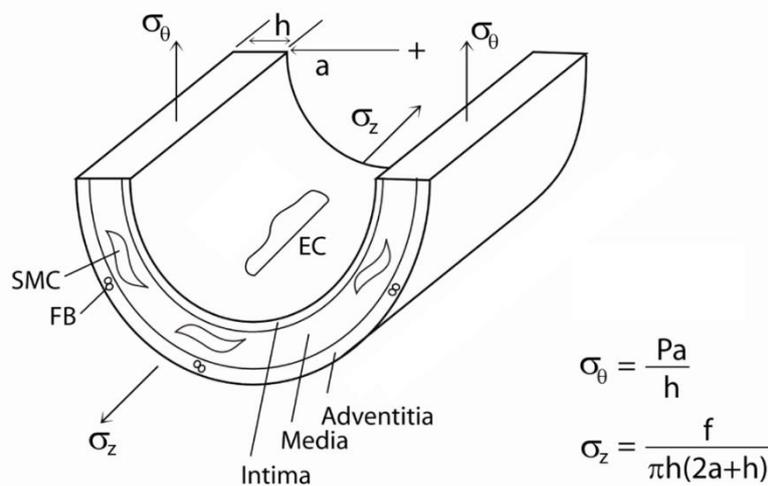


Figure 5 : Schéma des principales contraintes qui agissent sur la paroi d'un segment d'artère (adapté de [56]).

(σ_{θ} et σ_z : contraintes circumférentielles et axiales, respectivement ; P : pression ; a : rayon interne ; h : épaisseur de la paroi ; EC : cellules endothéliales ; SMC : cellules musculaires lisses ; FB : fibroblastes).

1.2. Contextes pathologiques impliquant le besoin d'un substitut vasculaire

1.2.1. Athérosclérose

1.2.1.1. Définition et santé publique

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause mondiale de décès dans les pays industrialisés^{64,65}. En 2015, elles ont été responsables de plus de 17,6 millions de décès dans le monde⁶⁴. A elles seules, les cardiopathies ischémiques (manque d'oxygénation du muscle cardiaque) sont responsables de 16 % des décès enregistrés dans le monde, et sont les causes ayant entraîné la plus importante augmentation de décès entre 2000 et 2019, passant de 2 millions à 8,9 millions⁶⁵.

En 1958, l'Organisation mondiale de la santé définissait l'athérosclérose comme « [...] une association variable de remaniements de l'intima des artères (en tant que distinctes et artérioles) consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts de calcium, le tout accompagné de modifications de la media »⁶⁶.

1.2.1.2. Mécanismes

L'athérosclérose est caractérisée par une accumulation de cholestérol dans l'intima de la paroi artérielle, formant une plaque pouvant amener à une obstruction partielle (sténose) ou totale (thrombose) du vaisseau sanguin⁶⁷. La formation d'une plaque d'athérosclérose débute par la pénétration de lipoprotéines de faible densité (« mauvais cholestérol ») dans la paroi d'une artère, par endocytose ou transcytose (**Figure 6 (1)**)^{67,68}. En réponse à cette accumulation de lipoprotéines, des globules blancs sont libérés sur site et se différencient en macrophages (2), qui absorbent ces lipoprotéines et deviennent des cellules spumeuses (3). Ces cellules spumeuses vont alors libérer des cytokines et autres facteurs de croissance afin de favoriser le recrutement de cellules immunitaires (monocytes et lymphocytes) et la prolifération de CML qui proviennent de la media⁶⁹. Une plaque fibreuse, formée de CML et de protéines de la MEC synthétisées par ces dernières, recouvre ensuite ce noyau formé de lipides et autres débris cellulaires, résultats de l'inflammation (4)^{67,69}. Tant que cette plaque reste stable et ne réduit pas trop le diamètre de l'artère (sténose) et, par conséquent, le flux sanguin, l'athérosclérose ne cause pas de complications. Une des évolutions possibles de la plaque athéromateuse est le développement et la progression de calcification⁷⁰⁻⁷². Cette

dernière peut notamment être responsable de l'augmentation de la rigidité de la paroi des vaisseaux, ainsi que de la progression de la sténose. Lorsque la plaque d'athérosclérose est instable et se fissure, des débris cellulaires sont libérés dans le sang et provoquent l'intervention des plaquettes afin de déclencher la coagulation et la formation d'un caillot (5 et 6). Soit ce caillot bloque la circulation du sang à l'endroit où la plaque s'est fissurée, soit il se détache et obstrue l'artère en aval, résultant en une thrombose. Cette thrombose peut alors être responsable de la survenue d'ischémie cérébrale (accident vasculaire cérébral), cardiaque (infarctus du myocarde) ou des membres (p. ex. artériopathie oblitérante des membres inférieurs).

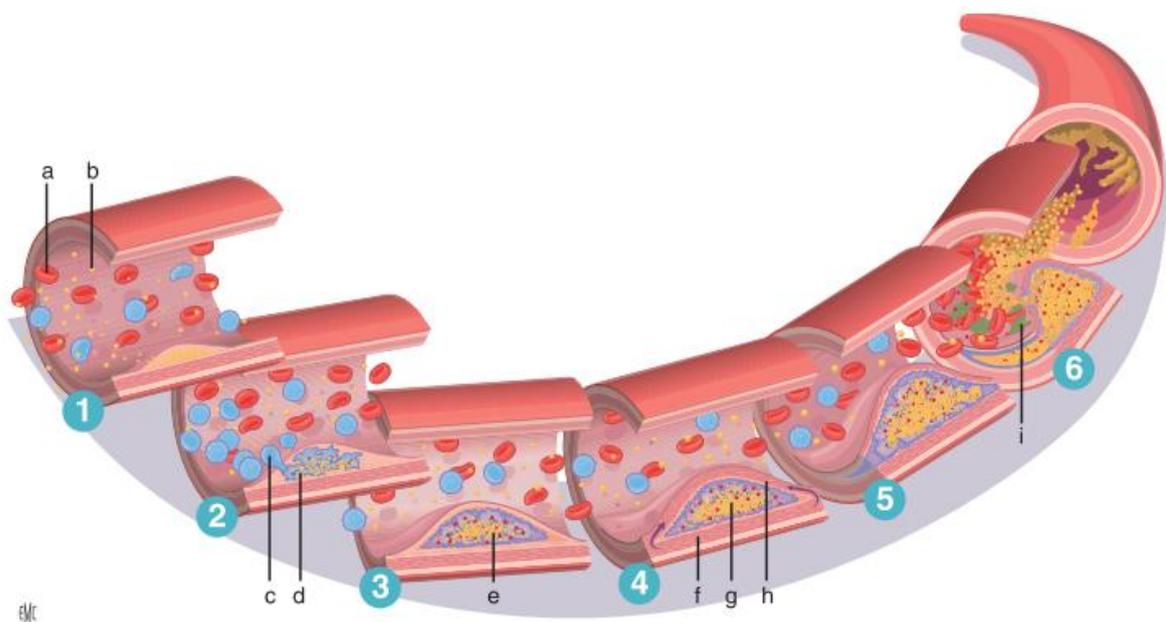


Figure 6 : Initiation, progression et complication de la plaque d'athérosclérose coronaire humaine [67].

a : globule rouge ; *b* : LDL ; *c* : globule blanc ; *d* : macrophages ; *e* : cytokines ; *f* : cellules musculaires ; *g* : cœur lipidique ; *h* : chape fibreuse ; *i* : plaquettes.

1.2.2. Maladies rénales chroniques

1.2.2.1. Définition et implications

Les reins sont des organes vitaux dont une des fonctions est la régulation de la composition des liquides corporels, en excréant notamment les déchets métaboliques, l'eau et les sels en excès. Les maladies rénales chroniques (MRC) sont définies par la présence de lésions rénales ainsi que par la baisse du débit de filtration glomérulaire depuis au moins trois mois^{73,74}. Les MRC sont classées en cinq stades de sévérité croissante basés sur ce débit⁷³.

Les MRC, dont l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) est le dernier stade, était la 12^{ème} cause de mortalité dans le monde en 2017⁷⁵. Les décès imputés aux MRC, et les décès liés à des maladies cardiovasculaires causées par des MRC, représentaient 4,6 % de la mortalité globale la même année⁷⁵. Les patients atteints d'IRCT dépendent d'un traitement de substitution du rein défaillant, que ce soit par une transplantation rénale ou par dialyse⁷⁶. En 2010, 2,6 millions de patients dans le monde recevaient un traitement de substitution du rein défaillant, dont plus de 500 000 en Europe^{75,77,78}. Il est estimé que le nombre de patients nécessitant un traitement de substitution du rein défaillant passera à plus de 5,4 millions d'ici 2030⁷⁶. Parmi les nouveaux patients, l'hémodialyse est le traitement de substitution du rein prédominant en première intention et représente 89 % des patients dialysés dans le monde⁷⁷⁻⁷⁹. En 2017, 76 % des patients en IRCT à travers le monde ont bénéficié d'une transplantation rénale ou étaient dialysés⁷⁵. Il est intéressant de noter que l'accès aux soins pour les patients atteints de MRC est globalement très inégalitaire⁸⁰.

1.2.2.2. Accès vasculaires pour hémodialyse

L'hémodialyse consiste en la filtration du sang via un appareil extracorporel afin de l'épurer, et ce dans le but de suppléer la fonction du rein⁸¹. En 1913, Abel, Rowntree et Turner ont été les premiers à suggérer l'utilisation d'une membrane artificielle pour l'hémodialyse⁸². En parallèle, George Haas, un médecin allemand, se servit de ses propres recherches ainsi que des résultats d'Abel et ses collègues afin de développer un procédé de purification du sang. En 1925, Haas effectua la première hémodialyse sur un humain pendant 15 minutes⁸³. Quelques années plus tard, en 1943, Kolff fit office de pionnier dans le domaine de la dialyse en construisant la première machine à hémodialyse⁸⁴. Bien qu'aucun des 15 premiers patients n'ait survécu à la dialyse, une femme de 67 ans présentant des signes d'IRCT a vu son état clinique s'améliorer considérablement après la procédure⁸⁵.

Dans les années 1950, l'invention de Kolff est devenue une solution pour les patients souffrant d'insuffisance rénale aiguë⁸⁶⁻⁸⁹. Cependant, les patients atteints d'IRCT restaient sans solution. L'une des raisons pour lesquelles on pensait que la dialyse était impossible pour ces patients était les dommages causés aux veines et aux artères après des traitements répétés, ce qui rendait l'accès vasculaire rapidement difficile. En effet, les piqûres répétées détruisaient les vaisseaux sanguins et entraînaient un important risque d'infection.

En 1960, Belding Scribner et Wayne Quinton ont eu l'idée d'utiliser une technique de dérivation⁹⁰⁻⁹². En plaçant des canules en téflon dans la veine et l'artère par voie sous-cutanée, elles ressortent de la peau et permettent la connexion à la machine à dialyse (**Figure 7**).

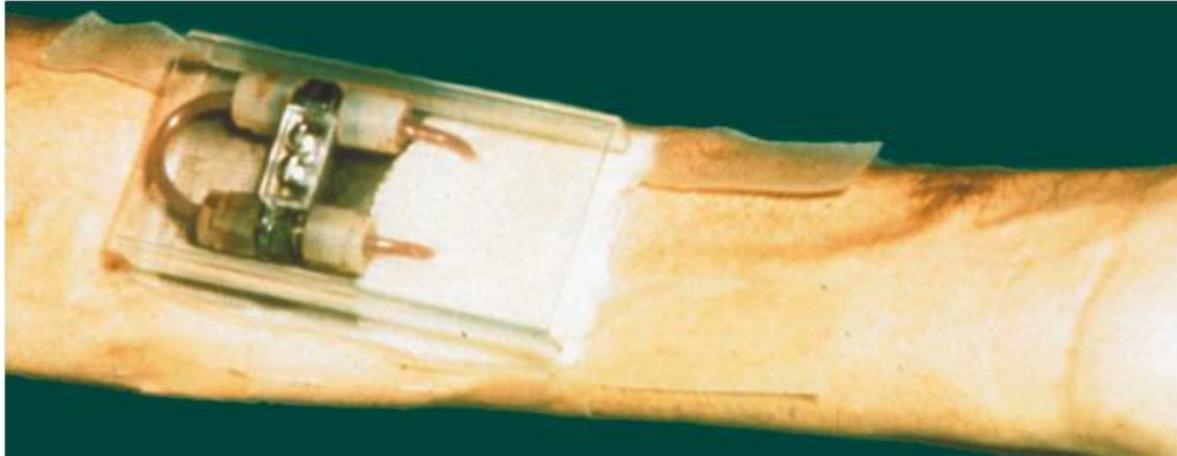


Figure 7 : Dérivation artérioveineuse de Scribner [92].

Celle-ci est formée de canules artérielles et veineuses permanentes en PTFE (in situ pendant 21 jours) avec des raccords et une connexion en U, en PTFE également.

Une fois celle-ci terminée, les canules peuvent être connectées directement comme un pontage artérioveineux. Elles peuvent donc être utilisées à tout moment sans être retirées, évitant les multiples piqûres et diminuant le risque d'infection. Cependant, les canules externes avaient une durée de vie limitée car elles pouvaient se boucher (coagulation), se déloger, mais également s'infecter, un implant transcutané présentant un risque important. Quelques années plus tard, Brescia et Cimino ont créé chirurgicalement une fistule artérioveineuse (FAV) entre l'artère radiale et une veine choisie dans l'avant-bras⁹³.

Un accès vasculaire superficiel, qui peut être ponctionné à répétition, et avec un débit élevé, est nécessaire pour pouvoir hémodialyser un patient⁹⁴. Naturellement, un tel accès n'existe pas et doit donc être créé pour permettre l'hémodialyse. En effet, le débit moyen d'une artère radiale est inférieur à 40 ml/min, là où un débit sanguin minimal compris entre 500 et 600 ml/min est requis afin d'effectuer une hémodialyse en quelques heures⁹⁵⁻⁹⁷.

De nos jours, la FAV, les greffons artérioveineux (GAV) en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) et le cathéter veineux central sont les trois types d'accès vasculaires utilisés pour l'hémodialyse (**Figure 8**)^{10,98}.

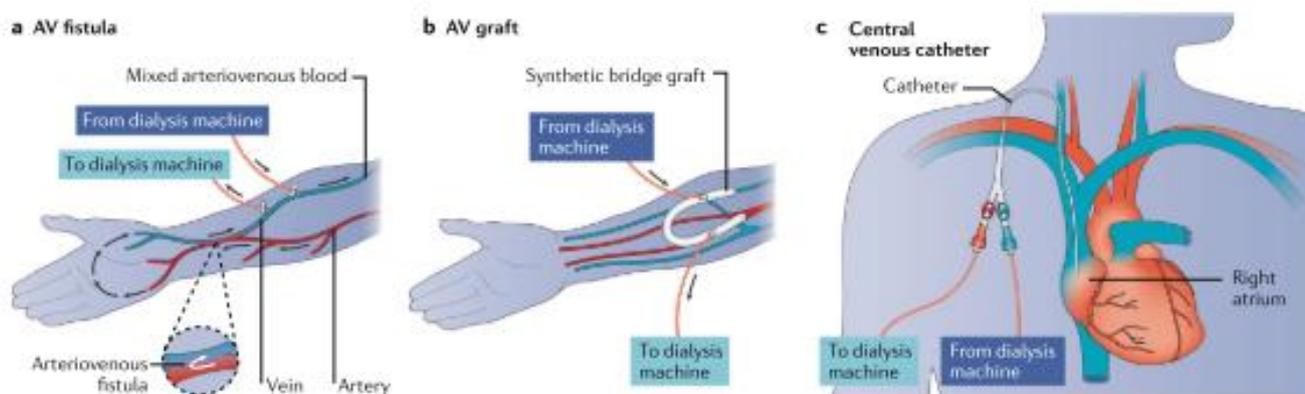


Figure 8 : Accès vasculaires actuels pour l'hémodialyse [98].

La FAV est considérée comme la meilleure option pour l'accès vasculaire selon les directives de la *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*, car elle entraîne moins de complications et donc nécessite moins d'interventions correctives. Cependant, les FAV nécessitent un long temps de maturation afin que le diamètre de la veine s'élargisse et que sa paroi s'épaississe, dans le but d'augmenter le débit sanguin. Or, certains problèmes apparaissent suite à la création d'une FAV et entraînent son échec précoce, comme sa non-maturation généralement causée par une sténose juxta-anastomotique, ou une thrombose⁹⁵. Ainsi, bien qu'il ait été démontré que les FAV durent plus longtemps et sont associées à un coût inférieur à celui des GAV, il est nécessaire de noter le taux d'échec initial plus élevé des FAV par rapport aux GAV, à cause des problèmes de maturation^{99,100}. Cependant, une fois matures, les FAV sont moins sensibles aux infections et ont des perméabilités primaire et secondaire plus élevées^{10,101-103}. La perméabilité primaire définit la perméabilité d'un accès vasculaire jusqu'à un geste de correction ou de désobstruction, alors que la perméabilité secondaire est la perméabilité d'un accès prolongé par ce geste⁴. Le choix et le succès de l'accès vasculaire à court et à long termes dépendent de plusieurs facteurs comme l'âge du patient, ou ses pathologies (p. ex. diabétique ou non). Cependant, la FAV reste le choix premier, devant les GAV puis les cathéters^{95,104,105}.

1.2.3. Autres situations cliniques

Les substituts vasculaires peuvent être utilisés dans d'autres cas que l'athérosclérose ou en tant qu'accès vasculaires pour hémodialyse. Ainsi, d'autres pathologies occlusives peuvent nécessiter la pose d'un implant de pontage comme les thromboses non causées par l'athérosclérose, des embolies ou encore la sténose des artères⁴. Des implants de pontage

peuvent aussi être utilisés dans des cas d'anévrismes, dilatations anormales de la paroi vasculaire pouvant amener à la rupture d'un vaisseau. Ils peuvent aussi être utilisés dans des cas de dissection aortique, phénomène durant lequel l'intima se déchire et provoque l'écoulement du sang dans la media¹⁰⁶. Enfin, bien que moins fréquentes, les implants de pontage sont également utilisés dans des cas de pathologies et maladies vasculaires congénitales, comme la coarctation (sténose de l'aorte) ou la tétralogie de Fallot⁴.

1.3. Substituts vasculaires utilisés en chirurgie vasculaire

Les traitements des maladies cardiovasculaires sont multiples et adaptés à la pathologie. Lorsqu'il est nécessaire de traiter des vaisseaux de petit diamètre endommagés, des traitements endovasculaires comme une angioplastie ou la pose d'un *stent* peuvent être utilisés afin de rouvrir ou de déboucher un vaisseau sténosé ou thrombosé. Cependant, ces traitements sont préférentiellement utilisés chez des patients présentant des comorbidités, alors que l'utilisation d'implants de pontage peut être un traitement de première intention pour une perspective à long terme¹⁻³. Différents types de substituts vasculaires sont disponibles, chacun étant utilisé dans des indications spécifiques, basées notamment sur leurs avantages et leurs inconvénients.

1.3.1. *Substituts biologiques*

1.3.1.1. *Substituts autologues*

Les substituts autologues, vaisseaux prélevés sur le patient lui-même, sont les substituts de référence et considérés comme la meilleure option. Premièrement, leur caractère autologue permet d'éviter un rejet du greffon par le patient. Ensuite, ces vaisseaux ont l'avantage de posséder un endothélium, qui peut être quelque peu endommagé par la transplantation mais qui peut repousser. Enfin, ces vaisseaux sont faits de tissus biologiques non rigides, ce qui permet d'éviter un décalage de rigidité entre deux vaisseaux, permet l'absence de réaction inflammatoire à un corps étranger, et permet la réparation et le remodelage du greffon. Cependant, chez les patients plus âgés la disponibilité de ces vaisseaux est limitée et leur qualité n'est pas toujours garantie, ces vaisseaux pouvant être détériorés par la maladie ou déjà prélevés lors de revascularisations antérieures. Les vaisseaux autologues les plus couramment utilisés sont l'artère thoracique interne (souvent appelée artère mammaire interne) et la veine saphène¹⁰⁷.

L'autogreffe artérielle, et en particulier l'utilisation de l'artère mammaire interne, reste le substitut idéal grâce à ses propriétés mécaniques ainsi que sa capacité de cicatrisation¹⁰⁷. Sa supériorité face à la veine saphène dans certaines indications a été démontrée par plusieurs études dans les années 80^{108,109}. Ainsi, l'équipe de Denis Tyras a mené une étude sur 1522 patients ayant subi un pontage coronarien entre 1972 à 1977, soit avec l'artère mammaire interne (765 patients), soit avec la veine saphène (694 patients). Les résultats ont montré que la perméabilité des implants artériels était significativement supérieure après 5 ans (89 % contre 83 %, respectivement), avec davantage de patients ayant un fonctionnement post-opératoire du ventricule gauche estimé comme normal¹⁰⁸. Quelques années plus tard, l'équipe de Floyd Loop fit une étude sur plusieurs milliers de patients ayant reçu un pontage coronarien fait avec une artère mammaire interne seule, ou en association avec une veine saphène¹⁰⁹. Son équipe a montré la supériorité d'une greffe de l'artère mammaire interne par rapport à la veine saphène dans des cas de lésions de l'artère coronaire antérieure descendante, avec une perméabilité à 10 ans de 93 % et 88 %, respectivement¹⁰⁹. Cependant, l'utilisation des autogreffes artérielles reste limitée du fait du faible nombre de sites de prélèvements. Ainsi, l'autogreffe veineuse et en particulier la veine saphène est le conduit vasculaire le plus utilisé pour effectuer des pontages (hors artère coronaire descendante antérieure gauche)^{107,110}.

Le médecin français Alexis Carrel fut un pionnier dans l'utilisation des veines en tant que substituts vasculaires. En 1906, il démontra qu'en interposant un segment de veine entre deux extrémités d'artères chez le chien, la circulation artérielle était rétablie rapidement et le segment de veine était capable de supporter la pression sanguine¹¹¹. Avant utilisation, la veine prélevée doit être inversée afin de supprimer la fonction des valvules présentes en son sein. Du fait de sa disponibilité par rapport aux autres vaisseaux, de son caractère autologue et de sa rapide réendothélialisation, la veine saphène autologue est un substitut performant quand il s'agit de faire des pontages sur des artères de petit calibre ainsi que dans les membres inférieurs^{112,113}. La greffe veineuse subit un remodelage dès l'implantation afin de s'adapter aux flux hémodynamiques. Cependant, l'augmentation de la pression dans la veine peut contribuer à un remodelage défavorable, pouvant mener à la sténose puis la thrombose du greffon. Ainsi, rapidement après son implantation, la greffe veineuse est souvent associée à des échecs^{110,114-116}.

1.3.1.2. Autres substituts biologiques

Pour pallier au manque de disponibilité des substituts autologues, des stratégies utilisant d'autres substituts biologiques ont été développées. La première stratégie utilise des allogreffes, veineuse ou artérielle. Les allogreffes veineuses sont généralement prélevées sur un cadavre, conservées dans une solution de chlorure de sodium couplée à des antibiotiques et antifongiques, puis conservées entre +2 et +8 °C¹⁰⁷. Ces substituts allogéniques ont une perméabilité satisfaisante lorsqu'ils sont utilisés en implants de pontage dans les membres inférieurs (perméabilité primaire de 27 % à 47 %, selon les études), mais reste bien moins performants que l'autogreffe veineuse^{117,118}. L'allogreffe artérielle a également été développée et étudiée¹¹⁹. Prélevée sur un donneur en état de mort cérébrale, le greffon est ensuite immergé dans une solution de cryopréservation puis congelé et conservé dans de l'azote¹⁰⁷. Cependant, l'utilisation de ces substituts a rapidement été abandonnée, notamment à cause de mauvaises méthodes de conservation et de phénomènes de rejets importants de ce types d'implants, notamment chez les enfants¹²⁰⁻¹²³.

Une autre stratégie est l'utilisation d'hétérogreffes bovines, artères carotides de bœuf ou de veau. Une fois prélevée, l'artère est traitée au glutaraldéhyde afin de préserver le tissu en fixant les protéines. La fixation permet d'améliorer la stabilité structurale en rendant la MEC méconnaissable pour les enzymes, ralentissant ainsi la dégradation de l'implant¹²⁴. Ce traitement permet aussi de masquer les antigènes, évitant ainsi le rejet, mais causant une réaction à un corps étranger. Les résultats de l'utilisation de cette stratégie s'avèrent cependant bien inférieurs à ceux des veines autologues, rendant les hétérogreffes fixées peu utilisées de nos jours par les chirurgiens¹¹. Quand elles le sont, c'est surtout dans des cas d'infections¹²⁵.

La veine ombilicale humaine, quant à elle, provient de la veine du cordon ombilical des nouveau-nés. Également traité au glutaraldéhyde, ce substitut a démontré une perméabilité primaire satisfaisante lorsqu'il est utilisé dans les membres inférieurs, bien qu'une des complications majeures soit sa dilatation pouvant évoluer vers des anévrismes¹²⁶⁻¹²⁸. Ce phénomène de dilatation pourrait être dû à la trop faible résistance mécanique des veines ombilicales humaines¹²⁹.

1.3.2. Substituts synthétiques non dégradables

1.3.2.1. Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE ou Gore-Tex®) est utilisé pour produire des prothèses vasculaires utilisables cliniquement depuis le début des années 1970 (**Figure 9**)¹³⁰.

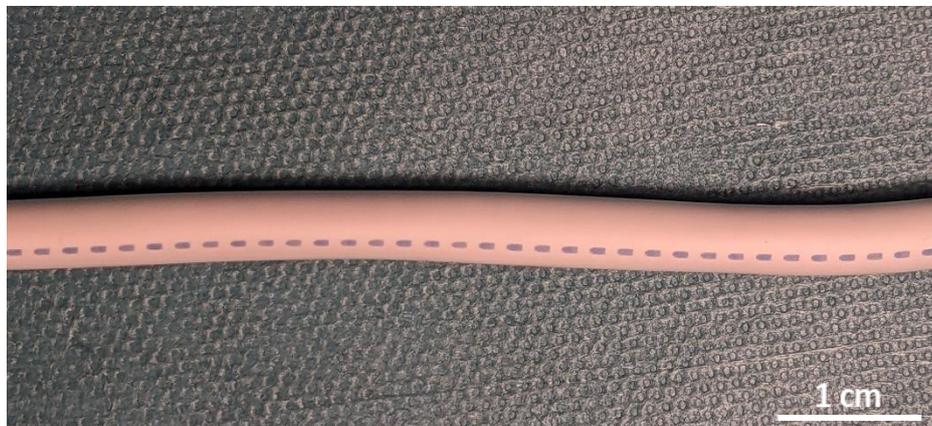


Figure 9 : Substitut vasculaire en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE).

Le ePTFE est produit à partir de l'étirement du PTFE, polymère linéaire duquel en résulte alors une structure microporeuse avec une forte résistance mécanique. Le ePTFE est caractérisé par des nœuds de PTFE interconnectés par des fibrilles de PTFE, flexibles et fines¹³¹. Des modifications peuvent être apportées à la structure du ePTFE afin de l'améliorer ou de lui donner certaines propriétés. Entre autres, la fixation d'héparine sur sa surface luminale permet d'augmenter la perméabilité des substituts et la fixation d'anneaux sur la surface externe permet d'éviter le phénomène de plicature¹³². Aussi, dans un contexte d'accès vasculaire pour hémodialyse, les conditions hémodynamiques au niveau de l'anastomose peuvent être améliorées par la création d'une collerette distale ayant une géométrie optimisée^{107,133,134}.

1.3.2.2. Polytétrafluoroéthylène expansé (PET)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (PET ou Dacron®) est un polyester thermoplastique utilisé sous forme de fibres. L'association de ces fibres en multifilaments permet notamment la production de prothèses vasculaires par assemblage textile (p. ex. tissage ou tricotage)^{135,136}. Le cosselage (forme « accordéon ») de ces prothèses permet d'améliorer la compliance longitudinale et d'éviter le phénomène de plicature (**Figure 10**).

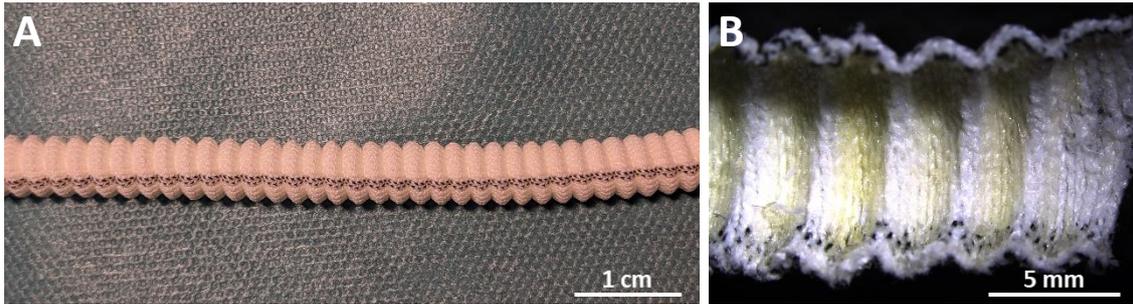


Figure 10 : *Substitut vasculaire en polytéraphthalate d'éthylène (PET).*

(A) *Vue macroscopique de la prothèse et (B) vue rapprochée d'une coupe longitudinale permettant de voir la lumière du substitut.*

La perméabilité transmurale des prothèses tricotées est inhérente à cette méthode d'assemblage. Dès lors, afin de réduire cette perméabilité, les substituts vasculaires en PET étaient trempés dans du sang avant implantation afin que ce dernier coagule et scelle les pores du greffon¹³⁷. Cependant, cette stratégie demandait des étapes supplémentaires en salle de chirurgie et n'était pas suffisante pour une utilisation chez des patients héparinés. De nouvelles stratégies d'imperméabilisation transmurale appliquées sur les greffons lors de leur fabrication ont ainsi vu le jour, comme l'imprégnation des substituts avec du collagène, de l'albumine ou de la gélatine¹³⁷⁻¹³⁹.

1.3.3. *Indications et performances des substituts actuels*

Comme énoncé précédemment, dans le cas d'obstructions partielles ou totales de vaisseaux, des techniques endovasculaires comme l'angioplastie ou le recours à un *stent* vont être privilégiées afin de rendre le vaisseau de nouveau perméable. En effet, ces techniques sont moins invasives pour le patient que la pose d'un implant de pontage. Cependant, suite à l'échec des stratégies précédemment mentionnées ou dans des cas où la zone pathologique est trop étendue, le recours à un implant de pontage est préférable^{1,2,6}.

Le choix du substitut vasculaire utilisé varie en fonction de l'indication et de la taille du vaisseau lésé. Dans le cas des vaisseaux de grand diamètre (> 8 mm), comme l'aorte par exemple, l'utilisation de substituts synthétiques a démontré de bonnes performances en termes de perméabilité (90 % à 5 ans)¹⁴⁰. De plus, l'absence de disponibilité de vaisseaux autologues de tels diamètres fait de l'utilisation des substituts vasculaires synthétiques un choix unique.

Dans le cas des vaisseaux aux diamètres moyens (compris en 6 et 8 mm), notamment dans le cas de pontages au-dessus des genoux au niveau de l'artère fémorale, plusieurs études et revues ont montré la supériorité de l'utilisation d'une veine autologue par rapport aux substituts synthétiques^{4,14-16}. Cependant, dans le cas où une veine autologue n'est pas disponible, les implants synthétiques sont considérés comme une bonne alternative¹⁴. Parmi ces derniers, une meilleure perméabilité primaire à 5 ans des greffons en PET par rapport aux greffons en ePTFE a été démontrée dans une étude multicentrique randomisée menée sur 228 patients entre 1992 et 1996 (53 % contre 36 %, respectivement)¹⁴¹.

Dans le cas des vaisseaux de petit diamètre (< 6 mm), il a été montré que les substituts autologues avaient une perméabilité primaire à 3 ans et à 5 ans supérieure à celle des implants synthétiques (68 % contre 35 %, et 47 % contre 31 %, respectivement)¹⁴²⁻¹⁴⁴. La littérature n'a pas rapporté de supériorité des prothèses de petit diamètre en PET par rapport à celles en ePTFE, contrairement aux prothèses de diamètres moyens^{9,145}.

Chez les patients atteints de pathologies rénales nécessitant une hémodialyse et donc un accès vasculaire, la création d'une FAV est la recommandation première¹⁴⁶. Cependant, en cas d'échec de maturation de la FAV ou quand sa création est impossible, l'utilisation d'un implant pour créer un accès vasculaire est nécessaire^{4,5}. Les implants utilisés sont principalement en ePTFE mais aussi en polyuréthane ou en polyester. Les implants synthétiques en ePTFE permettent une hospitalisation plus courte des patients ainsi qu'une ponction plus rapide post-intervention par rapport aux FAV¹⁴⁷. Cependant, les greffons en ePTFE entraînent davantage de complications que les FAV (2,7 interventions/patient/année contre 1,6 interventions/patient/année, respectivement) selon une étude multicentrique randomisée menée sur 105 patients aux Pays-Bas¹⁴⁸. D'ailleurs, la perméabilité primaire à 1 an des implants en ePTFE est inférieure à celle des FAV (22 % et 46 %, respectivement)¹⁴⁸. Aussi, après quelques mois, l'apparition d'hyperplasie intimale peut provoquer des sténoses et des thrombus, et ces implants synthétiques soumis à des ponctions répétées sont sujets aux infections⁴.

1.3.4. *Phénomènes d'échecs et recherche de solutions*

Les phénomènes majeures responsables de l'échec des substituts vasculaires sont la thrombose, l'hyperplasie intimale, pouvant notamment être causée par la rigidité des substituts, et les infections.

Comme discuté précédemment, les cellules endothéliales ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie vasculaire ainsi que dans les processus physiologiques et physiopathologiques¹⁴⁹. Ainsi, la formation d'un endothélium dans la lumière d'un substitut vasculaire est considérée comme prépondérante afin d'éviter des phénomènes adverses, comme une cascade de coagulation ou le développement d'hyperplasie intimale, cette dernière pouvant mener à des épisodes de thrombose. Trois mécanismes ont été identifiés comme pouvant expliquer la formation d'un endothélium dans un substitut vasculaire *in vivo* (**Figure 11**)¹⁵⁰.

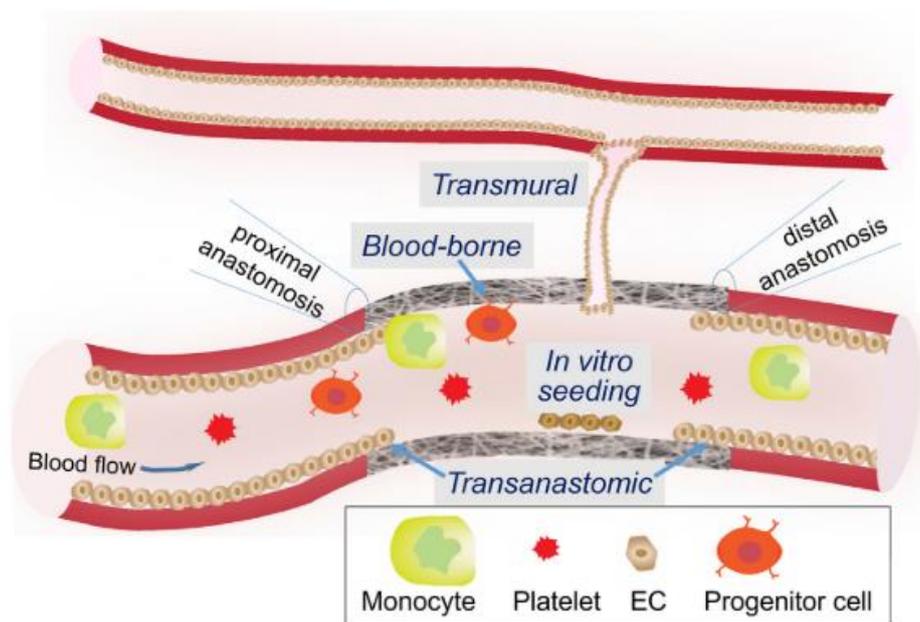


Figure 11 : Mécanismes possibles de l'endothélialisation des greffons vasculaires [150].

Le premier mécanisme d'endothélialisation serait la croissance transanastomotique, définie par une migration des cellules endothéliales du vaisseau natif vers l'implant au niveau des anastomoses. Il faut noter que le mécanisme a été décrit comme efficace sur une longueur d'un centimètre maximum, ce qui le rendrait inefficace pour l'endothélialisation de substituts de quelques dizaines de centimètres^{151,152}. Cependant, ce mécanisme a été décrit sur la croissance de cellules à la surface de prothèses synthétiques, et les distances de migration possibles sur des substrats naturels restent inconnues. Le second mécanisme considéré est la croissance transmurale, par lequel des cellules et des vaisseaux s'infiltrent à partir de tissus adjacents¹⁵³. Enfin, le troisième mécanisme d'endothélialisation *in vivo* proposé repose sur les

cellules circulantes du sang ayant une capacité de différenciation en cellules progénitrices endothéliales¹⁵¹. Ainsi, plusieurs groupes ont développé des stratégies de modifications de surface afin d'accroître la rétention, la migration et la différenciation des cellules d'intérêt. De manière non exhaustive, nous pouvons citer le travail de Rotmans *et al.* dans lequel des implants en ePTFE ont un revêtement fonctionnalisé avec des anticorps anti-CD34, antigène exprimé par les cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse¹⁵⁴. Suite à l'implantation de ces substituts chez le porc en tant que pontages artérioveineux, le groupe a démontré une endothélialisation significativement plus importante après trois jours pour les greffons fonctionnalisés. Cependant, les résultats montrent aussi une hyperplasie intimale à l'anastomose avec la veine significativement plus grande après 28 jours¹⁵⁴. Un autre groupe a ensemencé des greffons en polyester avec des cellules de moelle osseuse CD34-positives. Ils ont montré qu'après 4 semaines d'implantation dans l'aorte thoracique d'un modèle canin, l'endothélialisation était plus importante que dans les greffons non-ensemencés¹⁵⁵. Le peptide P15 a également été démontré comme une molécule pouvant promouvoir l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales sur l'intima de vaisseaux en ePTFE¹⁵⁶. Implantés chez le mouton en tant que pontages artérioveineux, des greffons traités au peptide P15 ont démontré une plus grande endothélialisation, ainsi qu'une hyperplasie intimale significativement réduite à l'anastomose avec la veine par rapport aux contrôles non traités après 28 jours. Une autre stratégie étudiée a été d'ensemencer des cellules endothéliales autologues directement dans la lumière de prothèses en PET ou ePTFE avant implantation dans un modèle canin, avec une longue étape de culture afin d'obtenir la confluence des cellules^{157,158}. Les résultats ont montré une réduction du nombre d'accidents thrombotiques dans les greffons fonctionnalisés par rapport aux contrôles à 6 semaines (perméabilité de 100 % contre 70 %, respectivement)¹⁵⁷. Chez l'humain, une perméabilité primaire à 9 ans de 65 % pour des prothèses endothélialisées a été rapportée, contre 16 % pour des prothèses non-endothélialisées^{159,160}. Cependant, bien que cette stratégie ait été montrée comme performante, elle n'est pas plus utilisée pour plusieurs raisons. L'une d'elles est que leur performance n'a pas été prouvée comme égalant, au moins, celle de la veine saphène, qui est facilement accessible. Une autre raison est le temps nécessaire à l'endothélialisation des prothèses. Environ un mois est nécessaire entre l'excision de la veine pour récupérer les cellules endothéliales autologues, et l'implantation du greffon synthétique endothélialisé¹⁶⁰. Enfin, obtenir la confluence des cellules endothéliales autologues est une autre limite, avec

environ un tiers des cultures qui échouent à croître^{159,160}. Le recouvrement de surface des prothèses synthétiques par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor* (VEGF)), le facteur 1 dérivé des cellules stromales, l'héparine et le CD47, parmi d'autres, sont autant des pistes qui ont été étudiées afin d'améliorer l'endothélialisation des substituts en ePTFE et leurs propriétés antithrombotiques et anti-inflammatoires¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Pour l'instant, la fonctionnalisation à l'héparine est la plus avancée, et des greffons en ePTFE héparinés ont été étudiés et sont disponibles dans le commerce^{165,166}.

Les propriétés mécaniques d'un greffon vasculaire sont un autre facteur décrit comme influençant grandement la perméabilité des prothèses. En effet, des revues de la littérature ont déjà montré le lien étroit entre la perméabilité des greffons vasculaires et leur compliance^{25,26}. Ainsi, plus un substitut vasculaire a une compliance élevée – qui se rapproche de celle des vaisseaux natifs –, plus ses performances à long terme sont bonnes^{27,28}. Ce manque de perméabilité à long terme est notamment lié au développement d'hyperplasie intimale, accumulation anormale de cellules au niveau de la tunique interne des vaisseaux sanguins. Ce développement se fait généralement au niveau des anastomoses d'un greffon avec l'artère, et est lié à une différence de diamètre et/ou de compliance entre le substitut et le vaisseau natif^{30,31}. De ce fait, le flux sanguin s'en retrouve affecté et la distribution des contraintes de cisaillement sur la paroi est perturbée. Certains groupes ont utilisé de techniques afin d'essayer d'améliorer la compliance de substituts synthétiques. Ainsi, Gupta et Kasyanov ont tissé une prothèse à l'aide de fils de polyuréthane, au module d'élasticité faible, et de fils de polyester, au module d'élasticité élevé¹⁶⁷. Ils ont montré que la compliance de leur substitut tissé était comparable à celle de l'artère carotide humaine *in vitro*. Huit greffons ont été implantés chez 8 chiens (4 dans l'artère carotide, 4 dans l'artère fémorale). Après 6 mois, les analyses ont montré que le rapport d'étirement circonférentiel des greffons avait diminué d'environ un facteur 4 par rapport aux valeurs obtenues *in vitro*¹⁶⁷.

Une autre cause d'échec rare des substituts vasculaires mais aux conséquences sérieuses, particulièrement rencontrée chez les greffons synthétiques, est leur taux d'infection¹⁰. Ce phénomène prend place le plus souvent dans un contexte d'hémodialyse, où les patients ont un accès vasculaire qui est ponctionné plusieurs fois par semaine pendant des mois voire des années, afin de filtrer le sang^{95,168,169}. En effet, une étude comparative menée sur 212 patients pendant environ 2 ans a montré que les fistules artérioveineuses étaient bien

moins sujettes aux infections que les greffons artérioveineux synthétiques utilisés comme accès vasculaires (4 % contre 13 %, respectivement)¹⁷⁰. Une étude récente menée sur 355 patients pendant 2 ans a montré que les greffons biologiques étaient moins sujets aux infections que les prothèses synthétiques (taux d'infection de 0,9 % contre 4,5 %, respectivement)¹⁷¹. Bien que des prothèses imprégnées d'argent puissent être utilisées pour réduire les infections, les résultats des études menées à ce jour sont hétérogènes et contradictoires, et leur avantage n'a pas été clairement démontré lors d'études cliniques^{172,173}. Une des options étudiée est d'imprégner les prothèses d'antibiotiques, comme la gentamicine^{174,175}. Cependant, ces options nécessitent davantage de développement. En effet, une étude a montré que des substituts de PET imprégnés de gentamicine et implantés infectés dans un modèle porcin, l'étaient toujours après une semaine¹⁷⁶.

Dès lors, en dépit des solutions mentionnées précédemment, aucun substitut n'est aussi efficace à long terme que les greffons autologues afin d'effectuer des pontages de petit diamètre (< 6 mm) ou de créer des abords vasculaires pour les patients hémodialysés. Les propriétés biologiques et mécaniques *a priori* nécessaires au succès à long terme d'un greffon, et décrites dans la partie suivante, ne sont aujourd'hui pas réunies au sein d'un même substitut proposé.

1.3.5. *Substitut vasculaire idéal*

Le substitut vasculaire idéal, qui pourrait être fonctionnel à long terme une fois implanté, doit avoir des propriétés spécifiques, tant biologiques que mécaniques.

Du point de vue biologique, l'intégration du greffon par l'hôte doit être favorisée par un remodelage du substitut, sans créer de réaction à un corps étranger ou de rejet. Pour des utilisations pédiatriques, le greffon doit pouvoir croître avec l'hôte. De plus, le substitut doit avoir des propriétés qui sont non thrombogènes et qui limitent la formation d'hyperplasie intimale. Cela peut signifier avoir un endothélium fonctionnel pré-implantation ou favoriser la formation rapide d'un endothélium fonctionnel une fois implanté. Enfin, le caractère biologique du greffon doit limiter des infections.

D'un point de vue mécanique, les propriétés indispensables d'un substitut sont une résistance à l'éclatement et une rétention à la suture suffisantes afin de résister aux pressions sanguines et de pouvoir être suturé avec succès lors de la chirurgie. Les valeurs minimales

prises en référence sont les valeurs de la veine saphène native avec une pression à l'éclatement de 2480 mmHg et une rétention à la suture de 1,8 N^{177,178}. Une faible perméabilité transmurale est également requise afin d'éviter des fuites de sang lors de l'implantation. Certaines propriétés sont souhaitables mais non indispensables à l'implantation. Ainsi, comme décrit précédemment, une compliance proche des vaisseaux natifs, et en particulier de l'artère thoracique interne (11,5 %/100 mmHg), pourrait augmenter les chances d'une perméabilité à long terme^{25-29,179}.

Également, les substituts vasculaires doivent pouvoir être stérilisables sans que ce traitement n'entraîne une perte de force mécanique ou une altération des propriétés biologiques. De plus, ils doivent pouvoir être produits en quantité et à moindre coût pour permettre une mise sur le marché et un accès au patient facilités. Enfin, leur manipulation doit être aisée pour les chirurgiens qui doit avoir la possibilité de l'ajuster (p. ex. le couper à une longueur désirée ou anguler les extrémités). Idéalement, le greffon ne doit pas non plus être sujet au phénomène de plicature qui pourrait entraver la bonne circulation du sang. Enfin, le substitut vasculaire idéal doit être prêt à l'emploi pour le chirurgien.

2. INGÉNIERIE TISSULAIRE ET SUBSTITUTS VASCULAIRES

2.1. Approche de l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire combine les principes ainsi que les techniques de plusieurs disciplines incluant la biologie, la médecine et l'ingénierie, afin de réparer ou de régénérer des tissus ou des organes lésés^{180,181}. Pour ce faire, trois éléments sont généralement associés : un échafaudage, naturel ou synthétique, des cellules et des biomolécules (facteurs de croissance, cytokines, etc.).

L'ingénierie tissulaire s'est montrée prometteuse afin de réparer ou de créer des tissus ces dernières dizaines d'années, et en particulier pour créer des substituts vasculaires. En 1986, Weinberg et Bell, avec leurs travaux sur la création du premier substitut vasculaire fait à base de collagène, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes, ont ouvert la voie de l'ingénierie tissulaire vasculaire¹⁸². Trois approches différentes peuvent être décrites en ingénierie tissulaire vasculaire: les approches *in vitro*, *in vivo* et *in situ* (**Figure 12**)¹⁸³.

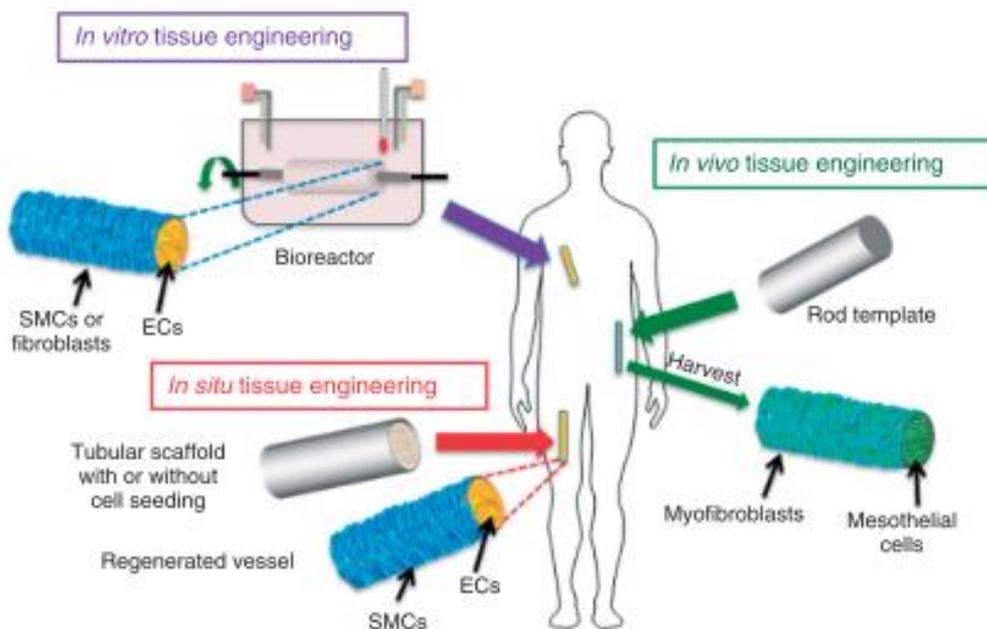


Figure 12 : Illustration des différentes stratégies en ingénierie tissulaire vasculaire [183].

L'approche traditionnelle est l'approche *in vitro*, dans laquelle des substituts vasculaires sont construits en dehors du corps, à partir d'échafaudages et de cellules, potentiellement en utilisant des bioréacteurs. Dans l'approche *in vivo*, le corps humain est utilisé en tant que

bioréacteur afin de créer un greffon autologue directement chez le patient en profitant de la réaction à un corps étranger¹⁸⁴. Enfin, dans l'approche *in situ*, la stratégie vise à implanter un échafaudage chez l'hôte et à tirer parti de la capacité des cellules de l'hôte à régénérer un vaisseau sanguin à partir de ce dernier.

2.2. Différentes stratégies en ingénierie tissulaire vasculaire

2.2.1. *In vitro*

L'approche traditionnelle en ingénierie tissulaire vasculaire est l'approche *in vitro*, dans laquelle l'idée est de produire un substitut vasculaire fonctionnel en dehors du corps et prêt à être implanté. Cette approche regroupe différentes stratégies qui se différencient notamment par l'utilisation de différents types de cellules, avec ou sans échafaudages, qui peuvent être biologiques ou synthétiques¹⁸³. En 1986, Weinberg et Bell furent les premiers à produire un substitut vasculaire biologique vivant issu de l'ingénierie tissulaire (**Figure 13**)¹⁸².



Figure 13 : Premier substitut vasculaire biologique issu de l'ingénierie tissulaire et développé par Weinberg et Bell en 1986 [182].

Pour ce faire, ils ont utilisé des gels de collagène associés à des CML, des fibroblastes et des cellules endothéliales bovines. Cependant, la limite de ce modèle portait sur la faible résistance mécanique du substitut produit, même après avoir ajouté un renfort fait d'un maillage en PET (pression à l'éclatement de 323 mmHg)¹⁸². Dans la lignée du travail de Weinberg et Bell, d'autres équipes ont utilisé des gels de collagène afin de produire de nouveaux substituts vasculaires, mais chacune a fait face aux limites de la résistance mécanique du vaisseau produit¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

2.2.1.1. Sans échafaudage biologique exogène

Le premier greffon entièrement biologique, produit sans échafaudage biologique exogène fut produit par L'Heureux et son équipe il y a 25 ans (**Figure 14**)¹⁸⁹. Pour dépasser les limites de la faiblesse mécanique des gels de collagène, L'Heureux a mis au point une technique de production de feuillets de **Matrice extracellulaire Assemblée par les Cellules (MAC)**, *in vitro*^{189,190}. L'approche reposait sur la culture de CML vasculaires humaines issues de veines de cordons ombilicaux, ainsi que de fibroblastes issus de biopsies de peau adulte humaine. Cultivées avec de l'ascorbate afin de stimuler la sécrétion de MEC, les cellules produisaient ainsi un feuillet de MAC dans des flasques de culture de 75 cm² en quelques semaines. La production du substitut vasculaire reposait sur plusieurs étapes séquentielles. La première est l'enroulement d'un feuillet de MAC issu de fibroblastes autour d'un mandrin en PTFE d'un diamètre externe de 3 mm afin de créer un tube. Après maturation pour fusion, puis séchage, une membrane interne acellulaire était ainsi créée. Afin de produire la media des vaisseaux sanguins, un feuillet de CML était enroulé autour du précédent et l'ensemble était mis dans un bioréacteur. Après une période d'une semaine, un feuillet de fibroblastes était enroulé autour de l'ensemble afin de créer l'adventice de substitut. Finalement, après 8 semaines de maturation en bioréacteur, le mandrin interne fut retiré et les vaisseaux produits ont été soit testés mécaniquement, soit des cellules endothéliales ont étéensemencées pour tapisser la lumière du vaisseau. Généralement, la production de ces vaisseaux nécessitait 3 mois de culture entre la formation des feuillets, la maturation en bioréacteur et la croissance des cellules endothéliales. Macroscopiquement, le substitut vasculaire ainsi produit avait un aspect tubulaire homogène proche d'une artère humaine native. Histologiquement, l'adventice était alors composée de collagène dense, de fibroblastes exprimant la vimentine, ainsi que d'élastine, synthétisée par les fibroblastes. La media contenait des CML allongées, bien qu'en densité bien inférieure à celle de la media vasculaire native. Enfin, l'intima était faite de cellules endothéliales confluentes. D'un point de vue mécanique, il a été démontré qu'une plus longue période de culture des feuillets augmentait l'épaisseur de la paroi ainsi que la pression à l'éclatement des greffons vasculaires produits. Finalement, les vaisseaux produits ont démontré une pression à l'éclatement sensiblement similaire à celle de la veine saphène humaine (2594 mmHg contre 2480 mmHg, respectivement), considérée actuellement comme la référence pour la reconstruction vasculaire dans les membres inférieurs, notamment^{178,189}. Des analyses morphométriques et par microscopie électronique

à balayage ont également démontré une inhibition de l'adhésion plaquettaire dans les substituts endothélialisés. Enfin, une implantation de ces substituts pendant 7 jours chez le chien a mis en évidence une absence de thrombus et de dégradation, bien qu'un faible taux de perméabilité fût obtenu (50 %, 3 greffons sur 6), vraisemblablement dû au caractère xénogénique de l'implant, à leur non-endothélialisation (pour éviter un rejet aigu), ainsi qu'au caractère thrombogène du collagène. Il a également été observé une pénétration du sang à travers les couches de feuillets, mettant potentiellement en avant une fusion insuffisante des différentes couches. En résumé, cette étude a permis de mettre en évidence la possibilité de produire un substitut vasculaire entièrement biologique, issu de l'ingénierie tissulaire et produit par des cellules humaines. De plus, ce substitut possédait une résistance mécanique suffisante pour être implanté. La MEC synthétisée par les cellules *in vitro* semble être plus résistante à l'activité protéolytique que la MEC extraite biochimiquement et reformée, possiblement car la MAC induit une moindre expression de la collagénase¹⁸⁹. Enfin, ce travail a pour la première fois mis en évidence la présence de fibres élastiques dans un substitut issu de l'ingénierie tissulaire. Bien que le substitut créé avait une résistance mécanique requise pour une implantation en tant que greffon vasculaire, il nécessitait des temps de production longs, limite à une translation vers la clinique.



Figure 14 : Substitut vasculaire développé par le groupe de L'Heureux [191].

Quelques années plus tard, L'Heureux et son équipe ont proposé un modèle simplifié de leur substitut vasculaire. Ainsi, partant de l'hypothèse que la présence initiale de CML n'apporte pas d'avantages justifiant les complications associées à l'utilisation d'un second type cellulaire, L'Heureux a proposé de retirer les feuillets de CML de son modèle, correspondant à la media des vaisseaux dans le précédent¹⁹¹. Dès lors, ce nouveau substitut était fait à partir de feuillets de MAC produits par des fibroblastes cultivés pendant 8 semaines

et enroulés sur trois révolutions autour d'un mandrin couvert de PTFE. Après 10 semaines de maturation nécessaires à la fusion des couches qui forment un cylindre homogène, le tissu était déshydraté et un nouveau feuillet était enroulé autour de ce dernier pour former l'adventice. Le mandrin fut retiré après une seconde phase de maturation, et les cellules endothélialesensemencées dans la lumière du vaisseau formé. Le substitut humain (4,2 mm de diamètre interne, 6 cm de long) a d'abord été implanté à court terme dans un modèle canin immunosupprimé afin de confirmer que sa pression à l'éclatement ainsi que sa rétention à la suture étaient suffisantes pour être implanté¹⁹¹. Les substituts ont ensuite été implantés chez le rat *nude* en tant que greffon aortique abdominal interposé (1,5 mm de diamètre interne, 7 mm de long). La perméabilité des greffons explantés jusqu'à 225 jours était de 85 % ($n = 27$) alors qu'aucun traitement antiplaquettaire post-chirurgical n'a été utilisé, confirmant l'antithrombogénicité des substituts implantés. A 90 jours post-implantation, les analyses histologiques ont montré une intégration du tissu ainsi qu'une présence importante de *vasa vasorum*, essentiels à la vascularisation de la paroi vasculaire⁴⁹. Les auteurs ont mis en évidence la présence d'une néomédia riche en CML positives à l'alpha actine des muscles lisses (*alpha smooth muscle actin* (α -SMA)), en fibres de collagène et en fibres élastiques, tout en étant couverte par un endothélium confluent¹⁹¹. Le diamètre ainsi que l'épaisseur du greffon n'ont pas évolué entre 90 et 180 jours, mettant en évidence la stabilité de ce dernier. De plus, la diminution du nombre de protéoglycanes au cours du temps suggère un mécanisme de remodelage du tissu vers une forme plus mature et, possiblement, stable.

Afin d'étudier le substitut dans un environnement biomécanique et pré-clinique davantage pertinent, une implantation a ensuite été faite chez le primate immunosupprimé en tant que greffon artériel interposé (4,2 mm de diamètre interne, 3 cm de long, $n = 3$). Lors de l'explantation à 6 et 8 semaines, les trois implants étaient perméables. Les analyses histologiques ont permis de mettre en évidence ce qui avait été observé chez le rat, à savoir la formation de *vasa vasorum*, la réendothélialisation de la membrane interne ainsi que la présence de CML positives à l' α -SMA. Cependant, il est à noter la présence d'une réaction immunitaire au tissu xénogénique, attendue dans un tel contexte d'implantation. Ce travail a mené à l'étude de ces substituts dans un essai clinique de Phase I/II (Identifiant de l'étude clinique : NCT00850252). Des greffons vasculaires autologues ont été produits et implantés en tant qu'accès vasculaire artérioveineux chez dix patients atteints d'insuffisance rénale

chronique de stade terminal^{33,192,193}. Les substituts ont été produits à partir de cellules de chaque patient, dont l'âge variait de 29 à 89 ans. La caractérisation mécanique de ces vaisseaux autologues a confirmé une force à l'éclatement suffisante pour une implantation (pression à l'éclatement moyenne de 3512 mmHg), supérieure à celle des veines et proche de celles des artères natives¹⁷⁹. Les greffons implantés avaient un diamètre interne de 4,8 mm et allaient de 14 à 40 cm de longueur. Après une période de trois mois de maturation *in vivo*, les greffons ont été ponctionnés plusieurs fois par semaine afin de permettre l'hémodialyse chez les patients, démontrant ainsi leur fonctionnalité en tant qu'accès vasculaire artérioveineux. A 1 mois et 6 mois post-implantation, la perméabilité primaire des greffons était de 78 % et 60 %, respectivement. Plus récemment, de nouveaux résultats encourageants ont été publiés et démontrent une perméabilité secondaire de 86 % à 12 mois¹⁸. Cependant, une des limites de cette approche reste le temps de production, de 7 à 8 mois en moyenne, nécessaire suite au prélèvement des cellules du patient. En effectuant une biopsie du patient pour obtenir des cellules autologues seulement dès que le besoin se manifeste, le substitut ne peut alors pas être disponible immédiatement, dans des cas de besoin de revascularisation d'urgence.

Afin de dépasser cette limite de disponibilité, L'Heureux et son équipe ont alors décidé de mettre au point des substituts vasculaires dévitalisés. Ainsi, les vaisseaux ont été séchés, stockés à -80 °C puis réhydratés juste avant endothélialisation puis implantation. Cet enchaînement d'étapes a permis de mettre au point un conduit vasculaire non vivant, qui peut être produit à partir des cellules d'un patient en amont d'un éventuel besoin. Les analyses mécaniques ont permis de mettre en évidence l'absence d'influence du procédé de congélation sur les propriétés mécaniques du substitut. Ce dernier présentait alors une pression à l'éclatement de 6407 mmHg, une rétention à la suture de 2,6 N ainsi qu'une compliance de 3,1 %/100 mmHg. Les résultats de la première implantation d'un tel greffon ont été publiés en 2011³⁴. Utilisé comme pontage artérioveineux chez un patient dépendant de l'hémodialyse, le greffon de 25 cm était perméable et fonctionnel 8 semaines après l'implantation. Plus généralement, L'Heureux et son équipe ont démontré que les propriétés mécaniques et l'organisation biologique de leurs feuillets de MAC n'étaient pas affectées par le processus de dévitalisation¹⁹⁴.

L'utilisation d'une stratégie autologue peut être un frein à la translation clinique et commerciale de la recherche. En effet, la commercialisation d'un tel substitut nécessiterait le

prélèvement de cellules chez des patients, afin de leur donner accès à un vaisseau autologue environ 8 mois plus tard¹⁹⁵. De plus, le contexte réglementaire autour des thérapies basées sur l'utilisation de cellules autologues est contraignant et rend la translation complexe et coûteuse¹⁹⁶. Pour essayer de s'affranchir de cette limite de disponibilité immédiate, L'Heureux et son équipe ont produit des greffons allogéniques et dévitalisés^{32,197}. Le caractère allogénique permet l'utilisation de cellules de toute personne afin de produire un greffon pour l'espèce humaine. Ici, des fibroblastes sont utilisés pour produire les feuillets de MAC, ensuite utilisés pour la production des vaisseaux. Les fibroblastes n'expriment pas d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui devrait en théorie éviter une activation des lymphocytes T^{198,199}. Ainsi, l'hypothèse du groupe est que, grâce au faible caractère antigénique des fibroblastes, un implant allogénique ne provoquerait pas de rejet immunitaire sévère de l'hôte. Le groupe a publié les résultats de la première utilisation clinique d'un substitut vasculaire allogénique humain, issu de l'ingénierie tissulaire, entièrement biologique et non vivant³². Les substituts ont été conservés à -80 °C pendant 9 mois sans perte de force mécanique. Environ 6 mois après avoir été implantés en tant que pontage artérioveineux chez trois patients, les greffons n'ont montré aucun signe de dégradation. De plus, il n'y a pas eu de réponse immunitaire mise en évidence, confirmant l'absence de rejet de ces greffons allogéniques par l'hôte.

Bien que les résultats des travaux de L'Heureux et son équipe soient prometteurs, il n'en reste pas moins que la maturation des vaisseaux roulés est longue et coûteuse. De plus, la complexe fusion des feuillets ainsi que la structure laminée peuvent être source de délamination. Aussi, la méthode de production de ces vaisseaux n'est pas facilement automatisable. Pour toutes ces raisons, le groupe s'est tourné durant la dernière décennie vers l'utilisation d'une technique d'assemblage textile^{200,201}. En effet, ils ont montré qu'il est possible de découper les feuillets de MAC en rubans de quelques millimètres de largeur, et de les utiliser comme tels ou sous forme de fils. De cette manière, des vaisseaux sanguins de différents diamètres peuvent être tissés, avec une pression à l'éclatement et une rétention à la suture nettement supérieures à celles des vaisseaux natifs (5968 mmHg et 5,6 N, respectivement)²⁰¹. A partir de feuillets de MAC, il est alors possible de produire un substitut vasculaire biologique tissé en seulement quelques jours. Une preuve de concept a été effectuée en implantant pendant 24 heures un substitut fait à partir de feuillets de MAC

humaine, dans l'artère carotide d'un mouton, démontrant ainsi l'implantabilité du substitut. La suite logique des choses est d'implanter un substitut vasculaire dans un modèle allogénique afin de pouvoir étudier la réponse immunitaire et son remodelage dans un contexte clinique pertinent. Dans ce but, l'équipe a réussi à produire des feuillets de MAC à partir de fibroblastes ovins, feuillets dont les propriétés sont proches des feuillets de MAC humaine produits jusqu'à aujourd'hui²⁰². En effet, en plus d'avoir une force de perforation qui n'est pas significativement différente, les feuillets de MAC des deux espèces ont en commun de nombreux composants de la MEC et sont tous deux riches en collagène de type I. Cet effort translationnel vers le gros animal a permis l'implantation de substituts vasculaires chez la brebis dans un contexte allogénique, en interposition dans la carotide et en tant que pontage artérioveineux (carotide-jugulaire). Les résultats des implantations artérioveineuses sont présentés dans la partie résultats de ce manuscrit de thèse.

2.2.1.2. Avec échafaudage biologique exogène

Dans la stratégie *in vitro*, une autre approche consiste en l'utilisation de polymères biologiques extraits de tissus animaux et/ou humains pour composer le substitut et servir d'échafaudage aux cellules. Comme discuté précédemment, Weinberg et Bell furent les premiers à produire un substitut vasculaire à partir de collagène, protéine la plus abondante de la MEC¹⁸². Cependant, leur greffon, produit à partir de gels formés de collagènes et de cellules d'intérêt, avait une résistance mécanique trop faible pour une implantation sous pression artérielle, tout comme les substituts d'autres équipes produits à partir de gels de collagènes¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

La fibrine a été utilisée par plusieurs groupes afin d'essayer de produire des greffons fonctionnels *in vitro*. Ainsi, Swartz *et al.* ont produit un greffon à partir de CML et de cellules endothéliales ovines intégrées à un gel de fibrine²⁰³. La fibrine permet un ensemencement des cellules important et homogène, et sa vitesse de dégradation peut être contrôlée par l'ajout d'inhibiteurs fibrinolytiques²⁰⁴. Pour produire leurs greffons, Swartz et son équipe ont mélangé des CML avec de la thrombine et du fibrinogène ovin, la thrombine permettant la transformation du fibrinogène en fibrine. La solution fut injectée dans un moule entourant un mandrin en silicone de 4 mm de diamètre externe, donnant ainsi la forme tubulaire au substitut créé après retrait du moule. Après 2 semaines de culture en présence d'acide ascorbique, l'extérieur des tubes furentensemencés avec des cellules endothéliales, et remis

en culture pendant 3 ou 10 jours. Avant implantation, la surface externe des substituts fut internalisée afin de placer les cellules endothéliales dans la lumière du vaisseau. Après 2 semaines, un tissu contractile a pu se former, et un dépôt de nouveau collagène formé par les CML était visible à travers le tissu²⁰³. Les analyses ont démontré que les greffons explantés avaient une force de contraction maximale comparable à celle de la veine jugulaire en réponse à du chlorure de potassium (6,7 g/g et 5,9 g/g, respectivement). Ainsi, les auteurs ont implanté quatre greffons, d'une longueur de 6 cm et d'un diamètre externe de 9 mm, au niveau de la veine jugulaire externe d'agneaux âgés de trois mois, pendant 5 et 15 semaines. Après 15 semaines, la moitié des substituts étaient perméables. Parmi ces derniers, tous avaient été cultivés 10 jours avec des cellules endothéliales²⁰³. Les analyses histologiques ont montré une intégration du greffon avec les vaisseaux natifs, ainsi qu'une abondance de collagène comparable à la veine native. Cependant, le dépôt de fibres d'élastine après 15 semaines était inférieur à la quantité de fibres visibles dans la veine native. Une implantation plus longue permettrait d'observer le remodelage à long terme, et d'étudier la réponse inflammatoire à ce greffon allogénique. Une des limites repose également sur les propriétés mécaniques de ces greffons. En effet, bien qu'ils semblent avoir une force suffisante pour être implantés dans le système veineux (basse pression), il serait nécessaire d'étudier ce modèle dans un environnement à haute pression, là où les besoins en substituts vasculaires de petits diamètres sont essentiellement situés.

D'autres équipes ont essayé de produire des greffons à base de matrices de fibrine mélangées à des CML, des cellules souches du tissu adipeux et des cellules endothéliales. Ici, les substituts ont été mis en culture en conditions pulsées durant 72 heures. Les résultats ont notamment montré que la résistance mécanique obtenue n'était pas suffisante pour une utilisation en tant que pontage artériel (pression à l'éclatement des substituts : 192 mmHg)²⁰⁵.

Le groupe le plus avancé dans l'utilisation de la fibrine est le groupe de recherche de Tranquillo. Leur approche repose sur l'utilisation d'une suspension de fibroblastes du derme humain dans du fibrinogène, suspension dans laquelle de la thrombine et du chlorure de calcium sont ajoutés afin de former un gel de fibrine contenant des fibroblastes²⁰⁶. Après injection de la suspension dans des moules tubulaires contenant un mandrin en verre, la maturation de greffons de 4 mm de diamètre a nécessité 2 semaines de culture statiques. Ensuite, les greffons ont été cultivés jusqu'à 9 semaines en culture dynamique en bioréacteur.

Les substituts ainsi formés ont démontré des propriétés suffisantes pour l'implantation chez l'animal, avec une pression à l'éclatement de 1542 mmHg et une rétention à la suture de 1,3 N (**Figure 15**). De plus, la compliance atteinte était d'environ 2,5 %/100 mmHg, valeur légèrement supérieure à celle de la veine saphène humaine.



Figure 15 : *Substitut vasculaire développé par le groupe de Tranquillo [17].*

Dans la suite de ce travail, ce même groupe a produit et implanté des greffons vasculaires ovins dans un contexte allogénique²⁰⁷. Faits à partir de fibroblastes du derme ovine et de fibrinogène bovin, les substituts de 3-4 cm de long et d'un diamètre interne de 4 mm n'ont nécessité que 5 semaines de culture (2 premières semaines statiques, 3 semaines suivantes dynamiques) afin de démontrer une pression à l'éclatement de 5160 mmHg et une rétention à la suture de 0.58 N. La compliance du greffon a atteint 6,6 %/100 mmHg, valeur dans l'ordre de grandeur de la compliance de l'artère fémorale ovine. Le groupe a décellularisé les substituts vasculaires créés afin de réduire la quantité de matériel antigénique présent, dans le but d'éviter une réaction immunitaire adverse de l'hôte. Cette décellularisation a été effectuée en incubant les substituts dans une solution de dodécylsulfate de sodium (*sodium dodecyl sulfate* (SDS)), suivi d'une incubation dans du Triton X-100 puis avec de la DNase. Les résultats ont montré que la décellularisation n'a eu que peu d'effets sur les propriétés mécaniques et biologiques de leurs greffons. En effet, ni la compliance, ni la rétention à la suture n'ont été modifiées, et la pression à l'éclatement des substituts après décellularisation était réduite de moins de 20 % (4200 mmHg), mais restait supérieure à celle de l'artère fémorale ovine native (environ 2000 mmHg)²⁰⁷. Ils ont également montré qu'avec une

quantité d'ADN réduite de plus de 90 % après décellularisation, il n'y a pas eu d'activation des lymphocytes en présence de cellules mononucléaires sanguines allogéniques en culture. La concentration en collagène des substituts pré-implantation est comparable à celle de l'artère native, et les fibres sont orientées circonférentiellement. Après 8 et 24 semaines d'implantation, tous les greffons étaient perméables, sans signes de dilatation. Les analyses immunohistochimiques ont montré la présence de cellules positives à l' α -SMA, indiquant la présence de myofibroblastes et/ou de CML. Aussi, des cellules endothéliales sont présentes près des anastomoses à 8 semaines, et les auteurs parlent d'une endothélialisation complète à 24 semaines. Ces résultats mettent en évidence le phénomène d'endothélialisation via les anastomoses, qui est suffisant ici en raison de la courte taille des greffons implantés (2 à 3 cm)^{152,153,207}. Bien que la taille des substituts est une des limites de cette étude, la faible réponse immunitaire de l'hôte à ces derniers ainsi que leur endothélialisation et leur remodelage après 24 semaines sont prometteurs²⁰⁸.

Un des avantages de ces substituts biologiques est qu'ils ont une capacité de croître avec l'hôte. Syedian *et al.* ont implanté des substituts allogéniques à la place de l'artère pulmonaire chez trois agneaux de 8 semaines²⁰⁹. Les greffons faisaient 16 mm de diamètre interne pour une longueur de 16 à 19 mm avant implantation. Après 50 semaines, les greffons ont été explantés et les analyses ont montré une croissance somatique du poids de l'animal de 366 % et du diamètre et du volume du greffon de 56 % et 216 %, respectivement. Aucun signe de sténose, d'anévrisme ou de calcification n'a été rapporté, et les analyses histologiques ont démontré la présence de CML ainsi qu'une endothélialisation complète. Ces résultats supportent le potentiel de cette stratégie pour des applications cardiovasculaires pédiatriques. Enfin, le groupe de Tranquillo a également étudié l'utilisation de leurs greffons produits *in vitro* en tant qu'accès vasculaire chez le primate¹⁷. Des greffons décellularisés de 6 mm de diamètre et d'une longueur de 15 cm, faits à partir de fibroblastes humains, ont été implantés en tant que greffon artérioveineux dans le bras de 8 animaux. La perméabilité primaire à 3 mois et 6 mois a été de 83 % et 60 %, respectivement, la cause majeure d'échec étant la thrombose. Les greffons perméables après 3 semaines ont été ponctionnés à 1, 2 et 3 mois. Une recellularisation importante a été observée dans les explants, et une absence de calcification, de sténose et de perte de force mécanique fut notée. Enfin, les greffons implantés n'ont pas provoqué de réaction immunitaire adverse, comme démontré par les

concentrations en lymphocytes T et en immunoglobulines E, G et M non supérieures aux contrôles¹⁷. Ces résultats ont été suivis d'un essai clinique de Phase I chez 5 patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale et ne pouvant bénéficier de la création d'une fistule autologue (TRUE HD I Study, Identifiant de l'étude clinique : NCT04905511)²¹⁰. Les greffons allogéniques d'environ 18 cm de long et d'un diamètre interne de 6 mm ont été implantés entre l'artère brachiale et la veine axillaire des patients. Les substituts vasculaires possédaient une pression à l'éclatement pas significativement différente de celle de la veine saphène (2600 mmHg contre 1700 mmHg, respectivement). A 6 mois, la perméabilité primaire était de 80 % alors que la secondaire était de 100 %. Nulle dilatation n'a été observée, et les taux d'anticorps réactifs au panel ainsi que la quantification d'immunoglobuline G n'ont pas mis en avant de réponse immunitaire adverse. Bien qu'avancés dans le développement de leur greffon biologique, la principale limite de la stratégie employée par Tranquillo et son groupe repose sur des temps de culture longs mais surtout dans un bioréacteur complexe pour obtenir une force mécanique satisfaisante, temps et équipement qui engendrent des coûts conséquents.

Certaines équipes ont décidé d'associer des polymères naturels et synthétiques afin de bénéficier d'un environnement biologique tout en renforçant la résistance mécanique des substituts. Ainsi, Jockenhoevel *et al.* ont utilisé un gel de fibrine composé de CML et de fibroblastes autologues, associé à un maillage textile synthétique²¹¹⁻²¹⁴. Dans une de leur étude, six greffons de 8 cm de long et 5 mm de diamètre interne, et faits d'un maillage en PLA et de gels composés de fibrine, de CML et de fibroblastes ont été implantés dans l'artère carotide de moutons jusqu'à 6 mois, dans un contexte autologue²¹¹. Après explantation, tous étaient perméables, avec des fibres de collagène abondantes et matures et une couche endothéliale confluyente. Bien que l'approche soit prometteuse, ces travaux n'ont pas été poursuivis, et l'utilisation de cellules autologues reste une limite de ce modèle.

2.2.1.3. Avec échafaudage synthétique résorbable

Certains groupes utilisent des polymères synthétiques résorbables afin de servir d'échafaudage aux cellules pour la production de MEC *in vitro*. En 2006, Hoerstrup *et al.* ont ainsi produit un substitut vasculaire à partir d'un échafaudage d'acide polyglycolique (*polyglycolic acid* (PGA)) recouvert de poly-4-hydroxybutyrate (P4HB),ensemencé de myofibroblastes et de cellules endothéliales²¹⁵. L'ensemble a alors été mis en bioréacteur en conditions statiques pendant 7 jours puis en conditions pulsées pendant 14 jours. L'étude ne

présente pas de caractérisation mécanique des substituts pré-implantation. Les greffons autologues formés, d'environ 2 cm, ont été implantés dans l'artère pulmonaire (faible pression) de 14 agneaux, jusqu'à 100 semaines. Après deux ans, une croissance somatique du poids de l'animal de plus de 100 % et du diamètre et du volume du greffon de 30 % et 145 %, respectivement, a été montrée. Des contrôlés échographiques ont montré une fonctionnalité des greffons à chaque temps (20, 50, 80 et 100 semaines), et une absence de thrombus, de sténoses et d'anévrismes. Après 100 semaines d'implantation, les analyses mécaniques ont mis en évidence, des substituts avec une force de traction environ 4 fois supérieure, et une déformation à la rupture environ 4 fois inférieure à celles des artères pulmonaires internes²¹⁵. L'équipe a montré une augmentation de la teneur en collagène dans les greffons implantés jusqu'à 100 semaines. De plus, ils ont mis en évidence que la teneur en collagène des greffons de 20 à 100 semaines était significativement supérieure à celle de l'artère pulmonaire native. Parallèlement, une augmentation de l'expression d'un certain type de métalloprotéinases matricielles a été démontrée dans une étude complémentaire²¹⁶. La surexpression de ces protéases suggère un remodelage matricielle important. La production de substituts vasculaires *in vitro* repose sur des cellules dont les capacités de prolifération et de différenciation peuvent être limitées, en plus de pouvoir être difficilement accessibles. Une alternative étudiée est l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites dont la récupération est facile (elles peuvent être dérivées de n'importe quelle cellule) et qui possèdent des capacités de différenciation et de prolifération illimitées. Récemment, le même groupe a utilisé des cellules souches pluripotentes induites humaines différenciées en CML et cellules endothéliales, pour ensemercer des échafaudages de PGA-P4HB²¹⁷. Ici, après ensemencement des CML, l'échafaudage a été mis en conditions de culture statiques pendant 7 jours. Ensuite, après 3, 6 ou 9 semaines de culture en conditions pulsées, les substituts vasculaires ont été ensemencés avec des cellules endothéliales. Après cela, les greffons ont été cultivés pendant 3 jours supplémentaires en conditions statiques. Dans cette étude, les auteurs montrent la production d'un substitut vasculaire de très petit diamètre (0,7 mm) et de petite longueur (1 cm) avec des cellules positives au facteur de von Willebrand (vWF) et d'autres à l' α -SMA, et une architecture mimant celle des vaisseaux natifs. Cependant, bien que l'approche puisse être prometteuse, l'utilisation de ces cellules souches dépendra de la capacité de reprogrammation des cellules somatiques utilisées, ainsi que de la mise en place d'un système de production à grande échelle²¹⁸.

Un groupe de recherche du *McGowan Institute for Regenerative Medicine*, conduit par David Vorp, a utilisé des échafaudages tubulaires bicouches faits à partir d'urée de polyester uréthane (*poly(ester-urethane)urea* (PEUU))^{219,220}. La couche tubulaire interne en PEUU a été obtenue par une méthode de séparation de phase induite thermiquement. Dans cette approche, la couche externe est faite de nanofibres de PEUU déposée par électrofilage. De cette manière, une structure tubulaire avec une couche interne poreuse et une couche externe fibreuse a été obtenue. Dans deux études de 2010, le groupe a ensemencé des cellules souches dérivées de muscles ou des péricytes de rats sur l'échafaudage et les ont mises en culture pendant 48 heures^{221,222}. Les greffons possédaient une pression à l'éclatement d'environ 2300 mmHg, ainsi qu'une rétention à la suture très élevée d'environ 3,4 N²¹⁹. La compliance, quant à elle, était d'environ 4,6 %/100 mmHg. Ces substituts (1,5 mm de diamètre, 15 mm de longueur) ont été implantés dans l'aorte de rats pendant 8 semaines. Peu importe le type cellulaire utilisé, les greffons ensemencés ont montré une perméabilité à 8 semaines supérieure à celle des greffons non-ensemencés, avec une mise en évidence de couches de cellules positives à l' α -SMA et à la calponine, ce qui suggère notamment un phénotype contractile des CML, couche non présente dans les greffons non ensemencés. Une couche contenant des cellules positives au vWF a également été mise en évidence^{221,222}. Plus récemment, en 2018, le groupe a proposé une approche afin d'éliminer les 48 heures de culture après ensemencement des cellules et de préparer un substitut le jour-même de l'implantation (**Figure 16**)²²³.



Figure 16 : Substitut vasculaire remodelé après 8 semaines d'implantation chez le rat et développé par le groupe de Vorp [223].

Pour ce faire, la fraction vasculaire stromale dérivée de tissu adipeux humain a été prélevée puisensemencée sur l'échafaudage en PEUU. Le greffon produit a ensuite été implanté dans l'aorte de rats immunocompétents. Après 8 semaines, 5 des 7 greffons implantés étaient perméables, avec la mise en évidence de cellules positives à l' α -SMA et au vWF. Sur les 7 greffons implantés, 3 ont été entièrement remodelés, 2 partiellement, et 2 étaient obstrués²²³. Bien que dans cette étude, le groupe a démontré la possibilité de produire un substitut vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire en un jour, la taille des greffons, le modèle de petit animal utilisé (rat) et les courts temps d'implantations sont des limites à l'étude, et des travaux sur un modèle de gros animal à long terme seraient utiles afin d'évaluer le potentiel de ces substituts.

Le groupe le plus avancé faisant usage d'un échafaudage en polymère synthétique résorbable est le groupe de Niklason. Sa méthode repose sur l'ensemencement de CML sur un échafaudage en PGA, suivi de 8 semaines de culture en bioréacteur (**Figure 17**)²²⁴.

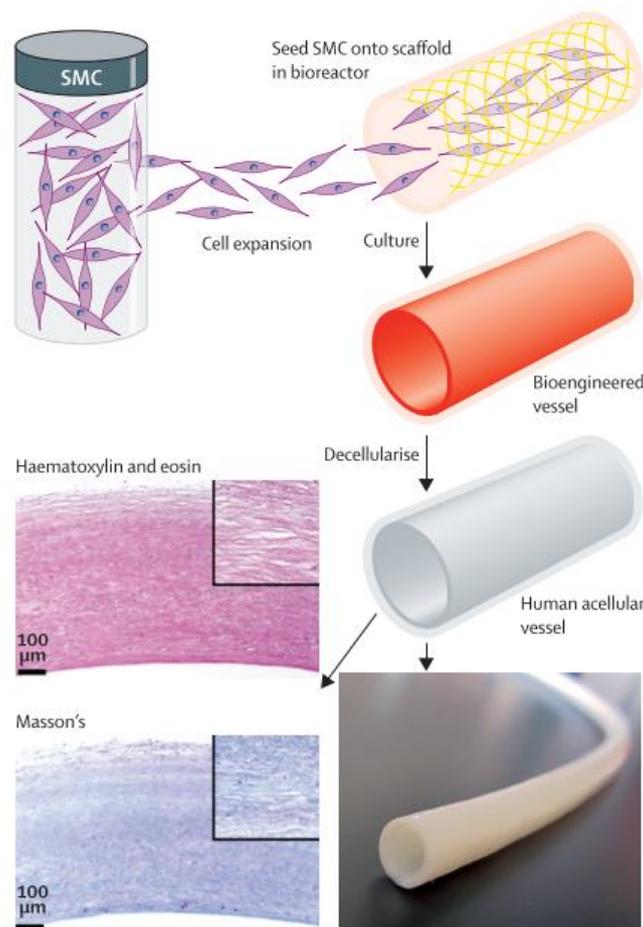


Figure 17 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Niklason [232].

Les premiers vaisseaux animaux produits par le groupe il y a plus de 20 ans avaient une pression à l'éclatement supérieure à 2000 mmHg après 8 semaines de culture, bien que la rétention à la suture était de 0,9 N, et donc inférieure à celle de l'artère native. Des vaisseaux faits à partir de CML autologues etensemencés avec des cellules endothéliales autologues ont été implantés chez des mini porcs. Lors de l'explantation après seulement 4 semaines, tous les greffons étaient perméables. Les analyses histologiques ont révélé une paroi à la structure organisée et une réponse inflammatoire faible, comparées à un greffon xénogénique (fait à partir de CML bovines) implanté²²⁴. Après avoir essayé sans succès d'améliorer les capacités répliquatives des CML humaines pour augmenter la production de MEC, le groupe s'est confronté à la difficulté de transférer ses recherches vers la clinique et la commercialisation^{225,226}. De plus, l'utilisation de CML autologues limite la disponibilité immédiate d'un tel greffon, notamment en raison des semaines de maturation en bioréacteur nécessaires²²⁷. Dès lors, Niklason et son groupe se sont tournés vers une stratégie de production de substituts vasculaires allogéniques. Ainsi, des CML provenant de plusieurs donneurs peuvent être combinées afin d'avoir une abondance de cellules suffisante pour la production de greffons^{228,229}. De plus, les substituts vasculaires peuvent ainsi être disponibles immédiatement pour un patient dans le besoin. Des substituts allogéniques ont été produits et décellularisés en utilisant du 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) et du SDS²²⁸. Ces substituts ont été implantés dans différents modèles animaux, notamment dans des modèles de pontages coronarien et carotidien jusqu'à un an chez le chien (4 mm de diamètre interne), ainsi que dans un modèle d'accès artérioveineux jusqu'à 6 mois chez le babouin (6 mm de diamètre)^{228,229}. Les substituts implantés chez le chien ont étéensemencés de cellules autologues pré-implantation. La perméabilité des greffons après 6 mois en tant qu'accès vasculaire et après un an chez le chien était satisfaisante (88 % et 83 %, respectivement), avec une absence de signes d'hyperplasie intimale, de dilatation et de calcification^{229,230}. Les greffons explantés chez le babouin ont démontré un marquage positif pour vWF, marqueur de cellules endothéliales. De plus, afin de réduire les propriétés éventuellement thrombogènes des vaisseaux faits de MEC, des études ont mis en avant plusieurs techniques. En particulier, le groupe a étudié l'effet d'un revêtement des greffons par un hydrogel d'acide hyaluronique²³¹. Douze greffons, de 10 à 20 mm de longueur, et d'un diamètre interne de 1 à 1,5 mm ont été implantés en interposition dans l'aorte abdominale de rats durant 4 semaines. La moitié des substituts ont été produits

avec l'hydrogel d'acide hyaluronique en tant que revêtement, alors que l'autre moitié sans. Les résultats ont montré que les greffons avec le revêtement avaient un pourcentage d'aire perméable (84 %) ainsi qu'un diamètre interne (1 mm) significativement supérieurs à ceux de l'autre groupe après 4 semaines (31 % et 0,4 mm, respectivement)²³¹.

L'ensemble des résultats des études pré-cliniques a permis la mise en place de deux essais cliniques chez des patients humains nécessitant un accès vasculaire pour l'hémodialyse (Identifiants des études cliniques : NCT01744418 et NCT01840956)²³²⁻²³⁴. Soixante patients ont été inclus dans cette étude afin d'évaluer la fonctionnalité et la sûreté des greffons en tant qu'accès vasculaire. Les substituts implantés étaient des greffons allogéniques décellularisés de 6 mm de diamètre interne et de 35 à 42 cm, faits à partir de CML dérivées d'aortes de donneurs décédés. Ces substituts n'ont pas été ensemencés de cellules endothéliales pré-implantation. La perméabilité primaire des greffons était de 63 % après 6 mois, et de 28 % après un an²³². De 16 à 200 semaines post-implantation, des analyses histologiques ont pu être effectuées sur certains segments de greffons²³³. Les résultats ont montré une infiltration et une maturation importantes de cellules positives à l' α -SMA et à la calponine, marqueur de la capacité contractile des CML matures²³³. Les cellules luminales exprimaient le CD31, de la VE-cadhérine et eNOS, tous trois marqueurs de cellules endothéliales. Aucune infection liée au greffon suite aux ponctions pour l'hémodialyse n'a été rapportée. Après 60 mois et sur les onze patients toujours compris dans l'étude, la perméabilité primaire a été maintenue dans un greffon, et la perméabilité secondaire dans les dix autres²³⁴. Des substituts produits identiquement ont également été étudiés en tant que pontage artériel dans un autre essai de Phase II, chez des patients atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Identifiant de l'étude clinique : NCT01872208)^{19,235}. Les résultats de ces multiples essais cliniques ont mis en avant le potentiel de ces substituts humains acellulaires, ce qui a mené à un essai clinique de Phase III chez 240 patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale (Identifiant de l'étude clinique : CLN-PRO-V007).

Bien que prometteuse, l'approche acellulaire nécessite des capacités de remodelage des cellules de l'hôte, capacités qui peuvent être très variable selon la génétique et l'état de santé. Dès lors, l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites humaines peut être une stratégie prometteuse, dans le but d'ensemencer les échafaudages de PGA avec des cellules aux capacités de différenciation et de prolifération fortes^{236,237}. Cependant, l'utilisation d'une

approche *in vitro* reste limitée par les temps de production et de maturation en bioréacteur de plusieurs semaines, rendant l'approche longue et coûteuse²³⁸.

2.2.2. *In vivo*

Une des stratégies les plus originales pour développer un substitut vasculaire adéquat est l'utilisation de la réaction à un corps étranger dans le but de produire un greffon autologue^{184,239}.

Charles Sparks fut le premier à investiguer cette approche *in vivo*. L'idée fut d'implanter dans le corps de l'hôte une "matrice à tissu" (*tissue die*, TD) afin d'induire la formation d'un tissu cicatriciel (**Figure 18**)²⁴⁰.

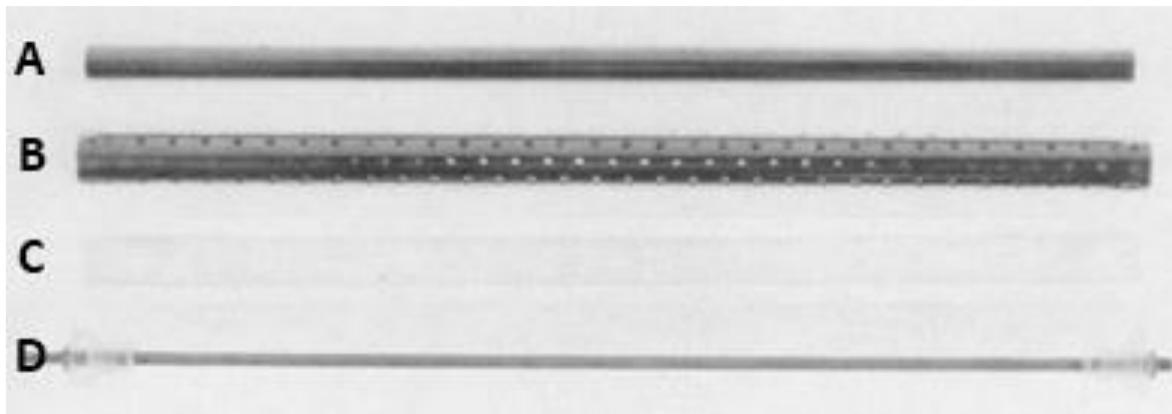


Figure 18 : Matrice à tissu (« Tissue Die ») de Sparks [241].

(A) Mandrin, (B) treillis externe, (C) tube tricoté en Dacron® et (D) tige centrale.

Cette TD consistait en un mandrin poli entouré d'un tube externe contenant des trous afin de permettre la croissance du tissu en son sein (Figure 18A, B). Un tube tricoté en Dacron®, dont le but est de fournir une pression à l'éclatement suffisante pour résister à la pression sanguine, fut placé entre le mandrin et le treillis (Figure 18C). L'ensemble fut fixé avec une tige centrale qui fut retirée une fois le greffon produit suite à l'implantation de la matrice à tissu (Figure 18D). L'association de plusieurs de ces TD d'environ 15 cm a permis, en suturant les substituts créés, la production d'un greffon d'une longueur d'environ 63 cm²⁴¹. La paroi du substitut « final » est donc constituée du tissu cicatriciel formé par la réaction à un corps étranger, et d'un tube tricoté en Dacron®. Les analyses histologiques sur ces substituts ont mis en évidence des fibroblastes et autres cellules typiques d'une réaction à un corps étranger²⁴². Cependant, il fut également noté l'absence de cellules musculaires lisses et de tissu élastique,

pouvant mener à un décalage de propriétés mécaniques entre le greffon et les vaisseaux natifs de l'hôte²⁴². Les greffons vasculaires autologues produits avec le système de mandrins de Sparks furent étudiés en clinique dans les années 1970 dans plusieurs configurations, et des limites ont vite été rapportées. En effet, des complications comme une maturation insuffisante du greffon dans la matrice à tissu, des thromboses précoces, et la formation d'anévrismes furent rapportées²⁴³.

Dans le but de surmonter les limitations et les complications susmentionnées, l'équipe de Campbell a proposé une évolution de la méthode de Sparks, notamment en n'utilisant pas de tube en Dacron®. Un tube en silicone fut implanté dans la cavité péritonéale de rats et de lapins²⁴⁴. Deux semaines après l'implantation du tube en silicone, les résultats ont montré la formation d'une capsule de tissu de granulation, résultat de la réponse inflammatoire. Le tube en silicone fut ensuite retiré et les capsules tissulaires inversées afin que la couche mésothéliale, initialement sur la surface extérieure, tapisse la surface interne afin de former une pseudo-intima. Les analyses ont révélé la présence de myofilaments et d'une couche externe composée de fibres de collagène. Les greffons ainsi formés furent implantés durant 4 mois dans des aortes de rats et des carotides de lapins. Les résultats ont montré une perméabilité de 67 % et 70 % pour chacun des modèles, respectivement. Les auteurs ont aussi démontré une capacité de contraction du substitut en réponse à des agents vasoactifs, mettant en évidence la présence de cellules au phénotype contractile²⁴⁴. La même équipe a effectué quelques années plus tard une étude chez le gros animal, dans laquelle différents types de tubes en polymères furent implantés pendant 3 semaines dans la cavité péritonéale de chiens²⁴⁵. Différents degrés d'encapsulation furent observés selon le polymère utilisé. Ils ont démontré que, indépendamment du polymère utilisé pour le mandrin, un maillage de Prolene® non-biodégradable et de Dexon® biodégradable permettait la formation d'un tissu épais et homogène. Les capsules tissulaires ainsi produites ont présenté une pression à l'éclatement supérieure à 2500 mmHg, et une rétention à la suture de 11,5 N. Les analyses histologiques des greffons autologues révélèrent que la capsule tissulaire était composée de cellules organisées transversalement autour de la lumière. De plus, ces dernières étaient positives à l' α -SMA et à la vimentine, et elles étaient entourées d'une importante matrice composée principalement de collagène. Les capsules ont ensuite été transplantées dans l'artère fémorale des chiens précédemment implantés avec les mandrins (implantation

autologue). Les analyses histologiques ont démontré l'évolution de la paroi du substitut en deux régions : une région interne, à la population cellulaire dense, et une région externe, à la population cellulaire plus éparse²⁴⁵. Des marquages positifs à la smoothelin après 3 mois d'implantation ont mis en évidence la présence de cellules musculaires lisses au phénotype contractile. De plus, est à noter la présence de *vasa vasorum* dans la couche extérieure, ainsi que la présence de cellules positives à un marqueur indiquant leur nature endothéliale (lectine d'*Ulex europaeus*).

Plus récemment, Nakayama et son équipe ont publié l'utilisation de ce qu'ils ont appelé des "Biotubes" (**Figure 19**), des greffons vasculaires autologues basés sur "l'architecture tissulaire à l'intérieur du corps" (*in-body architecture*), et dont les performances ont été étudiées chez les animaux et l'humain²⁴⁶⁻²⁴⁹.



Figure 19 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Nakayama [246].

Durant l'étude chez l'humain, des moules faits d'un tube de silicone entouré d'un conduit en acier inoxydable perforé, technique inspirée des mandrins de Sparks, furent implantés pendant 2 mois dans le tissu sous-cutané abdominal de deux patients, résultant en la formation d'un tissu collagénique tubulaire d'un diamètre interne de 6 mm. Les Biotubes formés avaient une pression à l'éclatement de 2000 mmHg et furent implantés comme pontages artérioveineux pour permettre l'hémodialyse. Bien qu'aucune formation de thrombus ne fut observée dans les greffons, les deux patients développèrent des sténoses veineuses à répétitions, dans la région distale à l'anastomose entre celle-ci et le substitut, à partir de deux mois après l'implantation²⁵⁰.

Geelhoed *et al.* réussirent aussi à utiliser la réaction à un corps étranger afin de produire des substituts vasculaires *in vivo*^{20,251}. Le groupe a d'abord étudié *in vitro* l'influence des propriétés de surface du mandrin sur la production de MEC afin de créer une tige optimale pour la production de substituts vasculaires *in vivo*²⁵². Chez l'animal, ils ont implanté en sous-

cutané chez le mouton des tiges composées du copolymère *poly(ethylene oxide terephthalate)–poly(butylene terephthalate)* afin de produire des substituts vasculaires autologues (**Figure 20**). La capsule fibreuse formée est composée d'une MEC riche en collagène, ainsi que de fibroblastes et myofibroblastes.

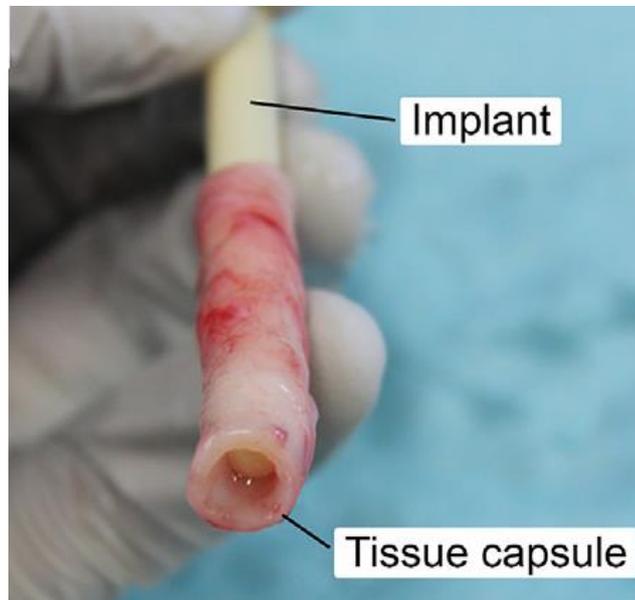


Figure 20 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Rotmans [20].

Après 2 mois d'implantation en tant que pontage artérioveineux dans le cou de brebis, les auteurs démontrent la présence de cellules positives pour les chaînes lourdes de myosine (*myosin heavy chains* (MHC)), marqueur de CML contractiles. Les CML étaient alignées circonférentiellement, rappelant l'organisation de la paroi des vaisseaux natifs. De plus, également après 2 mois, les capsules contenaient de l'élastine. La pression à l'éclatement obtenue était de 2382 ± 129 mmHg, valeur similaire aux résultats obtenus par l'équipe de Nakayama, démontrant ainsi une résistance mécanique suffisante pour un greffon vasculaire^{246,247}. Finalement, le groupe a mis en évidence un remodelage du greffon quelques semaines après l'implantation, en mettant en avant un phénotype contractile, la présence de structures proches des vaisseaux natifs humains, ainsi que la présence de cellules endothéliales tapissant la surface interne des substituts. Ils ont comparé les performances des substituts implantés aux greffons en ePTFE, et ont montré une meilleure perméabilité à 2 mois (66 % contre 33 %, respectivement).

En bref, les résultats de ces dernières dizaines d'années démontrent plusieurs avantages à utiliser la réaction à un corps étranger pour produire des greffons vasculaires, et

de nombreuses équipes explorent l'utilisation de cette technique en ce sens^{20,21,24,247,253}. En effet, le greffon produit est vivant et autologue, ce qui signifie qu'il peut être utilisé sans provoquer de rejet immunitaire du corps de l'hôte. De plus, il n'y a pas besoin de culture *in vitro* ni de bioréacteur, ce qui est un avantage économique important. Un autre avantage important de cette stratégie est la possibilité de produire des greffons vasculaires autologues. Cependant, la préparation des tissus prend des mois, et cette longue période est une limite lorsque qu'un greffon vasculaire est nécessaire en urgence. Aussi, cette approche implique une morbidité non négligeable pour le patient puisqu'une intervention chirurgicale et l'implantation d'un dispositif sont nécessaires pour produire le greffon. Enfin, il faut garder en tête que les capacités régénératrices des cellules des patients malades peuvent être altérées et seront, de toutes façons, variables d'un individu à l'autre. Ainsi, le contrôle de la qualité du greffon, que ce soit du point de vue mécanique ou biologique, sera difficile à assurer dans un tel contexte de médecine personnalisée.

2.2.3. *In situ*

2.2.3.1. *Polymères biologiques*

Bien que non présent dans la MEC humaine, le chitosane est un polymère naturel qui a été proposé pour le développement de substituts vasculaires. Ainsi, après avoir démontré la biocompatibilité et l'hémocompatibilité d'hydrogels de chitosane *in vitro*, des greffons à base de chitosane ont été implantés en place de la carotide chez deux brebis (3,5 cm de longueur, 6 mm de diamètre)²⁵⁴⁻²⁵⁶. Ces substituts avaient une pression à l'éclatement de 1313 mmHg, une rétention à la suture de 1,1 N et une compliance évaluée à 3,0 %/100 mmHg²⁵⁴. Après trois jours, les greffons étaient perméables. Cependant, l'étude de substituts faits à partir de ce matériau nécessite des implantations à long terme afin d'évaluer leurs performances ainsi que le remodelage de la structure tubulaire par l'hôte. La soie est aussi un matériau de choix pour des applications en ingénierie tissulaire, étant biocompatible, biodégradable et peu immunogène²⁵⁷. Récemment, un groupe de chercheurs japonais a créé un substitut vasculaire tricoté à partir de fils de fibroïnes de soie²⁵⁸. Les greffons d'une longueur de 1 cm pour un diamètre interne de 3 mm ont été implantés chez le rat en place de la veine cave inférieure, et des prothèses en ePTFE ont été utilisées comme contrôle. La perméabilité des deux groupes n'était pas significativement différente après 4 semaines (94,7 % pour les substituts biologiques contre 80 % pour les synthétiques). Les analyses ont mis en

avant une lumière des substituts en fibroïnes de soie entièrement recouverte de cellules endothéliales CD31-positives après 4 semaines alors que ce n'était pas le cas pour les greffons de ePTFE²⁵⁸. Cependant, il est nécessaire de tenir compte de la petite taille des vaisseaux implantés qui permet une endothélialisation transanastomotique alors que les longueurs utilisées en clinique rendent ce mode de réendothélialisation improbable. De plus, la réponse inflammatoire aux greffons n'a pas été étudiée et un temps d'implantation aussi court donne peu d'information sur le potentiel clinique de ces greffons. Enfin, le contexte d'une implantation veineuse ne représente pas les besoins cliniques qui visent des implantations dans des sites à pression sanguine plus élevée où le processus de remodelage sera très différent.

Dans l'idée d'utiliser directement les protéines naturellement présentes dans la MEC, une équipe de recherche des Pays-Bas a produit un substitut en 3 couches pour mimer l'anatomie des vaisseaux sanguins²⁵⁹. Ainsi, des fibres élastiques intactes et du collagène de type I ont été récupérés à partir de ligaments équins et de tendons bovins, respectivement²⁶⁰. Un conduit vasculaire fait de trois couches (élastine-collagène-collagène) fut obtenu par un procédé séquentiel de moulage, congélation et lyophilisation. Les greffons produits, d'une longueur de 3,5 cm (4 mm de diamètre interne) ont ensuite été implantés dans l'artère iliaque de cochons ($n = 4$) pendant 4 semaines, avec des substituts en ePTFE comme contrôle. Bien que perméables après une semaine, l'ensemble des substituts produits étaient obstrués après 4 semaines, contre un seul greffon synthétique. De plus, la résistance mécanique des substituts après des périodes d'implantation plus longues peut être questionnée, le collagène purifié provenant d'animaux ou de cadavres étant connu pour être rapidement dégradé par l'hôte dans le cas d'implantation de constructions issues de l'ingénierie tissulaire^{186,187,261,262}.

2.2.3.2. Polymères synthétiques biorésorbables

Plusieurs groupes ont utilisé des polymères synthétiques biorésorbables afin d'implanter des échafaudages qui vont se dégrader *in situ* pour laisser place à la formation d'une MEC autologue. Plusieurs revues de la littérature ont été faites sur les polymères utilisés pour des applications cardiovasculaires, et les plus rencontrés sont l'acide poly-L-lactique (*polylactic acid* (PLA)), le polycaprolactone (PCL), le PGA et le P4HB, deux polymères déjà décrits plus tôt²⁶³⁻²⁶⁶. Le temps de dégradation du matériau *in vivo* est une donnée essentielle à prendre en compte dans cette stratégie, puisque l'échafaudage doit conserver une

résistance mécanique minimum au cours de son remodelage par l'hôte. Par exemple, là où le PGA se dégrade rapidement, le PCL nécessite plus de 24 mois pour être dégradé²⁶³.

Shinoka *et al.* furent les premiers à produire un substitut vasculaire fait à partir d'un échafaudage synthétique biodégradable hybride (polyglactine/PGA) ensemencé de cellules autologues et implanté dans l'artère pulmonaire ovine²⁶⁷. Shinoka et son équipe furent également les premiers à rapporter, en 2001, l'implantation d'un tel substitut chez l'humain, dans un contexte pédiatrique²⁶⁸. D'une longueur de 20 mm pour un diamètre de 10 mm, le substitut a été ensemencé de cellules du patient et, après 20 jours de culture, implanté chez un enfant de 4 ans afin de remplacer la partie de son artère pulmonaire bouchée. Après 7 mois, le patient allait bien et aucun signe d'occlusion du greffon n'était visible²⁶⁸. De 2000 à 2004, 42 patients de 1 à 24 ans ont reçu des greffons pulmonaire faits par Shinoka et son équipe (**Figure 21**)²⁶⁹.



Figure 21 : Substitut vasculaire développé par le groupe de Shinoka [269].

La stratégie de production des greffons reposait sur un échafaudage fait d'un copolymère de poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) renforcé d'une couche de PGA ou de PLA²⁶⁹. Afin de dépasser les limites que sont le temps de culture, ainsi que l'utilisation de sérum xénogénique nécessaire à la culture, des cellules de la moelle osseuse des patients ont été utilisées au cours de la chirurgie. Après un suivi moyen de 490 jours, aucune complication due aux greffons n'a été observée. Les fibres de PGA furent dégradées en 2 mois, contre environ 2 ans pour le PLA²⁶⁹. Un autre groupe de chercheurs a créé et implanté des substituts faits à partir d'échafaudages de PGA et PLA dans l'artère carotide de chiens (4 mm de diamètre et 3 cm de long) jusqu'à un an²⁷⁰. Bien que non cellularisés avant l'implantation, l'ensemble

des substituts implantés étaient perméables, et une endothélialisation complète de la lumière était visible. L'ensemble des résultats de l'équipe de Shinoka et Breuer a mené en 2009 au lancement d'une étude clinique de Phase I (Identifiant de l'étude clinique : NCHIRB12-00357). Après un suivi moyen de 5,8 ans, aucune rupture de greffon, ni d'infection, de calcification, d'anévrisme ou de décès liés aux greffons n'ont été mis en évidence²⁷¹.

De nombreuses études sur l'utilisation d'échafaudages faits de copolymères de PLCL associés à une couche de PGA pour la production de substituts vasculaires ont été faites ces quinze dernières années²⁷²⁻²⁸². En 2010, Roh *et al.* ont étudié plus précisément le processus de remodelage par lequel un échafaudage biodégradableensemencé de cellules de moelle osseuse humaine se transforme en vaisseau sanguin vivant *in vivo*²⁷². Implantés en interposition veineuse chez des souris immunodéficientes, les greffons se sont remodelés en vaisseaux sanguins en environ 6 mois. Surprenamment, les cellules de moelle osseuseensemencées n'étaient plus détectables après quelques jours. Ces résultats mettent en avant un remodelage et une repopulation cellulaire des greffons par les cellules hôtes²⁷².

Récemment, Drews *et al.* ont utilisé une approche numérique afin de comprendre le développement et le devenir des substituts implantés²⁸⁰. Ces modèles proposent un mécanisme qui expliquerait comment des échafaudages de PLCL et PGA implantés entre la veine cave inférieure et l'artère pulmonaire de moutons présentent une sténose dans les premiers mois mais se résorbent spontanément par la suite. Ces outils pourraient permettre l'optimisation de la conception des substituts afin de contrôler le processus de remodelage des greffons. Suite à ces travaux, la même équipe a implanté un substitut dans la veine cave inférieure d'agneaux pendant 1 an²⁸². Ils ont montré que dans les premières semaines, le processus de remodelage de l'échafaudage synthétique dépendait grandement de la réaction de l'hôte à un corps étranger. Cette période se caractérise par un rétrécissement du substitut vasculaire, avec une augmentation du nombre de cellules inflammatoires positives au CD45, CD68, à iNOS et au CD163²⁸². Suite à la dégradation complète des composants synthétiques, après 26 semaines, le greffon croît et subit un remodelage lui donnant des propriétés biologiques, structurales et mécaniques proches de celles de la veine cave inférieure ovine²⁸². Bien que prometteur dans un système à basse pression, le PLCL ne permet pas un couplage optimal entre résistance mécanique, dégradation du copolymère et remodelage du vaisseau afin de pouvoir être performant dans le système artériel. En effet, le greffon se dilate et se

rompt après quelques semaines seulement dans un système à haute pression, limitant son utilisation à certaines applications^{276,283}.

Le PCL est un polymère qui se biodégrade lentement, avec une résistance mécanique ayant permis une implantation de greffon vasculaires dans le système artériel de moutons pendant quelques semaines^{284,285}. Alors que le PCL limite l'infiltration cellulaire et la formation de néotissu de par sa dégradation lente et son caractère hydrophobe, une association au chitosane, qui se dégrade rapidement et est hydrophile, a permis un remodelage du substitut. Après 6 mois d'implantation chez le mouton, les résultats ont montré une quantité de collagène déposé équivalente à celle de l'artère carotide native, ainsi que la présence de CML matures et de cellules endothéliales²⁸⁶. Ainsi, afin de bénéficier des propriétés mécaniques du PCL tout en apportant davantage de capacités de remodelage au substitut, plusieurs équipes ont couplé le PCL à un autre composé, ou ont réussi à montrer l'apport de la fonctionnalisation de surface des échafaudages, que ce soit en utilisant de l'héparine, de la tropoélastine ou du sébacate de polyglycérol (*polyglycerol sebacate* (PGS))²⁸⁷⁻²⁹¹.

Le PGS est un polymère biodégradable, biocompatible, non thrombogène et possédant des propriétés élastiques²⁹². Zbinden *et al.* ont implanté chez des souris des échafaudages de PGA possédant ou non un revêtement de PGS²⁹³. Ils ont démontré que la présence de PGS était corrélée à une augmentation du dépôt de collagène ainsi qu'à une présence moindre de macrophages CD68-positifs, confirmant un effet du PGS sur l'inflammation²⁹⁴. Enfin, dernièrement, une équipe a produit des conduits tubulaires faits de fibres de tropoélastine comprises dans une matrice de PGS²². Les échafaudages développés avaient une pression à l'éclatement de 2150 mmHg et une rétention à la suture de 0,25 N. Ces derniers, d'un diamètre interne de 0,7 mm et d'une longueur de 1 cm, ont été implantés dans l'aorte abdominale de souris pendant 8 mois. A l'explantation, l'adventice développée présentait des fibrilles de collagène matures, et la formation d'une limitante élastique interne était visible, bien que moins dense et moins organisée que celle de l'aorte native de l'animal²². L'échafaudage de PGS, quant à lui, s'est dégradé rapidement, provoquant une dilatation du substitut jusqu'à 18 semaines, avant qu'il ne se stabilise (de 0,7 mm à 1,4 mm).

En conclusion, l'utilisation de polymères biodégradables, d'origines biologiques et synthétiques, a de multiples avantages dans la production d'échafaudages pour créer des substituts vasculaires fonctionnels *in vivo*. En effet, selon la méthode de fabrication et les

polymères utilisés, il est possible de faire varier différents paramètres afin de modifier les propriétés mécaniques du substitut implanté, tout en contrôlant sa vitesse de dégradation, qui influe sur la formation du néotissu. De plus, la facilité de leur fonctionnalisation de surface permet de leur conférer des propriétés additionnelles. Cependant, des développements sont encore nécessaires afin de pouvoir utiliser ces échafaudages biodégradables dans le système artériel afin d'obtenir une vitesse de dégradation adaptée et le remodelage souhaité. Une des limites de cette approche repose sur les variabilités inter-individuelles, qu'elles soient liées à leur patrimoine génétique ou à leur état de santé. En effet, l'équilibre entre la dégradation du polymère et la formation de néotissu est essentiel afin d'éviter une dilatation du greffon ou des éventuels anévrismes^{276,285,295}. Or, les variabilités inter-individuelles entraînent des temps de dégradation du polymère et de formation du néotissu qui diffèrent pour un même matériau.

2.2.3.3. Echafaudages dérivés de tissus natifs

Une des stratégies populaire pour pallier aux limitations des substituts synthétiques et aux temps de culture longs des stratégies *in vitro* est l'utilisation de tissus animaux ou cadavérique traités de façon à éviter le rejet immunologique²⁹⁶⁻²⁹⁸. L'utilisation d'une MEC native permet de bénéficier d'un matériau à la composition, à la structure, et aux propriétés mécaniques physiologiques^{299,300}. Ces matériaux étant généralement d'origine allogénique ou xénogénique, un traitement de décellularisation est nécessaire afin d'éviter une réaction de rejet de l'hôte. Ces traitements sont discutés plus tard dans ce manuscrit (3.1.2).

Il y a plus de 30 ans, Badylak *et al.* ont étudié l'utilisation de la sous-muqueuse de l'intestin grêle (*small intestinal submucosa* (SIS)) pour des applications en médecine régénératrice. Un des avantages de ce matériau biologique par rapport aux vaisseaux synthétiques est sa résistance aux infections qui est significativement supérieure^{301,302}. Badylak *et al.* ont étudié l'utilisation de la SIS pour plusieurs applications chez le chien. Ainsi, ils ont implanté la SIS autologue en tant que substitut vasculaire de large diamètre (10 mm) et d'une longueur de 5 cm dans l'aorte abdominale, mais également dans un système à basse pression, en tant que substitut de la veine cave supérieure (13,7 mm de diamètre, 2 à 4 cm de long)^{303,304}. Dans les deux applications, il n'y avait pas de signes d'infection, de thrombose ou de sténose après 52 et 72 semaines d'implantation, respectivement. Les résultats n'ont pas mis en évidence la présence de cellules endothéliales à la surface des substituts. La même

équipe a implanté le même matériau en tant que substituts de petit diamètre (4,3 mm), de 3 à 6 cm de longueur, dans les artères carotides et fémorales de 18 chiens (**Figure 22**)³⁰⁵.



Figure 22 : Greffon de 5 mm de diamètre fait à partir de sous-muqueuse d'intestin de chien [305].

Les animaux ont été sacrifiés à différents temps d'étude, allant de 2 jours à 82 semaines. La perméabilité de l'ensemble des greffons était de 75 %, et des anévrismes se sont formés dans 4 des 36 greffons³⁰⁵. Les analyses histologiques ont mis en évidence la présence d'un tissu conjonctif dense. Cependant, aucune endothélialisation n'a été observée dans les greffons, limitant potentiellement la perméabilité des substituts de petit diamètre de SIS autologue sur le long terme. Cependant, dans une autre étude, le même groupe a implanté des substituts de même dimensions, faits de SIS de porc ainsi que des veines saphènes autologues dans l'artère carotide de chiens³⁰⁶. Les résultats ont montré une perméabilité égale après 6 mois entre les substituts de SIS et les veines autologues (75 %). Les résultats ont montré une endothélialisation presque complète des substituts de SIS après 28 jours d'implantation. Les cellules présentes dans la media ainsi que dans la néointima des substituts ont été marquées positivement à l' α -SMA. Cependant, il est à noter que les substituts de SIS non perméables se sont obstrués durant les deux premières semaines, avant l'endothélialisation visible des greffons.

Afin de pallier à ce problème, Andreadis et son groupe ont produit des substituts vasculaires endothélialisés^{307,308}. Leur technique repose sur l'utilisation de feuillets de SIS réhydratée roulés autour d'un mandrin afin d'obtenir une forme tubulaire de diamètre voulu. Ensuite, de la fibrine est associée aux feuillets de SIS afin de coller les couches entre elles dans

le but d'avoir une résistance mécanique suffisante (pression à l'éclatement : 1200 mmHg). Les substituts ont ensuite été endothélialisés avec des cellules allogéniques ; certains ont également étéensemencés de CML allogéniques. Les greffons endothélialisés, d'environ 5 cm de long pour un diamètre interne de 5 mm, ont été implantés dans l'artère carotide gauche d'ovins immunosupprimés pendant une semaine, un mois et 3 mois ($n = 3$ par temps), et les résultats ont montré une perméabilité de 100 %. Une infiltration cellulaire sur toute la longueur du greffon a pu être observée, et pas seulement aux sites anastomotiques. Les analyses immunohistologiques ont mis en évidence la présence de cellules positives pour la calponine, marqueur des cellules musculaires lisses. D'une manière intéressante, le nombre et la prolifération des cellulesensemencées pré-implantation diminuent avec le temps *in vivo*. Ces résultats suggèrent un remodelage actif de la part des cellules de l'hôte, et non des cellules implantées³⁰⁷. De plus, un accroissement de la synthèse de collagène au sein des greffons a été démontré. Bien que fait chez un animal immunosupprimé, ce qui empêche une étude de la réponse immunitaire dans un contexte clinique pertinent, cette étude a mis en avant le rôle prépondérant des cellules de l'hôte dans le remodelage du greffon.

Sur la base de ces résultats, le groupe s'est ensuite tourné vers la production de substituts acellulaires, toujours faits à partir de SIS décellularisée (**Figure 23**). Cette nouvelle stratégie repose notamment sur la fonctionnalisation de la surface de la lumière des greffons avec de l'héparine pour diminuer la thrombogénicité, et le VEGF pour favoriser l'endothélialisation^{23,309,310}. L'équipe a mis en avant la transdifférentiation des monocytes circulants dans le sang, qui, une fois recrutés par le VEGF, adhèrent à la paroi et se différencient en cellules exprimant des protéines spécifiques des cellules endothéliales³¹⁰.



Figure 23 : Substitut vasculaire fait à partir de sous-muqueuse d'intestin grêle de porc et développé par le groupe d'Andreadis [23].

Ces substituts ont été implantés chez des agneaux jusqu'à 6 mois, et les résultats ont montré une croissance des substituts avec l'hôte, en termes de taille et de diamètre²³. Ceci met en avant un des avantages essentiels des substituts vasculaires biologiques, qui est la possibilité de croître avec l'hôte et, ainsi, d'être utilisé dans des applications pédiatriques. Dans cette étude, une infiltration de CML dans la couche médiane est observée, avec le développement d'un endothélium fonctionnel. A 6 mois, la présence d'un dépôt d'élastine a aussi été observée, dépôt absent à 3 mois post-implantation. Pris ensemble, ces résultats démontrent que la fonctionnalisation de surface de substituts vasculaires biologiques peut améliorer le remodelage et la fonctionnalité des greffons à court et moyen termes.

La membrane amniotique humaine est un matériau biologique prometteur grâce à sa grande disponibilité et des propriétés mécaniques fortes. La membrane amniotique humaine décellularisée a un potentiel démontré pour des applications vasculaires. Qu'elle soit roulée pour former un tube ou découpée en rubans pour permettre la production de substituts grâce à une méthode d'assemblage textile, la membrane amniotique permet la production de substituts vasculaires de faibles diamètres^{200,311,312}. Amensag *et al.* ont produit des substituts de 3,2 mm de diamètre à partir de membrane amniotique décellularisée à l'aide de DNase I³¹². Les substituts ont ensuite étéensemencés de CML humaines et implantés dans l'artère carotide de lapins immunocompétents pendant 4 semaines. Les greffons étaient perméables à 4 semaines, avec une mise en évidence du remodelage de la MEC de la membrane amniotique. Cependant, la production de ces greffons nécessite la fusion de feuillets, qui pourrait créer des problèmes de délamination. Aussi, cette fusion nécessite 4 semaines de maturation dans un bioréacteur complexe et coûteux. Enfin, des études plus longues sont nécessaires afin d'évaluer ses performances à long terme.

Lors de l'utilisation d'échafaudages de MEC dérivée de tissus natifs xénogéniques ou allogéniques, les techniques de décellularisation ont une importance toute particulière afin de réduire l'immunogénicité des substituts vasculaires créés. Cependant, ces dernières sont susceptibles de créer des dommages à la structure de la MEC, altérant potentiellement ses propriétés biologiques, chimiques et mécaniques (conséquences discutées dans la partie 3.1.2)²⁹⁹. Afin de préserver mécaniquement une veine xénogénique tout en diminuant son immunogénicité, Lopera Higuera et Griffiths ont mis au point une méthode ne se concentrant pas sur la décellularisation seulement, mais sur l'élimination des antigènes hydrophiles et

lipophiles de la MEC³¹³. Pour ce faire, les échantillons, des veines saphènes bovines, sont incubées dans une solution de perméabilisation pendant une heure. Ensuite, les protéines lipophiles sont éliminées pendant 48 heures, suivies de 48 heures de désassemblage des sarcomères, elles-mêmes suivies de 24 heures d'élimination de protéines hydrophiles³¹³. Enfin, les échantillons subissent 24 heures de digestion par une nucléase (DNase I), suivies de 48 heures de rinçage. Cette méthode a été utilisée en parallèle d'une décellularisation au SDS, et les auteurs ont montré que les MEC ayant subi la nouvelle méthode d'élimination d'antigènes ont conservé une structure et une fonction natives. A l'inverse, les MEC décellularisées au SDS ont une structure altérée, des quantifications ayant montré une diminution significative de la quantité de collagène, menant à une modification des propriétés mécaniques. De plus, la décellularisation des veines a mené à une dysfonction des valvules des veines saphènes bovines³¹³. Dans une étude complémentaire, Lopera Higueta *et al.* ont implanté des veines saphènes bovines produites par élimination d'antigènes chez le lapin³¹⁴. Dans un modèle d'interposition jugulaire, les substituts traités avec la technique d'élimination d'antigènes ont montré un taux de perméabilité de 100 % après 35 jours. De plus, le caractère essentiel de l'intégrité des protéines de la membrane basale dans la fonctionnalité des substituts vasculaires a été mis en avant. Des veines saphènes ont été « inversées », afin que la membrane basale ne soit plus située dans la lumière. Ces veines, ainsi que des veines non inversées ont été implantées chez le lapin comme décrit précédemment. Le taux de perméabilité était de 100 % pour les veines non inversées, contre seulement 20 % pour les veines inversées³¹⁴. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les protéines de la membrane basale dans les substituts vasculaires dont les antigènes ont été éliminés pourraient favoriser la ré-endothélialisation³¹⁵.

Dans leur ensemble, les résultats présentés dans cette partie montrent que l'utilisation de MEC natives non-autologues, traitées pour réduire leur immunogénicité, est une approche prometteuse pour produire des substituts vasculaires de petit diamètre, comme démontré par le travail du groupe d'Andreadis²³. Cependant, une des faiblesses réside dans la courte durée des études effectuées. De plus, les traitements de décellularisation utilisés peuvent altérer les propriétés biologiques, structurales, et mécaniques de la MEC, et ainsi être limitants dans la performance des substituts^{313,314,316}. Ainsi, la dégradation de la MEC par la décellularisation peut faire craindre une dégradation trop rapide du substitut vasculaire une

fois implanté. De plus, les MEC dérivées de tissus natifs proviennent d'individus différents. Dès lors, chaque MEC utilisée aura des propriétés biologiques et mécaniques différentes, rendant le contrôle qualité difficile pour une utilisation à grande échelle.

2.3. Modèles animaux pour l'évaluation d'accès vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire

Afin de pouvoir développer un substitut vasculaire disponible en clinique pour l'espèce humaine, il est nécessaire de passer par différentes phases d'essais précliniques chez les animaux. Les modèles animaux, leur pertinence et leurs avantages dans l'étude et le développement de substituts vasculaires ont fait l'objet de plusieurs revues³¹⁷⁻³²⁰.

Dans le cadre de ce travail de thèse de doctorat, notre objectif est de développer un substitut vasculaire à des fins de pontage artérioveineux pour créer un accès vasculaire pour les patients hémodialysés. Bien que les modèles de petits animaux comme les rongeurs puissent être intéressants afin d'étudier certains mécanismes moléculaires pathologiques initiaux (dans les 4 premières semaines), les modèles de gros animaux sont nécessaires lorsqu'on en vient à étudier la fonctionnalité des substituts à long terme et tels qu'ils seront utilisés chez l'humain, avec des tailles de vaisseaux sanguins, des conditions hémodynamiques et des applications se rapprochant de celles rencontrées en clinique^{321,322}. Quatre modèles de gros animaux sont majoritairement utilisés dans le développement de nouveaux substituts vasculaires : le porc, le mouton, le chien et le primate non-humain.

Chronologiquement, en 1999, Kohler *et al.* font partie des premiers à avoir développé un modèle de sténose rapide chez le mouton, afin d'étudier les mécanismes d'échec des greffons dans ce contexte³²³. Des greffons vasculaires commercialisés en ePTFE (6 mm de diamètre interne) ont été implantés entre la veine jugulaire et l'artère carotide, en forme de « S » afin d'éviter une plicature. Des phénomènes thrombotiques et d'hyperplasie intimale sont apparus en 8 semaines, démontrant ainsi l'apparition de phénomènes physiopathologiques sans ponction du greffon ni hémodialyse. Quelques années plus tard, en 2003, Rotmans *et al.* ont développé un modèle bilatéral porcin en implantant des greffons en ePTFE de 5 mm de diamètre interne, entre la veine jugulaire et l'artère carotide de porcs³²⁴. De l'hyperplasie intimale fut rapidement observée, surtout à l'anastomose veineuse, ainsi qu'une diminution du flux sanguin dans les greffons. Les auteurs ont rapporté un taux de perméabilité primaire inférieur à 50 % à 8 semaines. Quelques années plus tard, en 2005, Rotmans *et al.* ont étudié

l'amélioration de l'endothélialisation des greffons en ePTFE afin de réduire la formation d'hyperplasie intinale¹⁵⁴. La technique utilisée consistait en la fonctionnalisation de la surface du greffon avec des anticorps anti-CD34 dans le but de recruter des cellules progénitrices endothéliales *in vivo*¹⁵⁴. Des greffons en ePTFE fonctionnalisés et non-fonctionnalisés avec ces anticorps ont été implantés dans un modèle bilatéral comme décrit plus haut. Après 3 jours d'implantation, les auteurs ont montré la présence de cellules positives à la lectine (de *Griffonia simplicifolia*) identifiant ainsi les cellules adhérentes à la surface comme étant des cellules endothéliales. Après 28 jours d'implantation, les greffons fonctionnalisés à l'anticorps CD-34 étaient significativement plus recouverts de cellules positives à la lectine que les greffons non fonctionnalisés ($88 \pm 5 \%$ contre $32 \pm 8 \%$, respectivement)¹⁵⁴. Cependant, l'hyperplasie intinale à l'anastomose veineuse supérieure chez les greffons fonctionnalisés était fortement augmentée (6 mm^2 contre $1,7 \text{ mm}^2$, respectivement). La même année, un autre groupe a étudié l'efficacité de greffons en ePTFE revêtus de peptides P15 afin de recruter des cellules endothéliales¹⁵⁶. Les greffons ont été implantés dans un modèle ovin, entre l'artère fémorale ou carotide et la veine. Les analyses des explants en microscopie électronique à balayage ont montré une endothélialisation supérieure dans les greffons avec le revêtement de peptides P15 après 28 jours. Contrairement à l'étude de Rotmans *et al.*, l'hyperplasie intinale qui s'est développée à l'anastomose veineuse après 28 jours dans les greffons fonctionnalisés était inférieure à celle s'étant développée dans les greffons non fonctionnalisés ($2,2 \text{ mm}^2$ contre $6,2 \text{ mm}^2$, respectivement).

De leur côté, en 2010, Koenneker *et al.* se sont inspirés du modèle ovin de Kohler *et al.* afin d'évaluer l'utilisation d'artères internes thoraciques bovines décellularisées en tant que pontage artérioveineux. Les substituts ont été implantés entre l'artère carotide et la veine jugulaire pendant 3 et 6 mois³²⁵. Une fois décellularisés, la moitié des greffons ont étéensemencés avec des cellules endothéliales dérivées de cellules précurseurs mononucléées du sang autologues. Les résultats ont montré que 22 greffons sur 26 étaient perméables après 3 et 6 mois. Aucune explication pour l'occlusion des 4 greffons n'a été rapportée. Aucune sténose considérée comme pertinente ($>30 \%$) n'a été observée. Cependant, les greffons non endothélialisés ont montré des zones de calcification prononcées, comparées aux greffons endothélialisés³²⁵. Le suivi à 3 mois d'implantation a montré la présence de *vasa vasorum* dans la paroi des greffons de chaque groupe. Deux ans plus tard, Tillman *et al.* ont produit un

substitut vasculaire fait d'une artère carotide porcine décellularisée et ensemencée avec des cellules endothéliales ovine³²⁶. Le substitut (autologue pour l'endothélium) a été implanté en tant que pontage entre l'artère carotide et la veine jugulaire externe en s'inspirant du modèle ovin de Kohler *et al.* (**Figure 24**).

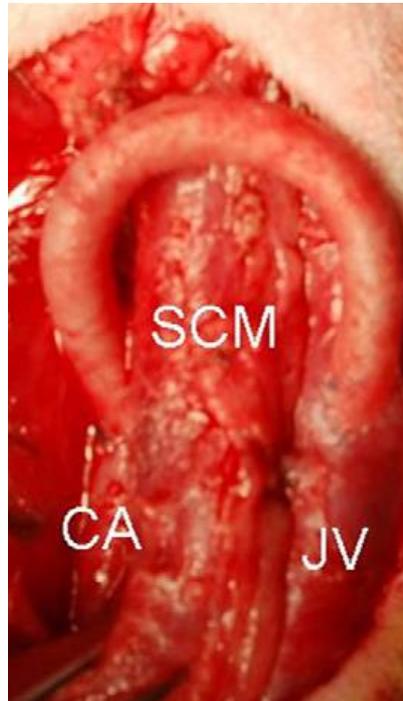


Figure 24 : Implantation d'un substitut vasculaire en tant que pontage artérioveineux entre l'artère carotide et la veine jugulaire externe de brebis [326].

CA : artère carotide, JV : veine jugulaire, SCM : muscle sternocléidomastoïdien

Un groupe d'animaux ($n = 7$) a été sacrifié après 2 mois et un autre groupe à la suite de 2 à 6 mois (4 ± 1 mois de moyenne, $n = 8$). Un mois après implantation, 4 greffons sur 15 étaient thrombosés, avec deux de ces échecs attribués à une plicature du substitut. Après ce mois, chaque greffon perméable a été ponctionné trois fois par semaine avec une aiguille 16 Gauges, et ce jusqu'au sacrifice. Pendant la phase de ponction, aucune occlusion de greffon ne s'est produite, et les analyses histologiques ont montré un remodelage des sites de ponctions avec un dépôt de collagène³²⁶. De l'hyperplasie intimale s'est formée au niveau des anastomoses veineuses de chaque greffon, causant une sténose représentative des modèles d'échec des GAV.

Plus récemment, en 2020, Riboldi *et al.* ont également utilisé un modèle ovin afin d'évaluer les performances d'un substitut pas entièrement biologique, fait de fibroïnes de soie et de

polyuréthane³²⁷. Un taux de perméabilité de 89 % à 3 mois des substituts implantés en tant que pontage artérioveineux entre la carotide et la jugulaire externe de brebis a été observé. Les analyses histologiques et de microscopie électronique à balayage ont mis en évidence la présence d'hyperplasie intimale dans les greffons aux trois temps, et plus particulièrement à l'anastomose veineuse. Cette hyperplasie intimale s'est épaissi entre 1 et 3 mois, créant une sténose. La sténose est restée inférieure à 50 % de la surface de la lumière du greffon, valeur qui peut être considérée comme un seuil au-delà duquel les déficiences fonctionnelles commencent à apparaître³²⁸.

La même année, afin d'essayer de produire un greffon artérioveineux autologue, Geelhoed *et al.* ont utilisé la réaction à un corps étranger pour produire un substitut directement chez l'hôte, comme décrit précédemment dans la partie sur les stratégies *in vivo* (2.2.2)²⁰. Implantés entre l'artère carotide et la veine jugulaire externe d'un modèle ovin, la perméabilité à 2 mois était de 67 % pour les greffons autologues, contre 33 % pour les greffons en ePTFE implantés en tant que contrôles. Après 4 semaines, un endothélium était formé à la surface luminale des greffons et aucun composé du sang n'y a adhéré lors d'un test *ex vivo*, démontrant la non-thrombogénicité de ce dernier. Dans la néomédia, la présence de cellules au phénotype contractile a été mise en évidence. Des sténoses étaient observables au niveau des sites d'anastomoses veineuses, avec la présence de macrophages et de fibroblastes²⁰. Dans les substituts autologues, la sténose était de 52 ± 14 % à 1 mois contre 13 ± 12 % à 2 mois. A l'inverse, la sténose a augmenté entre 1 et 2 mois dans les greffons en ePTFE, passant de 4 ± 1 % à 86 %, respectivement. Zhi *et al.* ont utilisé le même principe afin de produire des « biotubes », substituts vasculaires dont nous avons parlé précédemment dans ce manuscrit²⁴. Produits chez trois mouton, les greffons autologues de 5 mm de diamètre et d'une longueur de 14 à 16 cm ont été implantés entre l'artère carotide et la veine jugulaire des animaux jusqu'à 3 mois. La perméabilité des greffons à 3 mois était de 100 %. A 0, 1, 2 et 3 mois, les greffons ont été ponctionnés avec une aiguille de 16 Gauges. Les résultats ont montré une résistance à la ponction ainsi qu'une hémostase rapide. Ces résultats sont très prometteurs mais le nombre d'animaux devra être augmenté afin de confirmer la reproductibilité de ces observations. Les biotubes autologues produits par Furukoshi *et al.* ont également été testés en tant que pontage artérioveineux mais dans un modèle canin ($n = 1$)²⁴⁷. Dans l'ensemble de ces études, une des limites est l'absence d'un greffon en ePTFE en tant

que contrôle direct, chez l'animal, afin de s'affranchir des variabilités inter-individuelles lors de l'analyse des résultats.

En 2017, dans le but de comparer les performances des substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire avec des substituts synthétiques utilisés en clinique, Ong *et al.* se sont inspirés du modèle porcin bilatéral développé en 2003 par Rotmans *et al.*, afin de le mettre au point chez l'ovin²⁷⁶. L'idée de ce modèle est de s'affranchir de la variabilité inter-animaux pour pouvoir comparer les substituts directement entre eux. Un greffon fait de nanofibres de PGA-PLCL fut implanté d'un côté du cou de chaque animal, entre l'artère carotide et la veine jugulaire externe, et le substitut synthétique fut implanté de l'autre côté²⁷⁶. La propension des greffons à plicaturer une fois implantés a été rapportée. Après 4 semaines, et juste avant sacrifice et explantation, chaque greffon a été ponctionné. Les substituts en PGA-PLCL ont présenté une dilatation avec une augmentation du diamètre de la lumière sur les 4 semaines d'implantation, contrairement aux greffons en ePTFE qui n'ont pas subi de dilatation. Afin de résoudre les problèmes de dilatation et de plicature observés, le même groupe a produit des substituts en PCL-PLCL corrugués²⁸⁵. Bien que la corrugation de ces substituts ait permis d'éviter le phénomène de plicature, les greffons ont montré une dilatation du diamètre après 10 semaines d'implantation.

Le primate non-humain est le modèle animal le plus proche de l'espèce humaine, et est, par conséquent, considéré comme le modèle animal précédent les études cliniques chez l'humain. Ce dernier a été utilisé dans certaines études évaluant de nouveaux substituts biologiques. Des groupes ont ainsi implanté en tant que pontage artérioveineux des substituts biologiques produits à partir d'une MEC assemblée *in vitro*, comme discuté précédemment. Ainsi, Dahl *et al.* ont implanté leur substitut vasculaire, fait d'une MEC produite par des CML humaines, entre l'artère axillaire et la veine brachiale de babouins²²⁹. Ils ont rapporté un taux de perméabilité primaire à 6 mois de 88 %. L'absence de prolifération des lymphocytes T au contact des greffons *in vitro* a permis de démontrer la non-immunogénicité de ces derniers. De plus, les greffons n'ont révélé aucun signe de calcification ni d'anévrisme après 6 mois. Les auteurs ont également montré que l'hyperplasie intimale au niveau de la sortie du flux sanguin dans la veine s'est moins développée que dans les greffons en ePTFE²³⁰. En comparaison, quelques années plus tard, Syedain *et al.* ont implanté leur substitut vasculaire, fait d'une MEC également produite par des cellules humaines *in vitro* (fibroblastes), dans un modèle similaire

de babouins¹⁷. Un taux de perméabilité primaire de 60 % a été rapporté à 6 mois. Au même temps, les résultats ont montré une recellularisation des greffons par les cellules de l'hôte, ainsi qu'une absence de réponse immunitaire manifeste.

Des différents modèles de gros animal utilisés pour évaluer les performances de greffons artérioveineux, le modèle ovin est un des plus utilisés (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Evaluation pré-clinique chez le mouton d'accès vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire.

Authors (year)	Vascular graft	Implantation model	Time of implantation (weeks)	Number of subject (per time point)	TEVG inner diameter (mm)	Mean TEVG size (cm)	Puncture	Primary patency rate	Results
Koenneker <i>et al.</i> (2010)	Tissue-derived ECM (bovine internal thoracic arteries). Half of the grafts seeded with autologous endothelial cells.	Unilateral/AV shunt between CA and EJV	12 and 24	28 (14 endo/DC with 6 for 3 mths and 8 for 6 mths for each)	5	N/A	Once/Prior explantation (17G)	No endo: 83 % and 71 % at 12 and 24 weeks ; endo: 100 % and 86 % at 12 and 24 weeks	Intimal hyperplasia limited and calcification for non endothelialized grafts.
Tillman <i>et al.</i> (2012)	Tissue-derived ECM (porcine carotid artery) seeded with autologous endothelial cells	Unilateral/AV shunt between CA and EJV	8 and 24	15 (7 and 8)	5	6	3 times a week after 4 weeks of healing (16G)	73% (at 8 weeks)	Grafts >2 months developed venous outflow stenosis. Stable geometry and cellular healing at puncture site.
Ong <i>et al.</i> (2017)	Synthetics (PGA/PLCL)	Bilateral/AV shunt between CA and JV	4	6	5	5	Once/Prior explantation (16G)	67% (at 4 weeks)	Feasibility of the bilateral ovine model with PTFE control on the contralateral side. Dilatation of the TEVGs.
Geelhoed <i>et al.</i> (2020)	Cell-derived ECM (Tissue capsule)	Unilateral/AV shunt between CA and EJV	4 and 8	8 (4 for each time point)	6	6	N/A	67% (at 8 weeks)	Venous stenosis at anastomotic sites. Patency of TEVG same as ePTFE but much less stenosis after 2 months.
Matsushita <i>et al.</i> (2020)	Synthetics (PCL/PLCL)	Bilateral/AV shunt between CA and EJV	4	4	5	10	N/A	88% (at 4 weeks)	Corrugated TEVG prevented kinking issues. No calcification or aneurysm.
Riboldi <i>et al.</i> (2020)	Synthetics (Silkothane)	Unilateral/AV shunt between CA and EJV	4, 8 and 12	9 (3 for each time point)	6	8	N/A	89% (at 12 weeks)	Inflammation and pseudointima at venous anastomosis sites. Endothelial cells lining the lumen at 90 days.
Matsushita <i>et al.</i> (2022)	Synthetics (PCL/PLCL)	Bilateral/AV shunt between CA and EJV	12	7	5	5	N/A	57 % (at 12 weeks)	Dilation for non-reinforced PCL/PLCL TEVGs but good cell infiltration whereas no dilation for PCL/PLCL reinforced with 2.0 suture with better cell infiltration than the PET/PU coated TEVGs.
Zhi <i>et al.</i> (2022)	Cell-derived ECM (Biotubes)	Unilateral/AV shunt between CA and EJV	12	3	5	15	At 0, 4, 8 and 12 weeks (16G)	100%	Puncture induced no damage or blood leakage, and less than 5 min were needed for hemostasis. Neotima that resembled tunica media of sheep carotid artery.

Les raisons portent sur les similarités de son système vasculaire avec celui de l'humain, en termes de diamètres de vaisseaux et de flux sanguin, mais également en termes de coagulation³¹⁷. De plus, le mouton a des vaisseaux du cou qui sont longs et accessibles, ce qui facilite les études dans cette région par rapport au cochon³²². Enfin, il ne s'agit pas d'un animal de compagnie. Dans le cas de ce travail de thèse, le modèle ovin se présente comme idéal en plusieurs points. Premièrement, il permet d'implanter le substitut dans un contexte allogénique, notre équipe ayant démontré la possibilité de produire de la MAC ovine qui ressemble à la MAC humaine²⁰². Ainsi, nous pouvons produire des substituts vasculaires allogéniques pour cette espèce. Deuxièmement, l'anatomie et la physiologie vasculaires ovines permettent l'étude de notre substitut vasculaire dans un contexte hémodynamique proche de l'humain. Enfin, la faisabilité du modèle bilatéral est bien établie ce qui limite l'effet des variabilités inter-individuelles permettant une analyse plus pertinente et une diminution

du nombre d'animaux utilisés. Tous ces arguments nous ont amenés à étudier le potentiel de notre greffon en tant que pontage artérioveineux, dans un modèle d'implantation bilatéral à court terme chez l'ovin.

3. RÉPONSE DE L'HÔTE À DES ÉCHAFAUDAGES DE MATRICE EXTRACELLULAIRE SYNTHÉTISÉE PAR LES CELLULES

3.1. MEC synthétisée par les cellules en ingénierie tissulaire

3.1.1. *Matrice extracellulaire*

3.1.1.1. *Structure et fonctions*

La matrice extracellulaire est un réseau macromoléculaire complexe présent dans tous les tissus et organes du corps, et dans lequel résident les cellules³²⁹. En plus de servir de support physique aux tissus et aux cellules, la MEC a un rôle biologique qui influence de nombreux phénomènes cellulaires, incluant la croissance, la migration, l'homéostasie ou encore la différenciation³³⁰⁻³³⁴. La MEC est synthétisée par les cellules qu'elle entoure, et varie en quantité, en structure et en composition selon le tissu³³². Cependant, indépendamment de ces variations, la MEC est composée principalement de deux types de macromolécules : les protéoglycanes (PG), qui forment une sorte de gel hydraté comblant l'espace entre les cellules dans le tissu, et les protéines fibreuses et glycoprotéines, dont les plus abondantes sont le collagène, l'élastine, la fibronectine et la laminine³³⁵⁻³³⁷.

Les PG sont composés de glycosaminoglycanes (GAG), polysaccharides liés de manière covalente à une protéine, à l'exception de l'acide hyaluronique^{332,336}. Les GAG peuvent être divisés en deux catégories : les sulfatés (chondroïtine sulfate, héparane sulfate, kératane sulfate) et non sulfatés (acide hyaluronique). Ces polysaccharides sont chargés négativement et sont donc très hydrophiles, ce qui permet une captation et une rétention de l'eau importantes au sein de la MEC. Cette capacité confère ainsi aux matrices une grande résistance à la compression, essentielle dans certains tissus comme le cartilage ou les vaisseaux sanguins³³⁷. Plus généralement, les proportions de fibres de collagène et de PG constituant une MEC confèrent différentes propriétés à cette dernière. Ainsi, une MEC composée d'une importante quantité de fibres de collagène combinée à une faible quantité de PG peut résister à de fortes tensions, alors qu'une plus grande quantité de PG permet une forte résistance à la compression³³⁸.

Le versicane est un des plus volumineux PG et un des plus abondants dans la paroi des vaisseaux sanguins. Cette macromolécule est impliquée dans de multiples processus cellulaires, et il a été montré qu'elle a aussi un rôle dans certaines pathologies du système vasculaire³³⁹. Notamment, une augmentation de sa synthèse ainsi que de son dépôt a été mise

en évidence dans la formation de néointima après des lésions artérielles³⁴⁰. De plus, des indices ont montré une corrélation entre son expression et l'élastogenèse dans des constructions vasculaires issues de l'ingénierie tissulaire. Ces résultats soulignent l'importance de ce PG dans les vaisseaux sanguins et pour la production de substituts vasculaires fonctionnels³⁴¹.

3.1.1.2. Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante de la MEC, et l'élément de structure majeur des tissus³⁴²⁻³⁴⁴. A ce jour, 29 types de collagène sont connus, formant une famille hétérogène^{343,345}. Sont appelées collagène toutes glycoprotéines répondant à trois caractéristiques spécifiques³⁴⁵. La première de ces caractéristiques est la répétition de la séquence d'acide aminés $[Gly-X-Y]_n$. La deuxième caractéristique est la présence de proline et d'hydroxyproline en position X et Y, respectivement. Enfin, la troisième caractéristique est une structure quaternaire spécifique au collagène, avec une triple hélice de pas droit et formée de trois chaînes de polyproline α de même taille.

La biosynthèse du collagène commence par la synthèse de chaînes pro-alpha dans la cytoplasme, et l'enroulement de trois d'entre-elles en triple hélice pour former le procollagène (**Figure 25**)^{338,342}. A l'extérieur de la cellule, les extrémités C et N-terminales du procollagène vont être clivées par des enzymes et former le tropocollagène. Ensuite, des centaines de molécules de tropocollagène vont s'associer pour former des fibrilles, qui vont elles-mêmes former les fibres de collagène une fois associées.

Les fonctions des collagènes ne se limitent pas à un rôle structural dans la MEC, et de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques sont liés à ces protéines. Ainsi, certaines maladies sont causées par des anomalies génétiques de certains types de collagène, comme les chondrodysplasies ou l'ostéogénèse imparfaite³⁴⁴. Aussi, la synthèse et la dégradation du collagène participent à une homéostasie des tissus, et un dérèglement de cet équilibre peut rapidement mener à des processus pathologiques³⁴⁶⁻³⁴⁸. Les protéines de collagène peuvent être réparties en plusieurs types selon leur structure qui leur confère leurs fonctions et la connaissance des propriétés de ces différents types est essentielle pour établir de nouvelles solutions thérapeutiques^{344,349}.

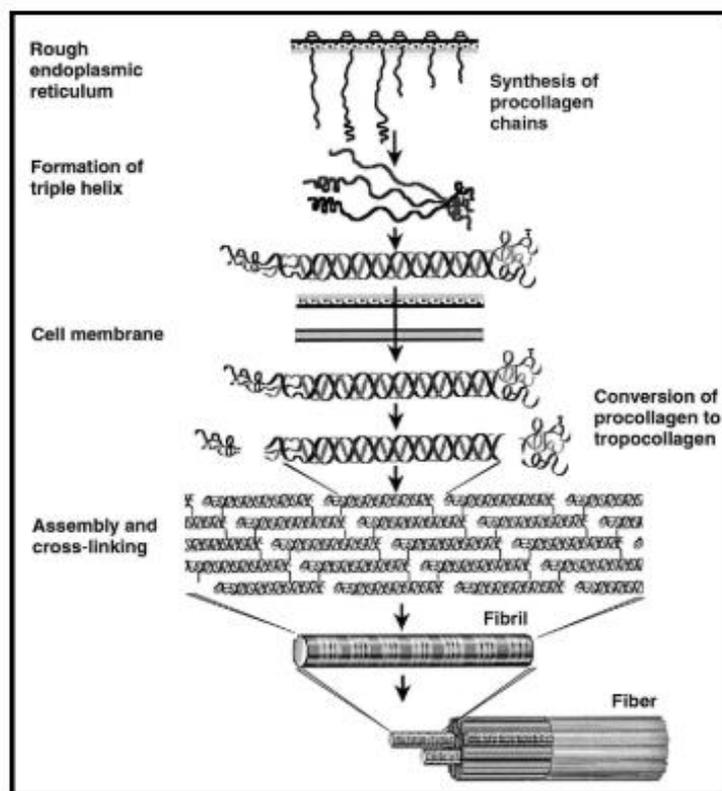


Figure 25 : Représentation de la synthèse, de la sécrétion et de l'assemblage du collagène [338].

Les différents types de collagène sont rassemblés en groupes^{345,349}. Le premier groupe comprend les collagènes fibrillaires, que sont les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Ces collagènes sont abondant dans certains tissus qui ont des rôles mécanique importants comme le derme et les tendons³⁴⁵. Dans un deuxième groupe sont présents les collagènes de la membrane basale, que sont les collagènes de type IV, VII et XXVIII. Dans un troisième groupe se retrouvent les collagènes ayant une triple hélice plus courte que les autres (100 nm contre 300 nm, respectivement) de type VI, VIII, X et XXIX. Dans le quatrième groupe, sont concentrés les collagènes qui remplissent des rôles spécifiques et ajoutent des fonctionnalités en s'associant aux collagènes fibrillaires. Parmi celles-ci, on retrouve les collagènes associés à des fibrilles avec des triples hélices interrompues (groupe nommé FACIT pour *Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices*) qui regroupent les collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX et XXII. On y trouve également les collagènes transmembranaires, qui possèdent des domaines permettant leur insertion dans la membrane plasmique cellulaire (collagènes de type XIII, XVII, XXIII et XXV)^{344,345,349}.

Dans la paroi des vaisseaux sanguins, les collagènes les plus présents sont les collagènes de type I, III, VI, IV, XV et XVIII (**Figure 26**)³⁴⁷. Les collagènes de type I et III sont les deux constituants majeurs des parois des vaisseaux et représentent 90 % du collagène. Les collagènes de type IV, XV et XVIII sont présents au niveau de la membrane basale, alors que le collagène de type VI fait le lien entre la membrane basale et la matrice interstitielle³⁴⁷.

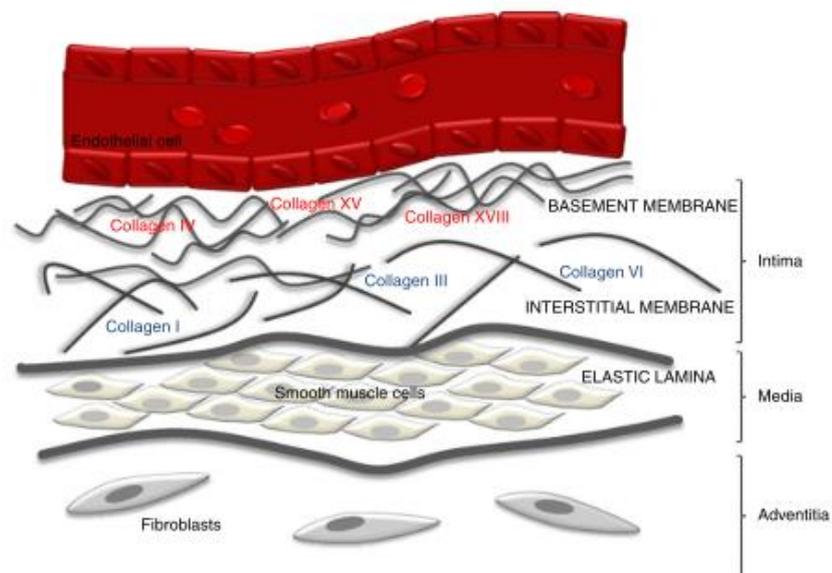


Figure 26 : Représentation schématique de la localisation de la membrane basale et de la matrice interstitielle dans la paroi vasculaire [347].

3.1.1.3. Elastine

La présence de fibres élastiques dans la MEC de certains types de tissus comme la peau, les poumons, le cœur ou encore les vaisseaux sanguins permet une déformation considérable de ces derniers avec un retour à un état basal, sans dommages. Cette propriété leur permet ainsi d'assurer pleinement leur rôle physiologique^{335,338,350}. Les fibres élastiques sont composées d'élastine entourée de microfibrilles, généralement de fibrilline³⁴⁸. L'élastine est un polymère synthétisé à partir de son précurseur monomérique et soluble, la tropoélastine (**Figure 27**). Cette dernière, protéine de 60 à 70 kDa, contient de manière alternée des domaines hydrophobes et des domaines contenant une lysine^{329,348}. La modification des résidus de lysine par la lysyl oxydase permet la réticulation des monomères de tropoélastine en élastine, protéine insoluble. Les domaines hydrophobes sont connus pour être responsables du repliement de la structure protéique pour lui donner les propriétés élastiques des fibrilles résultantes³⁵¹.

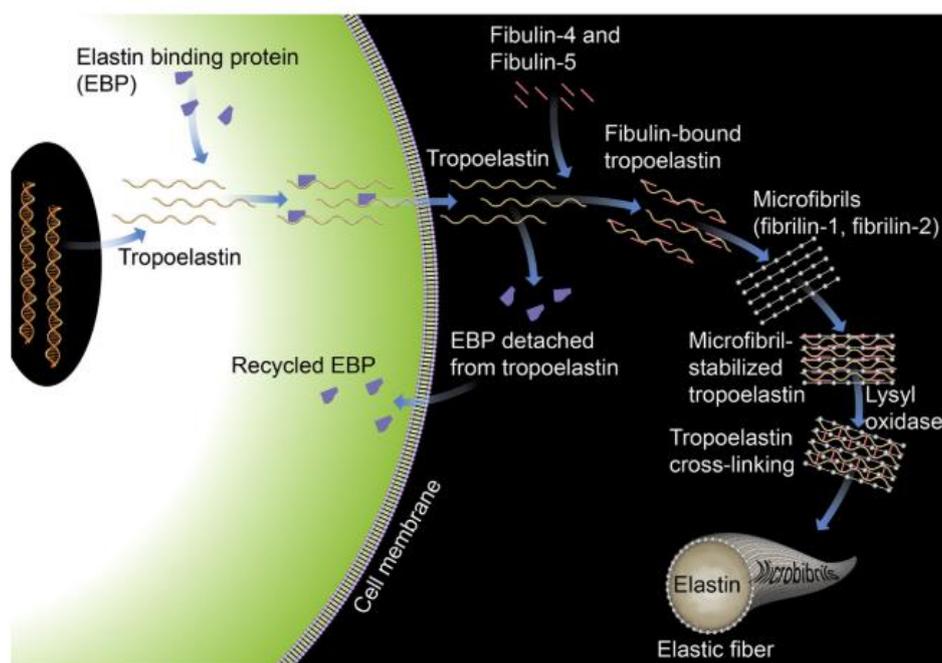


Figure 27 : Illustration de la synthèse de la tropoélastine et de la formation de fibres élastiques [348].

L'élastogénèse, processus d'assemblage des fibres élastiques, est fortement régulé pendant les stades fœtal et néonatal³⁵². Cependant, il est connu que les fibres élastiques endommagées chez les adultes ne sont pas réparées correctement et ne fonctionnent alors pas normalement³⁵³. De plus, bien que quelques types cellulaires soient capables d'assembler des fibres élastiques *in vivo* dans la période fœtale et en tout début de vie (p. ex. CML, fibroblastes, cellules endothéliales), ces cellules ne sont pas capables de le faire spontanément *in vitro*³⁵². Dès lors, dans le but de produire des échafaudages pour l'ingénierie tissulaire contenant de l'élastine, plusieurs stratégies ont émergé. Celles-ci comprennent notamment la purification d'élastine animale, la production de polypeptides avec des motifs élastine, ou encore l'utilisation de tropoélastine recombinante^{188,260,354-357}. Grâce aux efforts faits en ce sens, de multiples constructions issues de l'ingénierie tissulaire et contenant de l'élastine ont été produites et ont démontré des résultats prometteurs dans différentes applications³⁵⁸⁻³⁶³. Cependant, plusieurs limites sont à souligner, à commencer par le caractère insoluble de l'élastine qui rend son extraction et sa manipulation difficiles^{354,356}. La structure non-native des polypeptides aux motifs d'élastine peut quant à elle entraîner une dégradation trop rapide des produits d'ingénierie tissulaire implantés^{356,364,365}. Enfin, le coût important de la tropoélastine recombinante humaine est une limite à son utilisation à grande échelle.

3.1.2. Echafaudages de MEC synthétisée par des cellules en ingénierie tissulaire

Comme mentionné précédemment, la MEC est un composé essentiel des tissus et peut réguler de nombreuses fonctions cellulaires et physiologiques. Cependant, afin de pouvoir assurer ses nombreux rôles, une organisation complexe et spécifique de ses protéines est nécessaire. Dès lors, une des stratégies en ingénierie tissulaire vise à recréer *in vitro* cette structure native afin d'apporter aux cellules les bons signaux et le bon environnement^{296,366}. En raison de la complexité de la MEC, sa fabrication avec des propriétés biochimiques et structurales proches des tissus natifs à partir de matériaux synthétiques ou de protéines isolées chimiquement n'a pas encore été démontrée³⁶⁷. Cette stratégie nécessite l'utilisation d'une MEC directement produite par les cellules, meilleures architectes possibles pour recréer cette structure. Des échafaudages de MEC synthétisée par des cellules sont largement utilisés en ingénierie tissulaire et beaucoup sont commercialisés et ce dans de nombreuses applications, que ce soit dans les domaines orthopédique, cardiovasculaire ou autres (**Tableau 3**)^{300,367-370}. Les MEC produites par les cellules peuvent être regroupées en deux catégories : les MEC issues de tissus natifs et les MEC synthétisées par des cellules *in vitro*.

Exceptés les cas de prélèvements autologues, les MEC issues de tissus natifs ont une origine xénogénique ou allogénique^{366,371}. De ce fait, il peut être nécessaire de recourir à des techniques de décellularisation afin de limiter la réaction immunitaire et d'éviter le rejet par l'hôte une fois la MEC étrangère implantée³⁷²⁻³⁷⁴. Cette réaction immunitaire suite à l'implantation d'un biomatériau sera détaillée dans une des parties suivantes (3.2.2). Ces méthodes de décellularisation peuvent avoir des effets délétères sur la composition ainsi que la structure des MEC^{316,375-379}.

Il existe de nombreuses méthodes de décellularisation, qui ont été plusieurs fois passées en revue, et qui peuvent être chimiques, biologiques ou physiques, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients (**Figure 28**)^{372,380,381}. Les méthodes de décellularisation chimiques utilisent des acides et des bases, des solutions hypotoniques ou hypertoniques, des solvants ou des détergents³⁸¹. Les détergents peuvent être ioniques (p. ex. SDS, désoxycholate de sodium), non ioniques (p. ex. Triton X-100) ou zwitterioniques (p. ex. CHAPS). L'ensemble de ces techniques retirent en général les cellules du tissu efficacement, à l'exception des solutions hypotoniques et hypertoniques, bien que cette efficacité dépende grandement du tissu et de son épaisseur³⁷⁸. Cependant, ces techniques endommagent plus ou moins la

Tableau 3 : Source des tissus, domaine d'application et étapes de traitement post-décellularisation des échafaudages de MEC les plus courants disponibles dans le commerce [414].

(*VentriGel est en cours d'essais cliniques, Glu : glutaraldéhyde, HMDI : hexaméthylène diisocyanate, Gamma : irradiation gamma, E-beam : irradiation par faisceau d'électrons)

Product	Manufacturer	Source Tissue	Application Focus	Form	Crosslinking Agent	Terminal Sterilization
AlloDerm RTM	BioHorizons	Human dermis	Soft tissue, dentistry	Dry	---	---
AlloMax	BD Bard	Human dermis	Soft tissue	Dry	---	Gamma
AlloPatch HD	ConMed	Human dermis	Tendon	Dry	---	---
Avalus	Medtronic	Bovine pericardium	Valve replacement	Hydrated	Glu	Liquid Chemical
Biodesign Hernia Graft	Cook Biotech	Porcine small intestine	Soft tissue	Dry	---	EtO
CardioCel	Admedus	Bovine pericardium	Cardiac tissue	Dry	Glu	Propylene Oxide
DermaSpan	Zimmer Biomet	Human dermis	Soft tissue, tendon	Dry	---	Gamma
FlexHD Pliable	Mentor	Human dermis	Breast	Hydrated	---	---
Fortiva	RTI Surgical	Porcine dermis	Soft tissue	Hydrated	---	Gamma
Freestyle	Medtronic	Porcine heart valve	Valve replacement	Hydrated	Glu	Liquid Chemical
Gentrix Surgical Matrix	Acell	Porcine urinary bladder	Soft tissue	6 Layer	---	E-beam
GraftJacket	Wright Medical	Human dermis	Soft tissue	Dry	---	---
Grafton DBM	Medtronic	Human bone	Bone	Powder	---	---
InteguPly	Aziyo Biologicals	Human dermis	Soft tissue, wound care	Dry	---	Gamma
Meso BioMatrix	DSM	Porcine mesothelium	Soft tissue	Dry	---	EtO
MicroMatrix	Acell	Porcine urinary bladder	Wound care	Powder	---	E-beam
Miroderm	Reprise Biomedical	Porcine liver	Soft tissue	Hydrated	---	E-beam
Oasis Ultra	Cook Biotech	Porcine small intestine	Wound care	3 Layer	---	EtO
Peri-Guard Repair Patch	Baxter	Bovine pericardium	Soft tissue	Hydrated	Glu	Liquid Chemical
Permacol	Medtronic	Porcine dermis	Soft tissue	Hydrated	HMDI	Gamma
ProLayer	Stryker	Human dermis	Soft tissue	Hydrated	---	E-beam
Strattice	LifeCell Corp.	Porcine dermis	Soft tissue	Hydrated	---	E-beam
Trifecta	Abbott	Bovine pericardium	Valve replacement	Hydrated	Glu	Liquid Chemical
TutoPatch	RTI Surgical	Bovine pericardium	Soft tissue	Dry	---	Gamma
Tutoplast Pericardium	Coloplast	Human pericardium	Soft tissue	Dry	---	Gamma
VentriGel*	Ventrix	Porcine ventricle	Cardiac tissue	Hydrogel	---	---
XenMatrix	BD Bard	Porcine dermis	Soft tissue	Hydrated	---	E-beam

structure de la MEC en fonction du type de tissu traité. Ainsi, il y a généralement une perte conséquente de GAG ainsi que de facteurs de croissance³⁸¹⁻³⁸³. Dans les méthodes chimiques se trouve aussi l'utilisation des agents chélateurs (p. ex. acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA))³⁸¹. Cependant, ces derniers sont généralement inefficaces seuls et sont utilisés avec des enzymes (p. ex. nucléases, protéases (ex. trypsine)) qui font partie des méthodes biologiques. Ces enzymes, au-delà de leur efficacité, peuvent être difficiles à éliminer du tissu, et peuvent manquer de spécificité provoquant une modification de l'ultrastructure de la MEC,

avec une perte de constituants comme le collagène, la fibronectine ou les GAG³⁸¹. De ce fait, la modification de l'ultrastructure de la MEC entraîne une modification des propriétés biologiques et mécaniques de cette dernière³¹⁶. Enfin, des techniques dites physiques sont aussi utilisées, incluant la congélation-décongélation, l'application directe d'une force ou l'utilisation d'une pression³⁸¹. L'objectif de ces méthodes est de provoquer la lyse des cellules par formation de cristaux pour la méthode de congélation-décongélation, ou de faire éclater les cellules et de les enlever mécaniquement via l'application d'une force ou d'une pression. Un des inconvénients de ces techniques physiques est l'endommagement de la structure de la MEC³⁸¹.

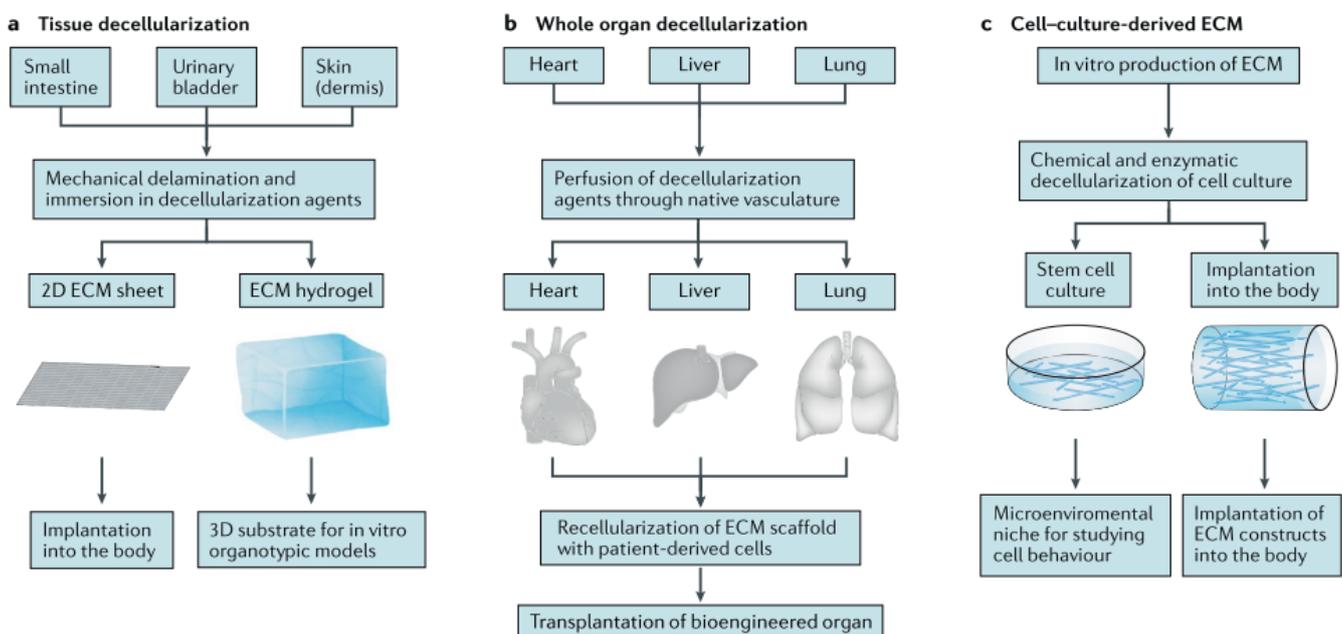


Figure 28 : Stratégies de décellularisation des échafaudages de MEC [367].

Ainsi, bien qu'un des avantages des MEC dérivées des tissus soit ses similarités structurales et mécaniques avec les MEC natives, la dégradation de ses propriétés par les méthodes de décellularisation courantes est une des limites à leur performance. De plus, bien que ces tissus, prélevés chez les animaux ou sur des donneurs, soient grandement disponibles, les variabilités inter-individuelles rendent la reproductibilité de leur qualité difficile à gérer³⁸⁴.

Plusieurs groupes utilisent des MEC synthétisées par des cellules *in vitro*, et ces MEC ont été largement passées en revue³⁸⁵⁻³⁸⁸. Les MEC produites *in vitro* peuvent provenir de deux types cellulaires, les fibroblastes et les CML³⁸⁶. Grâce à une telle approche, il est possible de produire des MEC autologues à partir de cellules du patient lui-même, éliminant ainsi les

risques de réponse immunitaire indésirable. L'utilisation de cette stratégie permet aussi de produire des MEC allogéniques avec une structure ajustable et désirée, et en grande quantité, tout en limitant les différences inter-lots³⁸⁷.

3.2. Réponse immunologique aux échafaudages de MEC

Suite à l'implantation d'un substitut vasculaire, et plus généralement d'un biomatériau, le corps de l'hôte va réagir via plusieurs mécanismes. En ce sens, le système immunitaire, connu pour son rôle de défense de l'hôte, va permettre le rejet, l'acceptation ou l'intégration du substitut, via différentes réponses cellulaires coordonnées.

3.2.1. *Système immunitaire inné et adaptatif*

Le système immunitaire inné permet une réponse immédiate suite à un endommagement des tissus, notamment à la suite de l'implantation d'un biomatériau, et bon nombre de revues de qualité ont été faites sur le sujet³⁸⁹⁻³⁹⁵. Les cellules faisant partie de cette réponse sont les macrophages, les neutrophiles et les cellules tueuses naturelles, entre autres. Ces cellules dérivent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les cellules du système immunitaire inné vont pouvoir répondre à un agent étranger et déclencher une réponse immunitaire via des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptor*).

Les macrophages font partie des cellules les plus étudiées dans une situation de réponse de l'hôte à un biomatériau. Ces derniers sont impliqués, à court et à long termes, dans l'ensemble de la réponse aux biomatériaux et permettent sa modulation via différentes fonctions. Les macrophages sont souvent catégorisés selon leur polarisation dite « M1/M2 » : ils peuvent être considérés naïfs (M0), pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2), et cette polarisation joue un rôle essentiel dans la réponse à un endommagement des tissus³⁹⁶⁻⁴⁰¹. Les macrophages M1 sont stimulés par les agonistes des récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor* (TLR)), par l'interféron gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor alpha* (TNF- α)). Ils ont un rôle pro-inflammatoire et permettent la phagocytose des débris cellulaires et de cellules mortes, ainsi que la présentation d'antigènes³⁹⁹. Ils agissent à travers la sécrétion des interleukines (IL) 1, 6, 12 et 23, et sécrètent le TNF- α , accentuant ainsi la réponse immunitaire. Les macrophages M2 ont un rôle anti-inflammatoire et participent aux processus d'angiogenèse, ainsi qu'à l'assemblage et au remodelage de la MEC³⁹⁹. Les M2 sont classés en différents sous-types. Ainsi, les macrophages

M2a sont stimulés par les IL-4 et 13, et participent au dépôt de MEC ainsi qu'à l'angiogenèse, avec un rôle davantage d'homéostasie qu'anti-inflammatoire^{389,395}. Les macrophages M2b peuvent quant à eux être stimulés via les complexes immuns ou par des agonistes des TLR³⁹⁹. Les macrophages M2c, notamment stimulés par l'IL-10 sécrétée par les macrophages M2a et M2b, ont principalement un rôle de sécrétion des métalloprotéinases matricielles, protéases qui peuvent dégrader les composants de la MEC et ainsi réguler son remodelage^{395,399}. Plus récemment, les M2d et M2_{eff} ont été décrits ; les M2d étant activés par les agonistes des TLR, et les M2_{eff} par l'efférocytose, qui n'est autre que la phagocytose des cellules apoptotiques³⁹⁹. Tous deux ont un rôle pro-angiogénique ainsi qu'anti-inflammatoire.

L'immunité dite acquise, qui permet au système immunitaire de l'hôte de s'adapter à divers agents étrangers, comprend les lymphocytes B, responsables de la réponse humorale, et les lymphocytes T, responsables de la réponse cellulaire^{389,402}. Les lymphocytes B, qui se développent dans la moëlle osseuse et circulent via le système lymphatique et le sang, expriment généralement CD20, CD45 ou encore CD19. Leur rôle est de produire des anticorps⁴⁰². Les lymphocytes T, quant à eux, se développent dans la thymus et circulent ensuite dans la sang ou vers les tissus lymphoïdes périphériques⁴⁰³. Les lymphocytes T régulent la réponse immunitaire, notamment en éliminant des cellules infectées et en activant d'autres cellules immunitaires. Il existe deux grandes catégories de lymphocytes T : les lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T cells*) et les lymphocytes T auxiliaires (*helper T cells*)⁴⁰³. Les lymphocytes T cytotoxiques expriment CD8 et ont pour fonction l'élimination de cellules infectées. Les lymphocytes T auxiliaires, quant à eux, peuvent être catégorisés en deux types : les types 1 (Th1) et les types 2 (Th2). Les Th1 sont généralement associés à une fonction pro-inflammatoire, avec notamment la libération de TNF et d'IFN- γ , qui stimulent les macrophages M1. Ce phénotype est généralement associé à un rejet des implants allogéniques et xénogéniques³⁹². Les Th2 produisent des cytokines IL-4 et IL-5, ayant alors un rôle prépondérant dans la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire^{389,403}. Ce phénotype de lymphocytes T est ainsi davantage associé à une acceptation d'implants non autologues³⁹².

3.2.2. Réponse de l'hôte aux biomatériaux

L'implantation d'un biomatériau déclenche une réponse de l'hôte à un corps étranger, qui est essentielle et va déterminer l'acceptation ou non de ce dernier à long terme, ainsi que

sa fonctionnalité dans un contexte clinique^{402,404,405}. En effet, avant toute chose, un matériau implanté doit être biocompatible et ne pas provoquer de réponse immunitaire adverse de l'hôte. Plus que cela, le matériau doit avoir la capacité de provoquer une réponse immunitaire adaptée dans un contexte clinique particulier⁴⁰⁵. Plusieurs évènements vont suivre l'implantation d'un biomatériau, avec, dans un premier temps, l'initiation de la réponse inflammatoire suite aux dommages causés aux tissus et liés à la chirurgie. Ensuite, les interactions sang-surface du matériau vont entraîner l'adsorption de protéines à la surface de ce dernier et la création d'une matrice provisoire (**Figure 29**)^{394,405}.

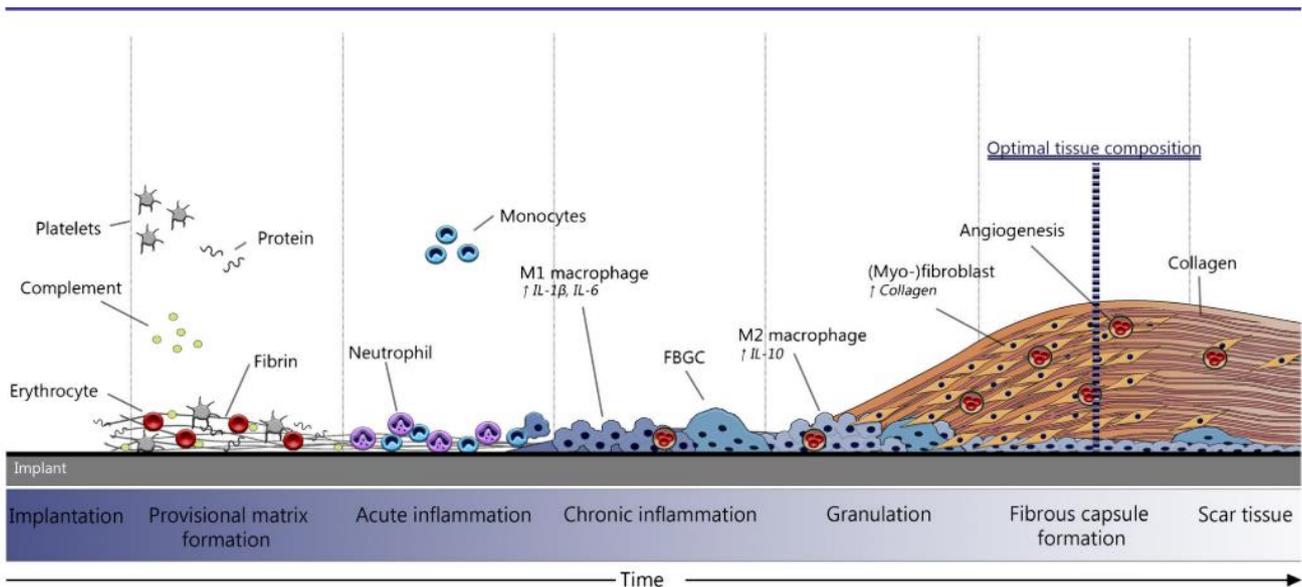


Figure 29 : Vue d'ensemble de la réaction à un corps étranger [184].

Durant les premiers jours de la réponse à l'implantation d'un biomatériau, la phase d'inflammation aiguë prend place, les leucocytes (majoritairement les neutrophiles) étant alors prédominants dans la réponse de l'hôte. Ces derniers sont ensuite remplacés par des monocytes qui vont se différencier en macrophages, puis, après 1 à 2 semaines, éventuellement s'associer et former des cellules géantes³⁹⁴. Ces cellules géantes, en recouvrant l'ensemble de la surface de biomatériaux poreux, peuvent altérer les échanges et la diffusion de molécules entre l'échafaudage implanté et le microenvironnement, compromettant ainsi une réponse favorable de l'hôte. La persistance de signaux inflammatoires suite à la phase d'inflammation aiguë mène à une phase d'inflammation chronique³⁹⁴. Cette réaction reste localisée au niveau du site d'implantation, et est caractérisée par la présence de lymphocytes et de cellules plasmiques, ainsi que de

macrophages qui vont sécréter un ensemble de facteurs agissant sur cette phase inflammatoire^{394,402}.

Dans les premiers jours suivant l'implantation d'un biomatériau débute la mise en place d'un tissu de granulation, caractérisé notamment par la prolifération de fibroblastes et de cellules endothéliales³⁹⁴. Grâce à ces dernières, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment. Les fibroblastes, quant à eux, prolifèrent et synthétisent du collagène (en particulier de type I) ainsi que des protéoglycanes. Durant cette phase de granulation, des myofibroblastes peuvent aussi être présents et sont alors responsables de la contraction de la lésion. Enfin, le dernier stade de réponse à l'implantation d'un biomatériau en ingénierie tissulaire mène soit au remplacement du tissu lésé par des cellules et un néotissu, soit par la mise en place d'une capsule fibreuse³⁹⁴.

La durée et l'intensité de la réponse de l'hôte à l'implantation d'un biomatériau dépendent de plusieurs facteurs incluant la taille, la forme ainsi que les propriétés physicochimiques du matériau³⁹⁴. Si l'inflammation en réponse au matériau est chronique, le remodelage de ce dernier ne sera pas adapté⁴⁰⁶. Ainsi, une des stratégies actuelles est de développer des biomatériaux immunomodulateurs, qui, de par leurs propriétés, vont favoriser une réponse immunitaire qui va promouvoir un remodelage fonctionnel du tissu⁴⁰⁷⁻⁴¹⁰.

3.2.3. *Echafaudages de MEC en études pré-cliniques et cliniques*

3.2.3.1. *MEC dérivée de tissus natifs*

Afin de pallier au manque de disponibilité évident des tissus autologues, les échafaudages de MEC dérivée de tissus xénogéniques et allogéniques sont grandement étudiés et utilisés. Cependant, ces matériaux, étrangers à l'hôte, ont un caractère immunogène qu'il est nécessaire de réduire afin d'envisager une implantation chez l'humain³⁹². En effet, bien que les protéines de la MEC soient relativement conservées entre les mammifères, la présence de matériel génétique non-autologue ainsi que de certains antigènes entraîne le rejet des xéno- ou allogreffes^{392,411}. Dans le cas des xénotransplantations, notamment, la présence de l'épitope galactose- α -1,3-galactose (α -Gal) à la surface des cellules des mammifères représente une barrière immunologique majeure¹²⁴. En effet, le gène de l'enzyme responsable de la synthèse de l' α -Gal est inactivé chez les Catarhiniens (« singes de l'Ancien Monde ») et les humains. Dès lors, la reconnaissance de cet antigène par l'hôte entraîne la production d'anticorps anti-Gal par le système immunitaire, et

est une des causes principales du rejet hyperaigu des xéno greffes^{124,392,412}. Afin de réduire cette réponse immunologique aux matériaux xéno- et allogéniques, différentes stratégies existent afin de conserver la MEC native et ses molécules de signalisation, tout en supprimant le matériel cellulaire. Notamment, plusieurs méthodes de préparation du matériau, de décellularisation et post-décellularisation peuvent être utilisées. Cependant, ces dernières ont une influence sur le matériau et la réponse immunitaire de l'hôte à son implantation^{375,376,413,414}.

L'une d'elles consiste en la réticulation du matériau au glutaraldéhyde (GA) afin de masquer les antigènes, évitant leur reconnaissance par le système immunitaire, tout en augmentant la force mécanique du matériau^{124,412,415}. Cette technique, utilisée depuis plusieurs dizaines d'années, augmente la biocompatibilité du matériau tout en augmentant sa force mécanique et réduisant sa vitesse de dégradation. De plus, ce procédé assure sa stérilisation ainsi que sa bonne conservation. Cependant, cette stratégie est régulièrement associée à un masquage incomplet de l' α -Gal, stimulant alors le système immunitaire de l'hôte⁴¹⁶. De plus, ce manque d'efficacité du GA à masquer les antigènes mène à une calcification du matériau, délétère à long terme pour la fonctionnalité de ce dernier^{416,417}.

L'utilisation de polyphénols, comme le pentagalloyl glucose (PGG), a également été étudiée afin de traiter des tissus xénogéniques, notamment pour des applications cardiovasculaires⁴¹⁸⁻⁴²³. Dans un des travaux du groupe de Simionescu, les performances de péricardes porcins décellularisés et traités au GA ou au PGG sont comparées⁴¹⁹. Les résultats montrent une stabilisation du collagène par le GA, mais une calcification et une absence de remodelage du tissu une fois implanté en sous-cutané chez le rat après 3 semaines. Les tissus traités au PGG ont démontré des propriétés mécaniques fortes, une absence de calcification une fois implantés, ainsi qu'un remodelage de la MEC avec la présence de fibroblastes de l'hôte. Cependant, il a été montré *in vitro* qu'après 7 jours en présence de collagénase, le collagène des matrices traitées au PGG se dégrade davantage que celles traitées au GA (perte de masse de 16 % contre 5 %, respectivement). Bien que ce phénomène favorise le remodelage du tissu *in vivo*, cela pourrait être responsable à moyen terme de la perte de force mécanique du greffon et, ainsi, de l'échec de l'implantation comme c'est le cas avec tous les matériaux dégradables. Des études à plus long terme sont donc nécessaires afin d'évaluer l'influence de la vitesse de dégradation des fibres de collagène. Dans une autre étude, des

artères rénales porcines ont été décellularisées et traitées avec du PGG afin de stabiliser l'élastine, ainsi qu'avec du carbodiimide, un agent réticulant utilisé pour stabiliser les fibres de collagène⁴²². Les artères ont été implantées dans l'aorte de rats pendant 8 semaines, et les résultats ont montré une réduction de la dégradation de l'élastine ainsi qu'une absence de dilatation des vaisseaux. Cependant, il est à noter que de la calcification a été mise en évidence dans la néointima mais pas dans le greffon initial⁴²².

Les agents utilisés afin de fixer les tissus xénogéniques et de masquer leurs antigènes rendent les implants incompatibles avec une repopulation cellulaire ainsi qu'un remodelage. En effet, l'hôte ne peut pas reconnaître la MEC du tissu fixé comme étant un échafaudage biologique natif, et ne peut ainsi pas procéder à permettre une intégration et au remodelage de celui-ci. Afin de dépasser cette limitation et de préserver le microenvironnement natif de la MEC, des méthodes de décellularisation sont utilisées dans le but de retirer l'ensemble des composants cellulaires et des débris antigéniques pouvant causer une réaction immunitaire sévère.

Des matériaux biologiques décellularisés, comme la SIS ou la MEC issue de vessie de porc, ont été investigués par divers groupes et ce pour de multiples applications. A ce jour, des produits à base de ces MEC porcines décellularisées sont commercialisés, notamment pour des applications visant des tissus mous³⁸¹. Des échafaudages de SIS décellularisée ont été implantés chez le rat et la réponse immunitaire a été comparée à celle dirigée contre des échafaudages de SIS décellularisées et réticulées³⁹⁸. Les résultats de cette étude ont mis en avant l'absence de dégradation par les macrophages de la SIS réticulée. Dans une étude semblable mais à plus long terme, des analyses immunohistochimiques ont mis en avant des cellules positives principalement au CD163 (phénotype M2 anti-inflammatoire) après 16 semaines pour l'échafaudage de SIS décellularisée, avec présence d'un remodelage³⁹⁶. Au contraire, des cellules principalement positives au CD80 et à CCR7 (phénotype M1 pro-inflammatoire) ont été mises en avant dans la réponse à la SIS réticulée après 16 semaines d'implantation, avec présence d'une inflammation chronique. Ces résultats mettent en évidence l'absence d'interactions entre la matrice de SIS réticulée et l'hôte, empêchant un remodelage fonctionnel du matériau. Des MEC décellularisées issues de vessies porcines ont également été montrées comme provoquant une réponse inflammatoire pro-régénérative dans plusieurs modèles, à l'inverse de MEC traitées au GA, notamment^{397,424}. Cependant, la

méthode de décellularisation utilisée et l'efficacité de cette dernière a aussi été montrée comme ayant un effet prépondérant sur la réponse des macrophages et leur phénotype, pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2). Ainsi, une association étroite existe entre l'efficacité de la méthode de décellularisation et le remodelage *in vivo*³⁷⁶. Récemment, une étude a mis en avant des phénomènes d'inflammation, d'absence de recellularisation dans un produit commercialisé fait à base de SIS décellularisée et utilisée en tant que valve cardiaque chez le mouton⁴²⁵. Malgré le fait qu'elle n'ait pas été réticulée, seul un remodelage limité a été montré. Ces résultats appuient le fait que l'efficacité et le devenir de matériaux biologiques implantés dépendent, en plus de leurs traitements, de l'application qui sera la leur, du tissu dans lequel ils seront implantés et de la fonction physiologique qu'ils devront suppléer.

Ainsi, même après utilisation de méthodes de décellularisation usuelles, l'antigénicité de tissus biologiques acellulaires peut persister et stimuler la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Des méthodes de « retrait d'antigène » (*Antigene removal*), au-delà de la volonté de retirer les cellules, ont été développées⁴¹². Parmi celles-ci, une méthode de retrait séquentielle d'antigènes hydrophiles et lipophiles a été démontrée comme prometteuse. Brièvement, la méthode consiste en l'incubation du tissu pendant 48 heures dans une solution de solubilisation des antigènes hydrophiles, suivie d'une incubation pendant 48 heures dans une solution d'amidosulfobetaine-14, ayant pour but de solubiliser les antigènes lipophiles^{412,426,427}. Ces antigènes résiduels ont été démontrés comme déterminant dans la réponse immunitaire à une matrice xénogénique implantée^{428,429}. En plus de réduire le taux d'antigènes lipophiles, à la différence des méthodes de solubilisation unique des antigènes hydrophiles, et contrairement à la fixation au GA ou à la décellularisation au SDS, il a été montré que cette méthode permet la conservation de l'architecture native de la MEC, évitant ainsi l'encapsulation fibreuse et favorisant une réponse immunitaire favorable^{313,430}. Notamment, l'utilisation de cette méthode de retrait d'antigènes a été utilisée et démontrée dans le cas d'applications cardiovasculaires^{299,313-315}. Ainsi, des veines saphènes bovines traitées via cette méthode ont été implantées chez le lapin³¹⁴. Dans un premier modèle, quatre groupes ont été implantés dans un modèle sous-panniculaire jusqu'à 8 semaines : des veines allogéniques, des veines bovines non traitées, des veines décellularisées au SDS et des veines traitées avec la méthode de retrait d'antigènes décrite³¹⁴. Les résultats ont montré que

ce dernier groupe est celui ayant subi la plus faible infiltration de lymphocytes, tandis que l'encapsulation fibreuse n'a pas été démontrée comme différente de celle des greffons allogéniques. Dans un second modèle, des veines saphènes traitées de la même manière, d'un diamètre interne inférieur à 3 mm, et divisées en deux groupes ont été implantées en interposition dans la veine jugulaire de lapins jusqu'à 35 jours : un groupe avec la membrane basale faisant face au flux sanguin, un groupe avec la membrane basale absente de la lumière (les veines saphènes ont été retournées sur elles-mêmes). Deux autres groupes ont été implantés dans le même modèle : des veines autologues et des veines bovines non traitées. Les résultats ont montré une perméabilité des veines traitées et avec la membrane basale faisant face au flux sanguin similaire aux vaisseaux autologues (100 %), et largement supérieure aux veines traitées et sans membrane basale (20 %) ainsi qu'aux veines non-traitées (50 %)³¹⁴. Les veines traitées ont provoqué une infiltration lymphocytaire inférieure à celle des substituts bovins non-traités, bien que supérieure à celle des greffons autologues. Enfin, la quantification de cellules endothéliales après 35 jours d'implantation a mis en évidence l'importance de l'intégrité de la membrane basale des vaisseaux dans la perméabilité des substituts vasculaires. En effet, les cellules positives au CD31 ont été montrées comme plus nombreuses dans le groupe de veines traitées et avec la membrane basale interne au vaisseau, comparées au groupe sans membrane basale interne, et au groupe de veines bovines^{314,315}. Ces résultats, bien que prometteurs, nécessitent d'être démontrés à plus long terme et dans un modèle artériel de gros animal afin de se rapprocher de conditions physiques et hémodynamiques rencontrées en clinique.

La modification génétique est une stratégie qui a également été étudiée pour réduire l'antigénicité de matrices biologiques. En effet, certains groupes ont génétiquement supprimé l'antigène α -Gal dans des tissus cardiovasculaires implantés en produisant un modèle porcin α -Gal KO^{431,432}. Implantés chez le mouton et le babouin, les tissus ont démontré des propriétés hydrodynamiques *in vitro* ainsi qu'une fonctionnalité des valves *in vivo* comparables à celles des tissus prélevés chez un modèle porcin non modifié^{431,432}. Bien qu'une preuve de concept de l'implantation d'un cœur porcin chez le babouin pendant 6 mois ait été faite, tous les greffons ont développé des microangiopathies thrombotiques, sans élucidation précise de la cause de ces dernières⁴³². Dès lors, on peut penser qu'il y a d'autres antigènes qui ont un rôle important dans l'antigénicité des tissus xénogéniques. De plus amples et plus longues études

sont nécessaires afin de trouver ces éventuels autres antigènes et d'évaluer la sûreté et la possibilité d'utiliser de tels modèles.

Bien que de nos jours de nombreux produits à base de MEC native, animale ou humaine, sont commercialisés et utilisés en clinique, l'utilisation de MEC dérivées de tissus natifs présente quelques limites^{390,414}. L'une d'elle porte sur la disponibilité limitée des tissus cadavériques humains, les tissus allogéniques ayant un potentiel immunogène moins important que les tissus xénogéniques. Ainsi, cette limitation mène à l'utilisation de MEC dérivées de tissus animaux. Or, les tissus xénogéniques, en plus du risque de rejet accru, entraînent un risque de transmission de maladies. De plus, les MEC dérivées de tissus ont une composition spécifique liée à leur fonction, et peuvent être grandement variables d'un individu à l'autre, entraînant le contrôle qualité difficile³⁹⁰. Le développement de MEC synthétisées par des cellules *in vitro* répond à certaines de ces limitations. En effet, ces MEC sont produites à souhait et à partir de cellules disponibles et faciles à obtenir, les rendant disponibles au besoin. De plus, elles peuvent être produites à partir de différentes sources cellulaires, permettant la synthèse de MEC allogéniques et spécifiques à certains types de tissus ou à certaines fonctions. Enfin, ces MEC peuvent être décellularisées, faisant d'elles des matériaux polyvalents et au potentiel immunogène réduit par rapport aux tissus xénogéniques³⁸⁵.

3.2.3.2. MEC synthétisée par des cellules *in vitro*

Comme discuté dans la partie 2.2.1.2, le groupe de recherche de Tranquillo a produit *in vitro* des MEC synthétisées par des cellules en ensemençant des fibroblastes du derme dans du fibrinogène. De la thrombine est ensuite ajoutée afin de former un échafaudage en gel de fibrine contenant les fibroblastes²⁰⁶. Des substituts vasculaires à base de cette MEC ont été implantés dans un contexte allogénique chez l'ovine²⁰⁷. Après décellularisation de leur MEC au SDS, au Triton X-100 puis à la DNase, les résultats *in vitro* ont montré que ce traitement n'a que peu changé les propriétés générales des greffons. Cette décellularisation a conduit à une réduction de la quantité d'ADN de plus de 90 %, avec une absence d'activation des lymphocytes au contact de cellules mononucléaires sanguines allogéniques *in vitro*. Après 8 semaines d'implantation en interposition dans l'artère fémorale de moutons, des macrophages ainsi que des lymphocytes T ont été mis en évidence dans les régions acellulaires des substituts, avec la présence de cellules positives à l' α -SMA²⁰⁷. Après 24 semaines, une

recellularisation complète aux cellules positives à l' α -SMA a été démontrée, avec une faible présence de cellules positives au CD45, marqueur de leucocytes. Également discutée précédemment, leur étude chez le primate non-humain a démontré une perméabilité primaire de 83 % et 60 % à 3 et 6 mois, respectivement¹⁷. La mise en évidence d'une recellularisation consécutive des substituts, accompagnée d'une absence de sténose, de perte de résistance mécanique et de calcification dénote l'absence de réaction immunitaire adverse. De plus, cette observation indirecte a été confirmée par des concentrations en lymphocytes T et en immunoglobulines E, G et M non élevées par rapport aux valeurs seuils. Ainsi, ces études mettent en avant le faible caractère immunogène ainsi que la capacité de remodelage de MEC allogéniques produites *in vitro* et décellularisées au SDS.

Comme décrit également dans la partie 2.2.1.3, Niklason et son groupe ont produit des MEC synthétisées par des cellules *in vitro*, en ensemençant des CML sur un échafaudage en PGA, suivi de semaines de maturation en bioréacteur²²⁴. Après avoir montré la faisabilité de l'approche dans un contexte autologue, l'idée fut de transférer la méthode vers une approche allogénique, afin de dépasser l'ensemble des limitations des approches autologues²²⁵⁻²²⁷. Le groupe a alors démontré sa capacité à produire des MEC synthétisées par des cellules allogéniques, décellularisées au CHAPS ainsi qu'au SDS^{228,229}. Les résultats ont montré que ce type de décellularisation induit une perte de force mécanique dans les MEC, qui reste cependant non significative^{297,298,433}. De plus, elle induit une modification de la structure de la MEC, avec notamment une perte de GAG⁴³³. Le groupe a étudié l'implantation d'une MEC synthétisée par des cellules allogéniques. Ainsi, ils ont implanté chez le cochon des substituts vasculaires faits par des cellules de la même espèce, et ensemençés de cellules endothéliales autologues, c'est-à-dire de l'animal implanté lui-même²²⁸. Les résultats ont montré une perméabilité supérieure pour les substituts produits *in vitro* par rapport aux veines jugulaires autologues implantées (100 % vs 38 %, respectivement), bien que la réponse immunitaire n'ait pas été étudiée plus en détails. En effet, dans le cas de l'implantation de ces MEC synthétisées par des cellules *in vitro* en tant que substituts vasculaires, plus que l'immunogénicité du matériau elle-même, ce sont les effets fonctionnels de l'implantation qui sont étudiés, comme l'hyperplasie intimale, la dilatation et la survenue d'anévrismes, ainsi que la calcification. Ainsi, dans des modèles allogéniques canin et babouin, aucune de ces conséquences n'a été observée, supportant l'idée de la non-immunogénicité de la MEC^{229,230}.

Ces résultats sont d'autant plus prometteurs dans le modèle de babouin qui, contrairement au modèle canin, n'incluait pas un ensemencement de cellules endothéliales autologues. Le groupe a ensuite pu implanter ses MEC en tant que substituts vasculaires chez des patients²³²⁻²³⁴. Bien qu'il soit évident que les analyses histologiques sur ces substituts implantés chez des patients soient difficiles voire impossibles à différents temps, certaines ont pu être effectuées sur certains segments de greffons²³³. Ainsi, des cellules positives à l' α -SMA et au CNN1, mettant en évidence le caractère contractile des CML matures, ont été observées, tout comme la mise en place d'un endothélium avec des cellules positives au CD31, à la VE-cadhérine et à eNOS à partir de 16 semaines²³³. Les différentes études cliniques menées par le groupe participent à démontrer que l'utilisation de MEC allogéniques acellulaires produites *in vitro* ont un potentiel non-immunogène, fonctionnel et de remodelage lorsqu'elles sont utilisées et implantées en tant que substitut vasculaire^{19,232-235}. Sur la base de l'ensemble de ces résultats, une structure commerciale (Humacyte®) a été créée pour la production de ces greffons. En 2021, plus de 500 patients ont reçu le greffon produit par Humacyte®, à travers 7 essais cliniques⁴³⁴. L'entreprise a récemment terminé le recrutement de patients pour étudier l'utilisation du greffon en tant qu'accès vasculaire pour hémodialyse dans un essai clinique de phase 3. Le greffon développé par Niklason et son entreprise Humacyte® est actuellement le substitut le plus avancé en ingénierie tissulaire vasculaire.

Hoerstrup et son groupe ont produit des MEC synthétisées en 4 semaines par des cellules *in vitro* en ensemençant, à l'aide de fibrine, des fibroblastes sur des échafaudages de PGA⁴³⁵. Les applications visées par ce groupe sont cardiovasculaires, notamment avec la création de valves cardiaques issues de l'ingénierie tissulaire (TEHV). Une fois produites, ces valves sont décellularisées à l'aide de Triton X-100 et de désoxycholate de sodium. Dans une étude préliminaire, ces TEHV faites à partir de cellules humaines puis décellularisées ont été implantées pendant 8 semaines dans un modèle de primate. Les résultats ont montré une repopulation cellulaire rapide en comparaison aux valves cardiaques humaines décellularisées⁴³⁵. Le groupe a ensuite implanté pendant 24 semaines dans un contexte allogénique des TEHV faites à partir de cellules ovines⁴³⁶. Les résultats après 24 semaines ont montré des quantités de collagène et de glycosaminoglycanes non différentes de celles des valves natives. Dans une étude postérieure, ces TEHV ont été implantées pendant un an chez l'ovin⁴³⁷. Les résultats de cette étude ont montré une augmentation significative de la quantité

d'ADN dans les valves après un an, comparée à celle dans le contrôle non-implanté. De même, la quantité de collagène était significativement supérieure après un an, alors que la quantité de GAG n'était pas différente. Il est à noter que des microcalcifications associées aux résidus de polymères ont été observées⁴³⁷. Le groupe a récemment comparé la réaction de l'hôte à deux générations différentes de leurs TEHV aux géométries différentes. En effet, la première possède une géométrie « simple », la seconde une géométrie optimisée⁴³⁸. Dans ce travail, deux types de TEHV faites à partir de cellules ovines ont été implantées chez l'ovine jusqu'à 52 semaines. Dans la première génération, une réaction inflammatoire chronique a été observée avec la présence de macrophages de type M1 et M2, notamment, menant à une insuffisance valvulaire. Dans la seconde génération, une réponse immunitaire moindre, avec moins de macrophages notamment, a été démontrée⁴³⁸. Ces résultats démontrent que, au-delà de la MEC elle-même et des méthodes par lesquelles elle est traitée, la géométrie de l'implant fait à base de ladite MEC peut avoir une influence sur la réponse immunitaire de l'hôte et, ainsi, sur le succès du greffon à long terme.

Plusieurs équipes utilisent la décellularisation dans le but de diminuer l'antigénicité des tissus xénogéniques ou allogéniques. Cependant, cette dernière altère la structure de la MEC, altération qui peut mettre à mal le remodelage et le devenir du greffon. Afin d'éviter l'altération de la structure de la MEC par les méthodes de décellularisation, L'Heureux et son groupe ont fait le choix d'utiliser la dévitalisation. Ce processus, comprenant des étapes de congélation/décongélation, séchage, puis réhydratation, tue les cellules présentes et rend le tissu « non-vivant », sans altérer significativement son ultrastructure¹⁹⁴. Les résultats des implantations de la MEC Assemblée par les Cellules *in vitro* de L'Heureux, la MAC, ont déjà été discutés dans la partie 2.2.1.1. Ainsi, en 2006, l'équipe a implanté des substituts vasculaires, faits à partir de MAC humaine roulée, dans des modèles canin, de rat et de babouin immunosupprimés¹⁹¹. Les résultats ont montré une perméabilité des vaisseaux implantés, ainsi qu'une intégration du tissu chez l'hôte. En effet, des cellules positives à l' α -SMA ont été mises en avant, ainsi qu'un dépôt important de fibres de collagène, de fibres élastiques, et la présence d'un endothélium. A la suite de ces indices démontrant un remodelage positif et lent du greffon, L'Heureux et son équipe ont implanté leur matériau sous forme d'implants vasculaires chez des patients humains. Dans une première approche, des greffons faits de MAC autologue vivante et endothélialisée ont été implantés en tant que pontage

artérioveineux chez 10 patients. Des résultats prometteurs ont été obtenus dans une population de patients très difficile^{18,193}. Comme prévu, il n'y pas eu de réponse immunitaire adverse à ce matériau fait à partir de cellules du patient. Par la suite, un vaisseau fait de MAC autologue dévitalisée a été implanté en urgence chez un patient nécessitant un accès vasculaire, sans réaction immunitaire indésirable après plusieurs semaines³⁴. En effet, la dévitalisation a permis le stockage du greffon pendant plusieurs mois, pour permettre au patient de récupérer d'une maladie grave qui avait empêché l'implantation à la date prévue. Ce cas a permis de montrer la possibilité de produire des greffons en amont du besoin. Cependant, dans l'idée de pouvoir transférer plus facilement ces travaux vers la clinique, des greffons faits de MAC dévitalisée et allogénique ont été implantés chez 3 patients³². Dans ces travaux, aucune dégradation des greffons, ni de dilatation, n'ont été observées jusqu'à 11 mois. La fonctionnalité de ces derniers est ainsi un signe indirect de non rejet des implants allogéniques dévitalisés. De plus, aucune preuve de réponse immunitaire indésirable n'a été détectée basé sur les taux d'anticorps réactifs au panel ainsi que sur les résultats de la réaction lymphocytaire mixte, dans laquelle des lymphocytes du receveur sont mis au contact des lymphocytes du donneur³². Ces résultats démontrent le potentiel non-immunogène de ces MAC dévitalisées, faisant de la décellularisation une étape qui n'est plus nécessairement requise avant l'implantation de MEC synthétisées par des cellules.

Pris ensemble, les résultats des travaux de ces différentes équipes montrent qu'une réponse inflammatoire légère et permettant le remodelage des greffons peut être obtenue avec différentes méthodes de décellularisation. Par contre, les travaux de L'Heureux suggèrent que celle-ci n'est pas nécessairement requise selon la source de la MEC et le contexte d'implantation. Ainsi, la dévitalisation s'avère être une méthode prometteuse permettant d'implanter une matrice biologique sans la dénaturer. Cependant, l'ensemble de ces études sur les matrices produites *in vitro* s'attardent beaucoup sur la fonctionnalité de l'implant, et non sur la réponse immunitaire de l'hôte de manière précise. Ainsi, de plus amples études sur cet aspect immunitaire sont nécessaires afin de comprendre la réaction de l'hôte à l'implantation d'une MEC synthétisée par des cellules *in vitro*.

4. APPROCHE TEXTILE : VERS DES SUBSTITUTS VASCULAIRES MODULABLES

4.1. Approche d'assemblage textile pour les dispositifs médicaux

Les technologies textiles sont grandement utilisées dans l'industrie afin de produire des textiles médicaux utilisés quotidiennement par les cliniciens, comme des filets pour traiter les hernies, les prolapsus d'organes pelviens ou encore les prothèses vasculaires, tel que résumé dans des revues d'autres groupes^{136,439-441}. Les technologies textiles permettent, via certains paramètres liés au matériau et à la technique d'assemblage, d'influencer les propriétés du produit final. Trois principales méthodes textiles sont connues, permettant de réaliser des surfaces à partir de fils : le tricotage, le tressage et le tissage^{442,443}. Le tricotage repose sur l'entrelacement de boucles de fils. Les structures tricotées sont compliantes et flexibles, cependant, elles ont une porosité élevée. Le tressage permet l'entrecroisement de fils, disposés diagonalement par rapport au bord de la fabrication⁴⁴³. Les structures tressées ont des propriétés mécaniques fortes et une bonne flexibilité. Cependant, un désavantage de cette technique est la faible porosité des structures, pouvant limiter l'infiltration cellulaire⁴⁴⁰.

Le tissage, quant à lui, consiste en le croisement orthogonal de deux ensembles de fils : les fils de chaînes (dont le nom technique anglais est *warp*) et les fils de trame (*weft*) (**Figure 30**)⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶. Les fils de chaîne s'étendent dans le sens longitudinal du tissu, alors que les fils de trame sont perpendiculaires à ces derniers. Ces deux ensembles de fils sont entrelacés

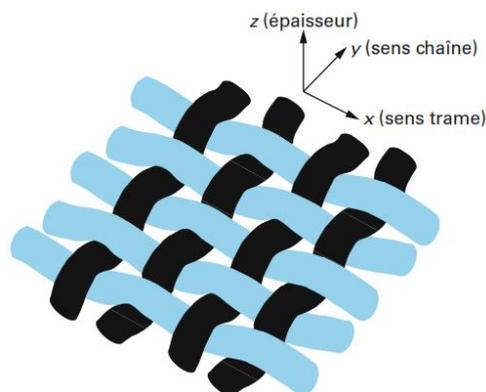


Figure 30 : Schéma d'un tissu toile [442].

à l'aide d'un métier à tisser, qui peut avoir différentes formes et être adapté à la structure tissée souhaitée. Le tissage est une méthode qui requiert plusieurs étapes, et les performances du tissu produit dépendent de plusieurs paramètres, notamment : les

caractéristiques des fils utilisés (p. ex. épaisseur, propriétés mécaniques), la densité des fils de chaînes et de trame, la tension mise dans les fils lors du tissage, et le motif d'armure^{444,447,448}. Le motif d'armure correspond à la manière dont sont entrelacés les deux ensembles de fils. Il existe trois armures couramment utilisées (**Figure 31**) : la toile (*plain weave*), le sergé (*twill weave*) et le satin (*satin weave*). Ces armures se distinguent par la fréquence d'entrelacement des fils. L'armure toile présente la fréquence d'entrelacement la plus élevée, alors que l'armure satin présente la fréquence la plus faible. L'armure toile présente une géométrie qui lui confère une intégrité structurale forte ainsi qu'une ductilité élevée. En revanche, l'armure satin, de par ses entrelacements moins nombreux, entraîne une distorsion plus importante des fibres et présente une structure plus fragile^{442,444}. Le sergé se situe entre les deux armures précédentes. Le tissage est adaptable et permet la production de fabriques faiblement poreuses et perméables, tout en étant automatisable⁴⁴⁹. Cependant, un désavantage important du tissage est que les structures produites sont peu compliantes, propriété mécanique importante pour le succès d'un greffon vasculaire à long terme, comme discuté précédemment (partie 1.3.5).

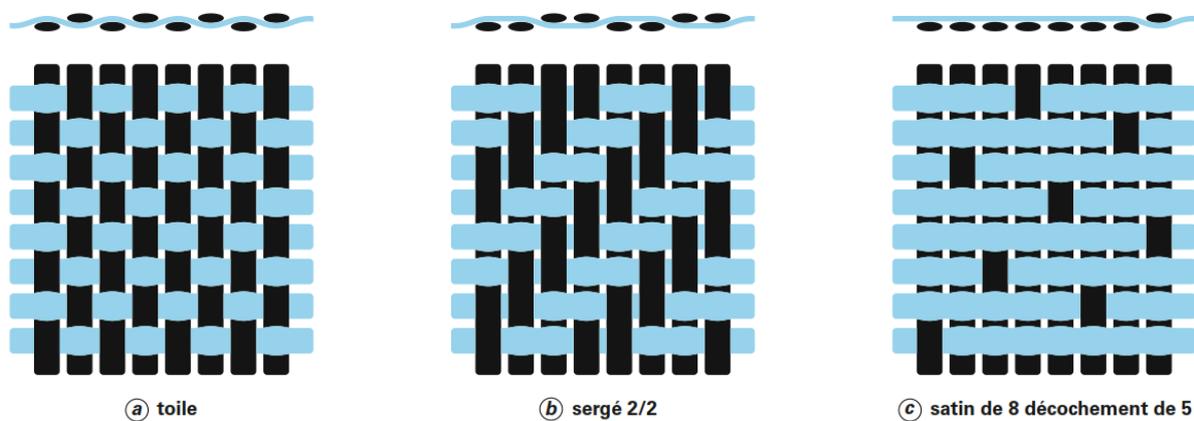


Figure 31 : Schéma de trois armures différentes de tissus [442].

4.2. Les biotextiles

Au début des années 1980, le terme de « biomatériau » a été défini par le Professeur Williams de l'université de Liverpool comme « un matériau non vivant, utilisé dans la fabrication de dispositifs médicaux et destiné à réagir avec les systèmes biologiques »⁴⁴¹. En se basant sur cette définition, le Professeur King de l'université de Caroline du Nord a défini les « biotextiles » comme étant des « structures composées de fibres textiles et produites

pour une utilisation dans un environnement biologique spécifique, où leurs performances dépendent de leurs interactions avec les cellules et les fluides biologiques, et sont mesurées en termes de biocompatibilité et biostabilité »⁴⁴¹. Ces biotextiles ont un fort potentiel en ingénierie tissulaire. En effet, plusieurs groupes ont utilisé des stratégies différentes afin de produire des fils censés favoriser, de par leur composition et leur structure, les performances des biotextiles utilisés dans un environnement biologique.

Le collagène est une des protéines naturelles les plus utilisées dans la production de fibres biologiques. Dans les années 1990, Cavallaro *et al.* ont développé une méthode pour la production de fils de collagène en continu⁴⁵⁰. Du collagène de type I a été extrait de tendons bovins puis extrudé dans des bains successifs de polyéthylène glycol, de solution saline tamponnée au phosphate et d'isopropanol (70 %), respectivement. Les fils non-réticulés et réticulés au carbodiimide et au glutaraldéhyde ont été produits. La résistance à la traction des fils réticulés au carbodiimide et au glutaraldéhyde une fois hydratés (23,9 MPa et 27,7 MPa, respectivement) était significativement supérieure à la résistance à la traction des fils non-réticulés (1,2 MPa), et était environ trois fois moins élevée que celle des tendons natifs⁴⁵⁰. Les fils réticulés au carbodiimide ont été implantés, soit tressés dans un modèle ligamentaire canin, soit sous forme de tricot dans un modèle de réparation abdominal de rat, jusqu'à 12 semaines. Les analyses histologiques ont montré des fils de collagène entourés d'un ensemble de cellules inflammatoires après 12 semaines, bien qu'aucune analyse immunohistochimique n'ait été faite. Les fils étaient largement intacts après 12 semaines. D'autres équipes ont produit des fils de collagène avec une méthode similaire pour différentes applications comme les tendons ou les vaisseaux sanguins, dont les résultats seront discutés dans la section suivante (4.3)⁴⁵¹⁻⁴⁵³. Cependant, l'ensemble des résultats montrent que la méthode de réticulation utilisée a une influence sur le remodelage du matériau et les interactions cellules-matériau^{454,455}. Ainsi, l'utilisation de protéines de collagène sous forme de fils nécessite un travail d'optimisation des propriétés mécaniques et du temps de dégradation du matériau, tout en favorisant l'infiltration cellulaire pour son remodelage *in vivo*.

Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* ont produit une nouvelle génération de fils faits de fibroïnes de soie en associant ceux-ci à de la tropoélastine⁴⁵⁶. Dans ce travail, une solution de tropoélastine recombinante humaine et de fibroïnes de soie a été préparée et des fils d'environ 130 µm de diamètre ont ainsi été obtenus par électrofilage. Les fils hydratés avaient

une résistance à la traction d'environ 4 MPa. Ensuite, des structures tissées (armure toile) ont été produites à partir de ces derniers. Les résultats ont montré un attachement et une prolifération de fibroblastes du derme humain sur les tissus *in vitro*, après 7 jours, avec un alignement préférentiel dans le sens des fils⁴⁵⁶. Les résultats de l'implantation sous cutanée des fils chez le rat pendant 8 semaines ont montré une réaction immunitaire avec une présence massive de cellules autour des fils, bien que leur quantité semble décroître entre 2 et 8 semaines d'implantation. Bien que le matériau semble bien toléré *in vivo*, ce travail mériterait une caractérisation de la réponse immunitaire ainsi qu'une étude du remodelage du matériau implanté, s'il y en a un. On peut également regretter le manque de mise en avant des apports biologiques et mécaniques de la tropoélastine dans le matériau, avec une absence de comparaison avec des fils de fibroïnes de soie.

Les matériaux à base de MEC récapitulent, au moins en partie, l'environnement dans lequel évoluent les cellules *in vivo*. Notre groupe a démontré la production de fils de MAC²⁰¹. Ces fils peuvent être utilisés pour tisser, tricoter, tresser, faire du crochet, entres autres méthodes d'assemblage textile (**Figure 32**). De plus, leurs propriétés (p. ex. diamètre, force à la rupture, déformation à la rupture) peuvent être grandement modulées en modifiant leur torsion ou leur largeur. Un avantage supplémentaire de ces fils produits à partir de feuillets

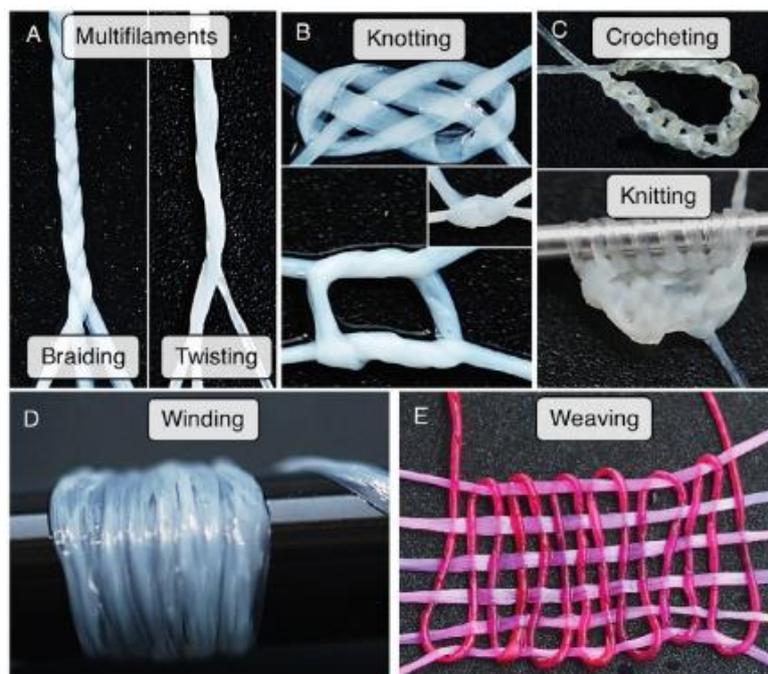


Figure 32 : Différentes utilisations de méthodes textiles avec de la MAC humaine [201].

de MAC est qu'ils peuvent être allogéniques ou même autologues. Implantés en tant que fils de suture ou en sous cutané chez le rat *nude*, ces fils n'ont montré aucun signe de réponse immunitaire innée sévère^{201,457}. La production de substituts vasculaires à partir de ces fils est décrite dans la section suivante (4.3).

La membrane amniotique humaine (comme décrit dans la partie 2.2.3.3) est un matériau biologique disponible et aux propriétés mécaniques fortes. Dans l'idée d'utiliser une MEC moins chère, notre groupe a également produit des fils à partir de membrane amniotique humaine²⁰⁰. Il a été montré que ces fils possédaient, après décellularisation et stérilisation, des propriétés biologiques qui ont permis la croissance de cellules endothéliales durant plusieurs jours. Dans ce travail, les auteurs ont produit des substituts vasculaires tissés à partir de fils de membrane amniotique humaine²⁰⁰. Les résultats de cette étude seront discutés dans la prochaine section (4.3).

4.3. Substituts vasculaires assemblés par approche textile

Les premiers substituts vasculaires assemblés par approche textile étaient faits à partir d'une étoffe tissée de fils synthétiques non résorbables de chlorure de polyvinyl copolymérisé avec de l'acrylonitrile connu sous le nom de Vinyon N⁴⁵⁸. Ils ont été testés chez l'animal dans les années 1950, et leur utilisation clinique s'est rapidement établie durant les décennies suivantes. De nos jours, les substituts vasculaires textiles sont plutôt en PET et largement utilisés pour les réparations vasculaires. Cependant, ces greffons synthétiques présentent d'importantes limites en termes de performances selon les applications, comme décrit précédemment (1.3.4)^{459,460}.

Beaucoup de groupes se sont dirigés vers une utilisation de fils synthétiques résorbables afin de produire des substituts qui puissent être implantés et remodelés. Récemment, Zbinden *et al.* ont tressé des substituts à base de PGA et PGS, et ont implanté ces derniers chez des souris afin d'étudier l'influence des paramètres de production sur le développement et le remodelage des greffons²⁹³. Les résultats de cette étude seront discutés dans la prochaine section (4.4). Zhu *et al.* ont également tressé des substituts de petit diamètre (2 mm) à base de fils de PLGA, qui avaient une pression à l'éclatement de 7610 mmHg⁴⁶¹. Ces derniers ont été implantés en interposition carotidienne chez le lapin (1,2 cm de longueur). Les résultats ont montré une perméabilité de 100 % ($n = 20$) après 6 semaines

sans anticoagulation, et une endothélialisation complète a été mise en évidence. Cependant, la pression à l'éclatement du substitut étant largement supérieure à celle de l'artère dans laquelle il est implanté (7610 mmHg contre 5190 mmHg, respectivement), un décalage des propriétés mécanique existe et pourrait mener à de potentielles complications au-delà des 6 semaines d'implantation (p. ex. hyperplasie intimale), comme discuté précédemment³¹. De plus, il est nécessaire de tester ce greffon dans un modèle de gros animal afin d'observer si l'endothélialisation se fait aussi efficacement et rapidement.

Certains groupes ont choisi d'utiliser des protéines naturelles afin de promouvoir la réponse de l'hôte et le remodelage du greffon^{453,462,463}. Zhang *et al.* ont produit un substitut entièrement biologique en utilisant le tricot (**Figure 33**)⁴⁵³. Leur approche repose sur le

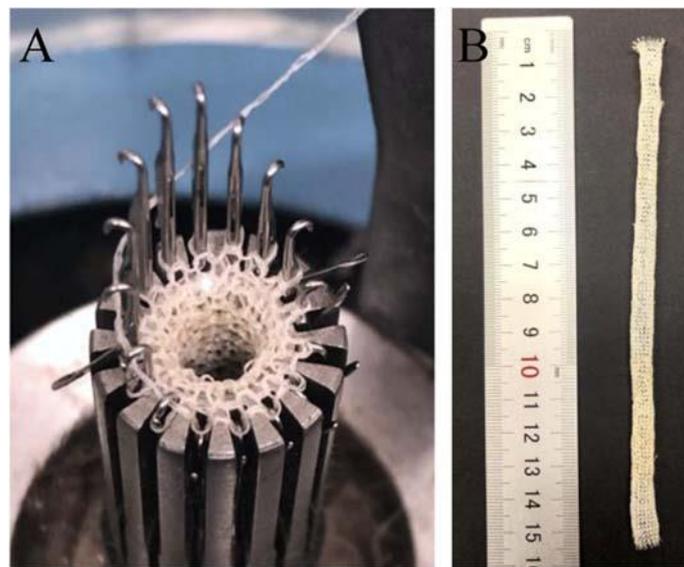


Figure 33 : Substitut vasculaire tricoté à partir de fils de collagène et développé par le groupe de King [453].

(A) Machine à tricoter utilisée pour produire (B) un substitut à partir de fils de collagène.

tricotage de filaments de collagène extraits chimiquement et réticulés, et l'ajout d'une couche externe de nanofibres de collagène électrofilées. Ainsi, ils ont produit un greffon avec une pression à l'éclatement d'environ 5200 mmHg, et l'ajout d'une couche de collagène externe a permis la réduction de la taille excessive (macroscopique) des pores du greffon tricoté afin de limiter la perméabilité transmurale. Cependant, l'absence d'évaluation de ladite perméabilité est surprenante. De plus, la rétention à la suture des greffons hydratés était plus faible que celle de la veine saphène humaine (0,5 N et 1,8 N, respectivement), et par conséquent trop

faible pour une implantation. Pour surmonter ces limitations, le même groupe a, dans la suite de cette étude, produit des fils de fibres de collagène associées à du PLA⁴⁶³. Ils ont démontré que le substitut vasculaire tricoté a une pression à l'éclatement ainsi qu'une rétention à la suture largement supérieures à celle de la veine saphène humaine (14200 mmHg contre 2480, respectivement), permettant ainsi d'envisager une implantation. Cependant, ces valeurs sont si supérieures aux valeurs des vaisseaux natifs qu'il y aura un décalage mécanique important qui pourrait conduire à l'échec du greffon⁴⁶³. Un autre groupe a incorporé de l'élastine, protéine conférant les propriétés élastiques des vaisseaux sanguins, à un substitut renforcé de PCL et d'un maillage tricoté de poly(fluorure de vinylidène)⁴⁶⁴. Le greffon de petit diamètre produit a démontré une compliance proche de celle de l'artère thoracique interne humaine (9,6 %/100 mmHg et 11,5 %/100 mmHg, respectivement), ainsi qu'une réponse des cellules *in vitro* prometteuse. Des études *in vivo* devront être menées pour évaluer si ces propriétés se traduiront par des performances supérieures aux greffons actuels. D'autres groupes ont choisi d'utiliser de la soie, afin de tisser ou de tresser des vaisseaux^{258,465}. Kiritani *et al.* ont implanté chez le rat un substitut tricoté à partir de fibroïnes de soie pendant 4 semaines (**Figure 34**). Les résultats ont mis en avant la faible perméabilité de leur structure tricotée, grâce à un modèle de tricot double ainsi qu'au recouvrement de la surface par une solution de soie, qui leur a permis d'implanter le substitut chez l'animal sans fuite de sang²⁵⁸.

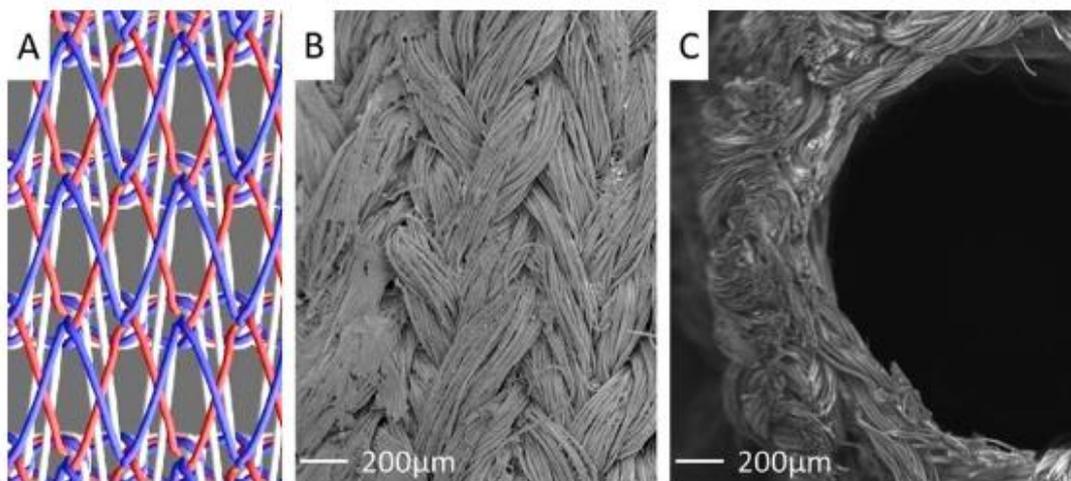


Figure 34 : Prothèse en fibroïnes de soie tricotée par Kiritani *et al.* [258].

(A) Schéma du modèle de tricot utilisé et (B, C) images de microscopie électronique à balayage montrant la surface et la section transversale des greffons tricotés, respectivement.

Enfin, notre groupe a récemment démontré la production de substituts vasculaires tissés entièrement biologiques. Dans une première étude, le groupe a montré la production d'un greffon vasculaire de faible diamètre à partir de fils de feuillets de MAC²⁰¹. Les tests mécaniques ont montré que le greffon tissé avait une pression à l'éclatement ainsi qu'une rétention à la suture (5968 mmHg et 5,6 N, respectivement) largement supérieures à celle de la veine saphène humaine (2480 mmHg et 1,8 N, respectivement), tout en étant imperméable. L'équipe a également démontré l'implantabilité du greffon dans un système à haute pression, dans l'artère carotide d'une brebis. Cependant, le vaisseau produit présentait une rigidité liée au tissage, et cette dernière pourrait créer un décalage important avec celle des vaisseaux natifs, et ainsi mener à un échec du greffon à long terme. Plus récemment, notre groupe a démontré la possibilité de tisser un greffon à partir de fils de membrane amniotique humaine (**Figure 35**)²⁰⁰. Les tests réalisés ont démontré une pression à l'éclatement et une rétention à la suture largement supérieures à celle des vaisseaux natifs et proches de celles des vaisseaux tissés dans l'étude précédente (5628 mmHg et 5,3 N, respectivement). Cependant, la perméabilité transmurale était trop élevée pour envisager une implantation sans traitement supplémentaire (47 mL/min/cm²). En augmentant la largeur des fils utilisés de 5 à 10 mm, la perméabilité transmurale a été significativement diminuée (1 mL/min/cm²)²⁰⁰. Par ces résultats, l'équipe a mis en évidence la possibilité de faire varier et d'adapter les propriétés de ces greffons de textiles humains grâce à la variation d'un paramètre de production. Ainsi, la variation des paramètres de tissage pourrait permettre d'optimiser également les propriétés de greffons tissés à partir de fils de MAC.



Figure 35 : Substitut tissé à partir de fils de membrane amniotique humaine et développé par le groupe de L'Heureux [200].

4.4. Influence des paramètres d'assemblage textile

Comme discuté précédemment, l'un des avantages des méthodes d'assemblage textile est leur versatilité et le contrôle qu'il est possible d'avoir sur les propriétés du produit final^{442,444,449,466,467}. En ingénierie tissulaire vasculaire, cet avantage est d'autant plus intéressant qu'il permettrait d'influencer la force mécanique et la géométrie des greffons, afin de se rapprocher des propriétés des vaisseaux natifs dans le but d'éviter un décalage entre celles-ci, une des causes de l'échec des substituts vasculaires^{27,28}.

Zbinden *et al.* ont testé l'influence de paramètres de tressage sur les propriétés des échafaudages produits et leur devenir après implantation dans un modèle de souris²⁹³. Ils ont testé différents modèles de tressage, et ont également fait varier le nombre de fils, leur densité ainsi que l'angle de tressage (**Figure 36**). Ils ont montré qu'en implantant les greffons chez la souris (0,66 mm de diamètre), une mortalité importante était associée à un modèle de tressage peu dense, entraînant des fuites de sang suite à l'implantation. Les auteurs ont mis en évidence qu'une augmentation de la densité des fils était corrélée à une baisse du dépôt d'élastine et à une augmentation du dépôt de collagène²⁹³. Ils ont également montré que l'ajout d'un revêtement de PGS était associé à une augmentation du dépôt de collagène ainsi qu'à une diminution du nombre de cellules immunitaires présentes. En bref, les auteurs ont mis en évidence le lien entre paramètres de production et réponse *in vivo* à un assemblage textile.



Figure 36 : Différents modèles de tressage utilisés par le groupe de Breuer [293].

Plusieurs équipes ont travaillé sur l'influence des paramètres de production sur les propriétés des tissus. Ainsi, l'armure du tissage a une influence particulière sur la résistance à la rupture ainsi que sur la flexibilité d'un produit tissé. En effet, la diminution du nombre d'entrelacements dans l'armure de tissage permet une augmentation de la flexibilité finale, tout en diminuant la résistance à la rupture⁴⁶⁸⁻⁴⁷⁰. Ainsi, une armure satin permettra la production d'échafaudages plus flexibles qu'un échafaudage fait d'une armure toile, mais avec

une résistance mécanique moindre. De plus, l'armure satin est plus perméable à l'eau. Or, un des critères des substituts vasculaires est leur faible perméabilité transmurale afin de pouvoir être implantés sans fuite de sang. Aussi, le type d'armure influence la topographie de la lumière du greffon, qui a été montrée comme ayant une influence sur la prolifération cellulaire⁴⁷¹. Il a également été démontré que la nombre de fils de trame ainsi que leur densité avait une influence sur la rigidité des fabriques. La densité des fils de trame et de chaîne ainsi que la densité de la fabrique ont été montrés comme étant les paramètres influençant en priorité les propriétés du substitut vasculaire *in vitro*⁴⁷². Une augmentation de densité des différents fils entraîne une augmentation de la rigidité ainsi qu'une diminution de la perméabilité^{200,469,473,474}. En changeant les paramètres de densité lors du tissage, la force mécanique ainsi que la perméabilité transmurale d'un substitut tissé pourraient donc être modifiées en même temps. Il est par conséquent nécessaire de trouver une densité suffisante pour produire un greffon à la perméabilité transmurale suffisamment faible, et pas trop élevée pour ne pas produire un substitut trop fort.

Un autre aspect important des substituts vasculaires tissés, en plus de leurs propriétés mécaniques, est l'ondulation de la surface interne, inhérente au tissage, qui a une influence directe sur le flux sanguin à travers le substitut. Ainsi, une augmentation de l'ondulation de la surface résulte en une diminution de la vitesse du flux, en particulier à la surface des prothèses⁴⁷⁵. Cette diminution de la vitesse du flux dans les espaces entre les ondes de surface est associée à une diminution des forces de cisaillement sur la paroi en ces endroits, forces liées à des phénomènes pathologiques⁴⁷⁶. Ainsi, il est nécessaire de réduire cette ondulation de surface autant que possible. Dans les substituts vasculaires tissés, cette ondulation peut être influencée par plusieurs paramètres comme la densité des fils et de la fabrique, mais également par la tension mise dans les fils de trame⁴⁷⁷. Ainsi, un même paramètre de production peut avoir un effet sur plusieurs propriétés d'un substitut vasculaire tissé, soulignant la difficulté de ne changer qu'une seule propriété d'un greffon tissé à la fois.

Bien que plusieurs études aient été faites sur l'influence des paramètres de tissage sur les propriétés des substituts vasculaires synthétiques, aucune n'a investigué l'influence de paramètres de tissage de fils biologiques sur la production de substituts issus de l'ingénierie tissulaire. En conclusion, il est nécessaire d'étudier l'effet de la modification des paramètres de tissage sur les propriétés d'un substitut vasculaire biologique tissé afin de mieux

comprendre les liens entre ces derniers, dans le but de produire un greffon aux propriétés ajustables.

VI. OBJECTIFS

En 1986, le premier substitut vasculaire entièrement biologique issu de l'ingénierie tissulaire a vu le jour, suite aux travaux menés par Weinberg et Bell¹⁸². Cependant, sa faible résistance mécanique n'en faisait pas un substitut implantable. Il y a plus de 20 ans, inspiré par ces résultats, Nicolas L'Heureux a réussi à créer un substitut vasculaire à partir de matrice extracellulaire produite par des cellules *in vitro*¹⁸⁹. Entièrement biologique, ce substitut vasculaire possédait une force mécanique jamais atteinte jusque-là pour un produit d'ingénierie tissulaire vasculaire. De plus, le greffon de L'Heureux et son équipe a été le premier greffon vasculaire implanté dans un système à haute pression, dans la circulation artérielle. Sa stratégie, décrite dans la partie 2.2.1.1, reposait alors sur la production de feuillets de **Matrice extracellulaire Assemblée par les Cellules en culture (MAC)**. Pour sa première approche, le groupe du Dr. L'Heureux a utilisé des feuillets de MAC produits par des fibroblastes, et d'autres par des cellules musculaires lisses^{189,190}. La stratégie était alors d'enrouler séquentiellement autour d'un mandrin des feuillets issus de fibroblastes, puis de CML, et de nouveau de fibroblastes, comme décrit en détails dans la partie 2.2.1.1. Après environ 3 mois de production, le substitut était produit et pouvait être caractérisé. Dans une deuxième approche simplifiée, le Dr. L'Heureux a retiré les feuillets de MAC issus de CML afin d'utiliser uniquement des feuillets issus de fibroblastes¹⁹¹. Pendant des années, l'équipe du Dr. L'Heureux a montré l'efficacité de cette stratégie et les performances de ces greffons vasculaires, à travers de nombreuses études pré-cliniques et cliniques^{18,32-34,179,191,192}. Ces travaux ont notamment montré le succès de greffons allogéniques, non endothélialisés, et dévitalisés.

Cependant, en dépit des résultats prometteurs, la méthode de production de ces substituts vasculaires était longue, coûteuse et complexe, notamment avec la nécessité d'utiliser un bioréacteur pendant des mois. L'ensemble de ces obstacles et la situation économique post-2008 a rendu le financement d'un essai clinique de phase III difficile. Afin de dépasser ces limites, le groupe du Dr. L'Heureux a choisi d'utiliser une technique d'assemblage textile^{200,201}. Les premiers travaux du groupe ont montré qu'il est possible d'obtenir des rubans à partir des feuillets de MAC. La largeur des rubans peut être contrôlée, et ils peuvent être utilisés comme tels, ou torsadés, permettant l'obtention d'un fil avec une certaine élasticité. Ainsi, en quelques jours de tissage, un substitut vasculaire humain, aux propriétés

mécaniques supra-physiologiques, peut être produit²⁰¹. Dans la suite du développement de ce substitut vasculaire tissé, le groupe a réussi à produire des feuillets de MAC à partir de fibroblastes ovins, afin de pouvoir implanter et étudier le greffon dans un modèle allogénique, chez le mouton²⁰². Un premier prototype de substitut vasculaire ovin a été produit et possédait, comme le prototype humain, des propriétés supra-physiologiques, tant au niveau de l'épaisseur de la paroi que de la résistance mécanique. Or, cette résistance mécanique supra-physiologique entraînera un décalage important avec l'élasticité des vaisseaux natifs une fois implanté. Ce phénomène, bien connu et démontré dans la recherche vasculaire, augmente les chances de l'échec du greffon, notamment avec la formation d'hyperplasie intinale^{25-28,30,31}.

Ainsi, l'objectif général de cette thèse était de développer un substitut vasculaire ovin aux propriétés structurales et mécaniques plus proches de celles des vaisseaux natifs et de l'implanter afin d'étudier son remodelage dans un contexte de pontage artérioveineux allogénique.

Dans la première partie de ce travail, l'objectif était d'étudier l'effet des paramètres d'assemblage sur les propriétés structurales et mécaniques des vaisseaux tissés. A partir de fils de feuillets de MAC ovine, différents modèles de tissage ont été produits en modifiant 4 paramètres de production : 1) la force des feuillets de MAC, 2) le nombre de fils longitudinaux, 3) la largeur des rubans utilisés pour produire le fil circonférentiel, et 4) la tension mise dans le fil circonférentiel pendant le tissage. Nous avons étudié l'influence de ces paramètres sur les 7 propriétés structurales et mécaniques suivantes des vaisseaux tissés : 1) diamètre interne, 2) épaisseur de la paroi, 3) densités longitudinale et circonférentielle, 4) ondulation de la surface de la lumière, 5) perméabilité transmurale, 6) rétention à la suture, et 7) pression à l'éclatement et compliance. Nous avons ainsi montré comment qu'il est possible de modifier et contrôler les propriétés structurales et mécaniques des substituts tissés en variant ces paramètres d'assemblage. Nous avons tissé un substitut vasculaire de petit diamètre (4,2 mm) aux propriétés optimisées par rapport au modèle initial, avec une force mécanique proche de celle des vaisseaux natifs. Enfin, dans le cas où une décellularisation serait nécessaire dans de futures études *in vivo*, nous avons montré qu'il est possible de produire des vaisseaux tissés décellularisés avec une force mécanique suffisante pour être implantés.

Dans la deuxième partie, l'objectif était d'adapter le substitut vasculaire tissé à une implantation en tant que pontage artérioveineux. En effet, un des objectifs à long terme étant l'utilisation de nos greffons en tant qu'accès vasculaire chez les patients sous hémodialyse, le but était d'étudier notre substitut dans une telle configuration chez le gros animal. Pour ce faire, il était nécessaire de produire un greffon au diamètre interne et aux extrémités adaptés.

Enfin, dans la troisième partie, le but était d'implanter les substituts vasculaires produits dans la deuxième partie en tant que pontage artérioveineux entre l'artère carotide et la veine jugulaire de brebis, dans un contexte allogénique. Les objectifs étaient d'étudier la perméabilité des greffons à moyen terme dans un système à haut débit et haute pression, ainsi que le remodelage des substituts par l'hôte. Implantés 4 et 8 semaines, nous avons également testé la capacité des greffons tissés à être ponctionnés par une aiguille d'hémodialyse après 4 semaines. Des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été faites afin d'identifier la réponse immunitaire de l'hôte, le remodelage du greffon ainsi que les cellules en présence.

Les résultats de la première partie portant sur l'étude de l'effet des paramètres de tissage sur les propriétés des substituts sont présentés sous forme d'un article accepté dans le journal *Biofabrication*. Les résultats des deuxième et troisième parties, décrivant l'adaptation des propriétés du greffon à une implantation en tant que pontage artérioveineux ainsi que son utilisation en tant qu'accès vasculaire chez l'ovine, sont présentés sous forme d'un article qui sera soumis au journal *Biomaterials* lorsque les derniers implants auront été analysés.

VII. RESULTATS

1. ARTICLE 1 : EFFETS DES PARAMETRES DE TISSAGE SUR LES PROPRIETES DE SUBSTITUTS VASCULAIRES ENTIEREMENT BIOLOGIQUES ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE

Effects of weaving parameters on the properties of completely biological tissue-engineered vascular grafts

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, E. Binyet, J-M. Olive, N. L'Heureux

Biofabrication, article publié

Gaëtan Roudier *et al* 2024 *Biofabrication* **16** 015015

DOI 10.1088/1758-5090/ad0d14

Effects of weaving parameters on the properties of completely biological tissue-engineered vascular grafts

Gaëtan Roudier¹, Marie Hourques¹, Nicolas Da Silva¹, Maude Gluais¹, Emmanuel Binyet², Jean-Marc Olive², Nicolas L'Heureux¹

¹Univ. Bordeaux, INSERM, Laboratory for the Bioengineering of Tissues – BioTis, UMR 1026, F-33076 Bordeaux, France

²Univ. Bordeaux, CNRS, UMR 5295, I2M, F-33405, Talence, France

Corresponding author

Nicolas L'Heureux

BioTis: Laboratory for the Bioengineering of Tissues, UMR1026

University of Bordeaux, Campus Carreire

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

33076 Bordeaux Cedex France

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

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

E-mail: nicolas.lheureux@inserm.fr

Key words: Extracellular matrix, Vascular graft, Tissue engineering, Biological textiles, Weaving parameters, Mechanical properties

Abstract

Tissue-Engineered Vascular Grafts (TEVGs) made of human textiles have been recently introduced and offer remarkable biocompatibility as well as tunable mechanical properties. The approach combines the use of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) threads, produced by cultured cells *in vitro*, with weaving, a versatile assembly method that gives fine control over graft properties. Herein, we investigated how production parameters can modify the geometrical and mechanical properties of TEVGs to better match that of native blood vessels in order to provide long-term patency. Our goals were to decrease the mechanical strength and the luminal surface profile of our first generation of woven TEVGs, while maintaining low transmural permeability and good suture retention strength.

Different TEVGs were produced by varying CAM sheet strength as well as weaving parameters such as warp count, weft ribbons width, and weft tension. An optimized design reduced the burst pressure by 35%, wall thickness by 38% and increased compliance by 269%. The improved TEVG had properties closer to that of native blood vessels, with a burst pressure of 3492 mmHg, a wall thickness of 0.69 mm, and a compliance of 4.8%/100 mmHg, while keeping excellent suture retention strength (4.7 N) and low transmural permeability ($24 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). Moreover, the new design reduced the luminal surface profile by 48% and utilized 47% less CAM. With a comparable design, the use of decellularized CAM threads, instead of devitalized ones, led to TEVGs with much more permeable walls and higher burst pressure.

The next step is to implant this optimized graft in an allogeneic sheep model of arteriovenous shunt to assess its *in vivo* remodeling and performance.

Introduction

Small to mid-diameter vascular grafts are implanted daily by surgeons, whether it is for lower limb revascularization, coronary bypasses, or as arteriovenous shunts. Autologous blood vessels are the gold standard but these conduits have limited availability and are not always in the best of conditions. While synthetic prothesis are available “off-the-shelf”, they are prone to thrombosis, intimal hyperplasia, and infections¹⁻³. More than 30 years ago, Weinberg and Bell paved the way for the development of Tissue-Engineered Vascular Grafts (TEVGs) with the first biological blood vessel model⁴. Since then, several strategies have emerged to produce the best TEVG, based on scaffolds made of synthetic and natural materials^{5,6}. Biological scaffolds made from mammalian extracellular matrix (ECM) have been very successful in tissue engineering applications⁷. Indeed, ECM is present in every tissue and guides cellular responses, tissue healing and regeneration. However, purified proteins isolated from animal or cadavers do not have a physiological arrangement, thus are rapidly degraded when implanted *in vivo*⁸⁻¹⁰. ECM assembled by cells *in vitro* recreate a more physiological structure and, for this reason, can be the material of choice for tissue engineering that aims to produce a stable structure¹¹⁻¹⁵. TEVGs based on ECM synthesized by cells *in vitro* have been proposed as promising alternatives to synthetic grafts, especially because this is a cell-friendly material that promotes *in vivo* remodeling and avoids infection^{11,16,17}. L’Heureux *et al.* was the first to demonstrate the use of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) to produce completely biological, implantable, vascular substitutes¹⁸. These grafts, produced by rolling sheets of CAM to form a biological tube, were successfully implanted in humans^{19,20}. However, while providing successful clinical outcomes, these TEVGs took months to produce, required costly bioreactors, and their mechanical properties were poorly tunable.

A vascular graft must, at least, withstand high pressures, be suturable, and have leak-proof walls to be implantable. To achieve long-term success, a key mechanical property is compliance. Indeed, compliance mismatch with native tissue has been well-established as a cause of intimal hyperplasia and vascular graft failure²¹⁻²⁶. In addition to those mechanical requirements, the ideal substitute should be easily available and should allow host cells to function normally to fight infections (unlike synthetic materials), to repair damage (e.g., after puncture), or to grow the tissue (e.g., in the case of pediatric application).

Textile technologies allow the production of fabrics with controlled geometrical and mechanical properties. Widely used to produce synthetic vascular substitutes, this approach is increasingly popular for various tissue engineering applications^{27,28}. Recently, our group produced threads from devitalized CAM sheets²⁹. These threads have been shown to be stable *in vitro* for 1 year and sterilizable with minimal denaturation³⁰. This new shape of the material enables the use of textile approaches to engineer CAM-based products. Among assembly methods, weaving offers the possibility of creating leak-proof walls, which is a critical property for a vascular graft. Our first prototype of woven TEVG had an extremely high burst pressure and suture retention strength. However, such supraphysiological properties were associated with poor compliance, thus creating a mechanical mismatch with native blood vessels. Moreover, the first prototype had thick walls and was not flexible, which made puncturing and suturing the TEVGs difficult²⁹. The main objective of this study was to understand the effects of weaving parameters on the properties of the TEVGs in order to correct this mechanical mismatch, while maintaining good suturability and low transmural permeability. A secondary objective was to reduce wall thickness to improve graft handling characteristics. An additional objective was to minimize the surface profile of the lumen of the graft to reduce

hemodynamic perturbations. Finally, design improvements were expected to reduce the amount of CAM used to limit TEVG cost.

In this report, we demonstrate how the structural and mechanical properties of these completely biological woven TEVGs can be improved by adapting our material and controlling the assembly parameters. Such data will help to build a toolbox to produce the optimal TEVG to achieve long-term *in vivo* success, but also to produce human textiles with relevant properties for other applications.

Materials & methods

Devitalized CAM sheet production and characterization

CAM sheets were produced as previously described³¹. Sheep skin fibroblasts (SSF) were isolated from sheep skin biopsies as previously detailed and were seeded in 225 cm² flasks at a density of 10⁴ cells·cm⁻². Cells were cultured for several weeks, depending on the desired strength, in DMEM/F-12 medium (Gibco®, #31331028) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone™ FetalClone III, #AD19958305) and 0.5 mM sodium L-ascorbate (Sigma, #A4034). CAM sheets were also produced in 6-well plates. Media were changed three times a week. Once produced, CAM sheets were quickly rinsed in sterile distilled water and frozen at -80 °C. When needed, sheets were thawed, rinsed in sterile distilled water, and air-dried under the sterile air flow of a biosafety cabinet at room temperature. Dried sheets were stored at -80 °C until needed. Prior to use, CAM was rehydrated in sterile water for at least 1 hour and used as devitalized material. A perforation test with a computer-controlled device (Shimadzu Autograph AGS-X series, force transducer 100 N) was done to determine CAM sheet strength. Six-well plate CAM sheets were held by a custom-made device and perforated with a spherical tip mounted with a 9-mm plastic ball at a rate of 20 mm·min⁻¹ until rupture. Data were analyzed with Trapezium-X software. Thickness of fully rehydrated CAM sheets were determined with a bi-axial laser micrometer (Xactum, AEROEL).

Devitalized threads production and characterization

Two sets of threads were produced, the warp (longitudinal threads) and the weft (circumferential thread), as previously described²⁹.

For warp threads production, thawed CAM sheets were placed in a cutting device. Circular blades were pressed on the sheet and the device was pushed to rotate the blades and cut the CAM to obtain 5-mm-wide by 17-cm-long ribbons.

For weft production, CAM sheets were thawed and dried on the back of a thin sacrificial plastic sheet with a printed spiral pattern of a desired width. CAM sheets were cut with surgical scissors following the spiral pattern. Using this approach, two long ribbons of approximately 1.5 meters can be produced from a single 225 cm² sheet. Then, the internal part of one spiral was attached with the external part of the second one and the two ribbons were twisted together at a rate 5 revolutions per centimeter of length using a rotating motorized device in order to produce an elastic thread. Ribbons were then dried under a laminar flow hood, spooled, and stored at -80 °C until needed. Weft was produced from 3-mm, 4-mm and 5-mm-wide ribbons.

Thickness or diameter of fully rehydrated threads were determined with a bi-axial laser micrometer (Xactum, AEROEL). Afterwards, threads were put in between the jaws of a tensile test machine (Shimadzu, AGS-X, force sensor 100 N). Threads were pre-loaded at 20 mm/min until 0.1 N and pulled until breakup at speed of 1% of loaded initial length per second. Samples remained hydrated during the test and the force at failure (N) was recorded.

CAM decellularization

To produce decellularized woven TEVGs, CAM sheets were decellularized as previously described³². Briefly, frozen CAM sheets were thawed in sterile distilled water. The water was then replaced with 120 mL of a decellularization solution composed of 8 mM 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1000 mM sodium chloride (NaCl), 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 120 mM sodium hydroxide

(NaOH) diluted in 1X phosphate buffered saline (1X PBS, Gibco®, #10010023). CAM sheets were immersed in the solution for 6 h under strong agitation, before being rinsed three times in 1X PBS for 30 min and once in sterile distilled water overnight under agitation. Decellularized CAM sheets were used for threads production as described. To confirm efficient decellularization, rehydrated devitalized and decellularized 5 mm² samples of CAM were fixed in a 4% of paraformaldehyde-based solution (Antigenfix, Microm Microtech) for 1 hour. After two rinses in 1X PBS, Triton-X 0.1% was added to the samples for 15 minutes to permeabilize cells membranes. Following three washing steps of 5 minutes in 1X PBS, 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000, D1306, Invitrogen) was applied for 1h at room temperature. Images were acquired using a confocal microscope (TCS SPE, Leica microsystems).

DNA quantification

The DNA of devitalized and decellularized CAM sheets was quantitated to validate decellularization. Dry samples were weighed and DNA was extracted and purified with a QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, #51304) following manufacturer's instructions. Absorbance was measured with a photometer p330 (Implen) and DNA concentration was reported in ng per mg CAM dry weight.

TEVG production

TEVGs were woven on a custom-made circular loom, in plain weave and over a 4.2-mm diameter mandrel. The weft (circumferential thread) was inserted between a movable and a fixed set of tensioned warp (longitudinal thread) and then manually tensioned. The movable set of warp was then moved to cross over the manually tensioned weft and the latter was run again between the two sets of warp, and so on to create the woven TEVG. TEVGs were produced to test three levels for each of the 3 assembly variables tested. Warp count (total

number of longitudinal threads) was the first variable tested because it is easily controllable and, since these threads are the main component of the vessel, has the highest potential of significantly decreasing the amount of material used. It was decreased from 51, to 43 and 27 threads per vessel. Weft diameter was then evaluated because it can also be well controlled and was expected to most effectively reduce the excessive burst strength of the initial vessel prototype (one of the key objectives of the optimization). It was decreased from 5 mm to 4 and then to 3 mm. In this manual process, thinner ribbons (≤ 2 mm) are more difficult to handle without occasional breakages and, hence, were not included in this initial optimization study. Finally, weft tension was tested because we hypothesized that this variable could improve the compliance of the vessel (a property often considered essential for long-term success). Other assembly variables could be tested (e.g., warp width, warp tension, etc.) in further studies but are technically more challenging to address. TEVGs were removed from the mandrel once produced and fully rehydrated before analysis.

Microcomputed tomography imaging

TEVGs were scanned with microcomputed tomography (μ CT) (V|tome|X – S model, General Electric) at a 8- μ m resolution (500 ms exposure, 100 kV, 100 μ A). Images were used to measure wall thickness, internal diameter and warp width with ImageJ software (National Institute of Health, USA). The lumen surface waviness was measured using a 3D reconstruction of the TEVGs done with ImageJ (1800 cross sections). Briefly, 4 orthogonal longitudinal sections of each TEVG were extracted from the 3D reconstructions. To evaluate the waviness of the luminal surface, the length and height of each “wave” within each longitudinal section was manually measured and all values were averaged. Hence, the mean wave length (W_L) and

the mean wave height (W_h) were reported for each TEVG. The aspect ratio (AR) was determined as the ratio of the mean height over the mean length.

Transmural permeability

Water permeability testing was adapted from ISO standards (ISO 7198:2016). TEVGs (n=3) were cannulated and pressurized with water at 120 mmHg. The water leaking through the graft material during each of three 1-minute trials was collected and transmural permeability was expressed as $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^2$.

Compliance measurements

Compliance testing was adapted from ISO standards (ISO 7198:2016). TEVGs were cannulated and cannulas were connected to a jig where the distance between the cannulas was fixed at the unpressurized length of the graft. The system was submerged in water and pressurized over the 80–120 mmHg pressure range three times. High resolution digital images (1.4- μm resolution) were recorded to measure the external diameter. The inside diameter and wall thickness of the TEVG at rest were obtained from μCT images. Assuming an incompressible wall, compliance (in %/100 mmHg) was calculated as follows:

$$\% \text{ compliance} / 100 \text{ mmHg} = \frac{\frac{R_{ip2} - R_{ip1}}{R_{pi}}}{p_2 - p_1} \times 10^4$$

Where:

$p_1 = 80 \text{ mmHg}$

$p_2 = 120 \text{ mmHg}$

$R_{ipx} = \text{internal radius at pressure } x$

Suture retention testing

Suture retention was performed following ISO standards (ISO 7198:2016) as previously described³³. Suture retention strength was measured with loop of 6/0 polypropylene suture (SMI) traversing the wall at 2 mm from one extremity of the TEVG and pulled at a steady rate of 150 mm/min with a uniaxial tensile testing device until failure (100-N load cell, Shimadzu Autograph AGS-X series). The maximum force applied was recorded digitally by the software TrapeziumX (Shimadzu). Both extremities of each TEVG were tested.

Burst pressure measurements

Burst pressure was performed following ISO standards (ISO 7198:2016). The test was done as previously described with some modifications³³. A thin latex balloon was used in the TEVG to avoid leakage at high pressure. TEVGs were cannulated and slowly pressurized with nitrogen until failure. A digital pressure gauge LEO5 (Keller) with its data acquisition system (Kolibri Desktop, Keller) and a computer were used to record the pressure at a sampling rate of 10 Hz. All ruptures occurred away from the connection to the cannulas. The pressure needed to dilate the balloon to a diameter larger than that of the TEVG (100 mmHg) was negligible compared to the burst pressure.

Computational Fluid Dynamics

The computed tomography scans of the TEVGs were processed with the open source software MeshLab (<https://www.meshlab.net/>) where only the inner surface of the TEVG (lumen) was kept. ANSYS SpaceClaim (ANSYS, Inc.) was used to fill the lumen and thus create the inner volume. The fluid volume was then discretized using the ANSYS Meshing tool. The inlet face was set as a velocity inlet with a constant velocity of 0.168 m/s. The outlet face was set as a

pressure outlet with a gauge pressure of 100 mmHg. The density of the blood was set as 1060 kg/m³, while TEVG wall was set as rigid and static.

$$\text{The wall shear stress was described by: } \tau_w = \mu \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)_{y=0} \quad (1)$$

Where μ represents the viscosity of the fluid, u the velocity parallel to the wall and y the perpendicular distance to the wall. The incompressible continuity and momentum equations were given according to:

$$\nabla \vec{u} = 0 \quad (2)$$

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \rho \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} = -\nabla p + \nabla \cdot \vec{\tau} + \vec{F} \quad (3)$$

The Quemada viscosity model was used to create a user-defined viscosity in the fluid solver of the commercial software Ansys Fluent (ANSYS, Inc.)³⁴. The viscosity μ was expressed as:

$$\mu = \mu_0 (1 - 0.5Hct \cdot k_Q)^{-2} \quad (4)$$

Where $\mu_0=0.00167$ Pa·S and the hematocrit level is $Hct = 0.45$. The influence of the local shear rate $\dot{\gamma}$ and the critical shear rate $\dot{\gamma}_c = 5$ S⁻¹ was modelled using the intrinsic viscosity³⁴:

$$k_Q = \frac{k_0 + k_\infty (\dot{\gamma} / \dot{\gamma}_c)^{0.5}}{1 + (\dot{\gamma} / \dot{\gamma}_c)^{0.5}} \quad (5)$$

Where $k_\infty = 1.5$ and $k_0 = 4$ are the values for infinitely large and vanishing shear rate, respectively.

Ansys Fluent (ANSYS, Inc.) was used to solve the fluid flow equations and compute wall shear stress through the TEVGs.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism, Version 8 (GraphPad Software Inc.). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The normality of the data distribution was checked with a Shapiro-Wilk test. Differences between groups were determined using unpaired t-tests (two tailed) or one-way ANOVA tests with Tukey's multiple comparison test, as specified in the result section. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

TEVG fabrication

Figure 1 illustrates the steps involved in TEVG production. Thawed CAM sheets (Figure 1a) are used to produce warp and weft threads. Warp threads are made from 5-mm wide ribbons of CAM (Figure 1b-d). Weft threads are produced from two long ribbons of CAM twisted together (Figure 1e-g). Two ribbons are used to produce the weft so the thread can better resist weekly repeated punctures in a hemodialysis context. The twisting aims to produce an elastic thread.

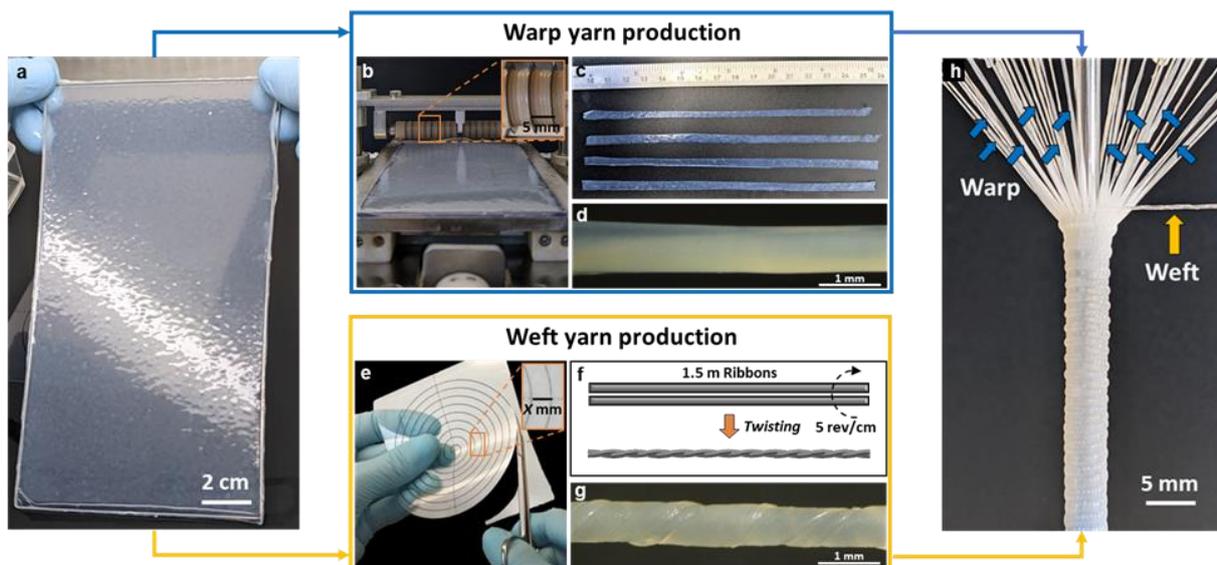


Figure 1. Production of a woven TEVG. (a) Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) sheets were cut to produce two different types of threads. (b-d) The warp was made up of group of 5-mm-wide ribbons cut along the long axis of the sheet. Once cut, the ribbons folded onto themselves and looked like threads. (e-g) The weft was made from 2 long ribbons cut in a spiral pattern in a CAM sheet that was dried over a plastic sheet. The ribbons (1.5 m) were twisted together (5 rev/cm) to form one cohesive and elastic thread. (h) The warp is tensioned in the longitudinal axis, and around, a 4.2-mm mandrel in a custom-made circular loom. The weft will be repeatedly passed between the two sets of warp ribbons to form a plain weave as described previously²⁹.

The weft is repeatedly slipped between a movable and a fixed set of tensioned warp threads to produce a vascular graft with a homogeneous wall (Figure 1h). Modified weaving parameters were warp count (the total number of longitudinal ribbons), weft ribbons width (width of the 2 ribbons used to produce the weft thread) and weft tension used during TEVG weaving.

Effect of CAM sheet strength

In order to reduce the supraphysiological strength, and associated stiffness, of our first generation of woven TEVGs, we first investigated the effect of CAM sheet strength. The structural and mechanical properties of TEVGs produced from either stronger or weaker CAM sheets are presented in **Figure 2**. Our group previously showed that the strength of CAM sheets can be adjusted with the time of culture during production^{29,31}. Here, we produced TEVGs from CAM sheets batches with either a perforation strength of 1162 ± 194 gram-force, referred as “Strong sheets”, or a perforation strength of 485 ± 93 gram-force, referred as “Weak sheets” (Figure 2a-c). A lower perforation strength was associated with thinner CAM sheets, which produced weft threads with a smaller diameter (Figure 2d, e). As anticipated, when comparing the TEVGs produced from either stronger or weaker CAM sheets, a 22% decrease in weft thread diameter led to a similar increase in weft density (19%) (Figure 2f). As expected, the 40% decrease in weft thread volume resulted in a considerable decrease of 32% in the burst pressure of TEVGs while internal diameter was kept constant, which is consistent with the loss of strength in the weaker CAM sheets (Figure 2G, Suppl. Figure 1a). More surprisingly, the decrease in wall thickness between TEVGs from stronger and weaker CAM sheets was limited to 10% (Suppl. Figure 1b).

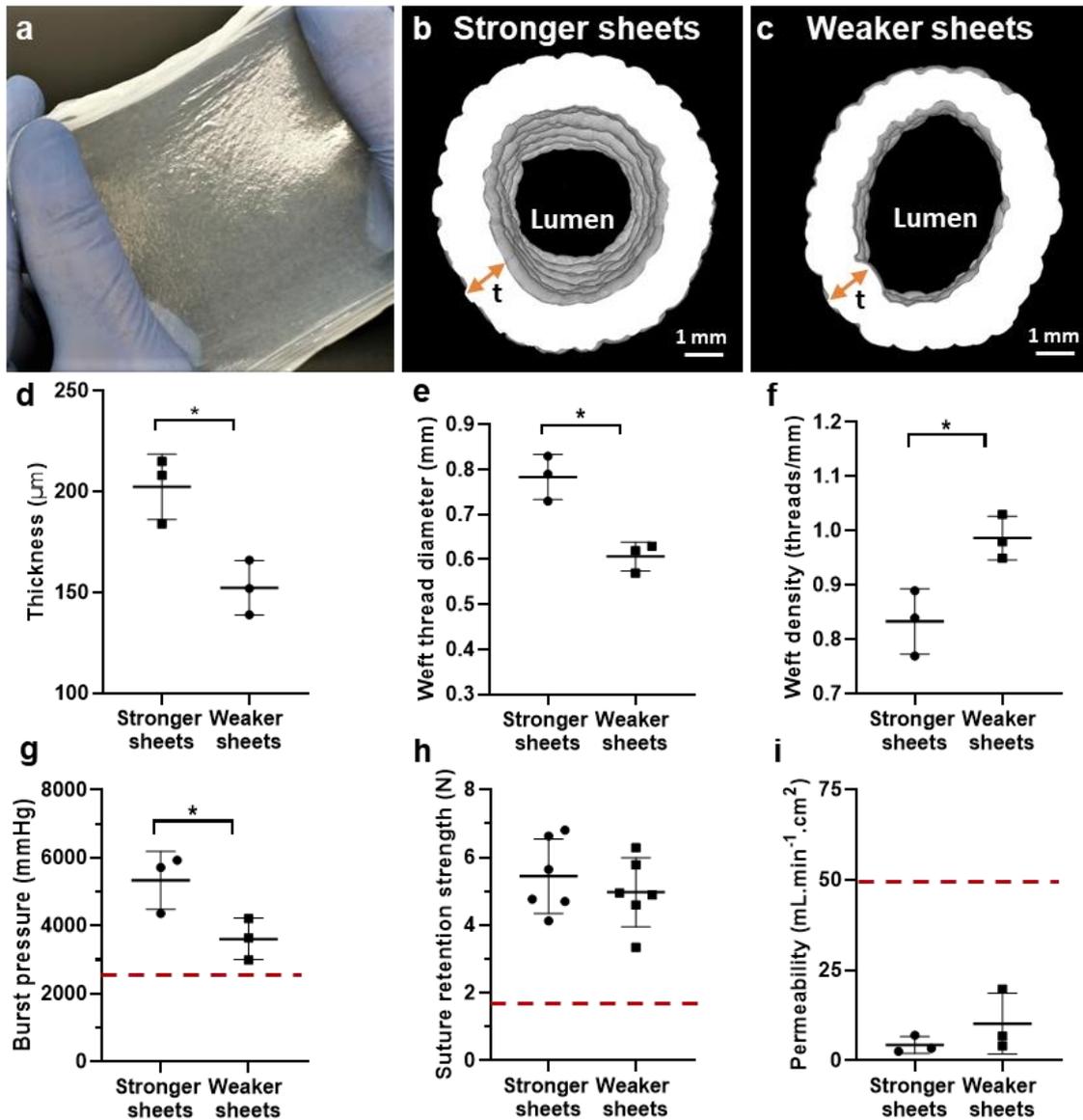


Figure 2. Structural and mechanical properties of TEVGs produced from CAM sheets with different strengths. **(a)** Macroscopic view of a CAM sheet. **(b, c)** Representative transversal views from 3D reconstructions of TEVGs (μ CT) produced from either stronger or weaker CAM sheets (t : wall thickness). **(d)** Thickness of CAM sheets as a function of their strength. **(e)** Weft thread diameter and **(f)** weft density in the woven TEVGs as a function of the strength of the CAM sheets. **(g)** Burst pressure of TEVGs produced from weaker CAM sheets decreased in comparison to the ones produced from stronger CAM sheets, while **(h)** suture retention strength ($n = 6$) and **(i)** transmural permeability were unchanged. The red dots lines represent the burst pressure (2480 mmHg) and the suture retention strength (1.8 N) of the human saphenous vein³⁹, and the maximal permeability ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) recommended for implantability³⁵, respectively. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. * denotes $p < 0.05$ (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).

The suture retention strength as well as the permeability of TEVGs were not significantly influenced by the strength of the CAM sheets (Figure 2h, i). Altogether, these results demonstrated that using weaker CAM sheets allowed us to produce significantly less strong TEVGs while keeping high suture retention strength and low permeability. Therefore, the weaker CAM sheets were used for the rest of the studies on the modification of weaving parameters. Although we were able to reduce the supraphysiological strength of our TEVG by lowering the strength of our material, our substitute remained thick, poorly flexible, and still had a very wavy luminal surface (Suppl. Figure 1c). Therefore, we varied weaving parameters to further optimize our woven graft.

Effect of warp count

We first investigated the effect of decreasing the number of longitudinal threads (warp). The structural properties of TEVGs woven with warp counts of 51, 43 and 27 are presented in **Figure 3**. Both macroscopic images and 3D reconstruction from μ CT images of our grafts were used for analysis (Figure 3a, b). A decrease in warp count gave more room for the ribbons to spread out in the circumferential direction and even allowed the weft to become visible (Figure 3c, d). Quantification showed the expected decrease in circumferential warp density and an increase in warp ribbon width (Figure 3e, f). When comparing the denser and looser designs, a 47% decrease in warp count led to a 28% decrease in warp density and a 36% increase in ribbon width. As expected, the more flattened warp observed with lower warp counts produced thinner walls (Figure 3g-i). Lowering the warp count had the unexpected effect of reducing the vessel diameter (Figure 3g, h, j). Indeed, once removed from the 4.2-mm-mandrel of the loom and fully hydrated, the TEVGs with the lowest warp count significantly contracted. This contraction is the result of the tension that is applied to the weft

during the weaving process: with more space between the warp ribbons, the stretched weft was able to pull them back together to a certain degree once removed from the mandrel.

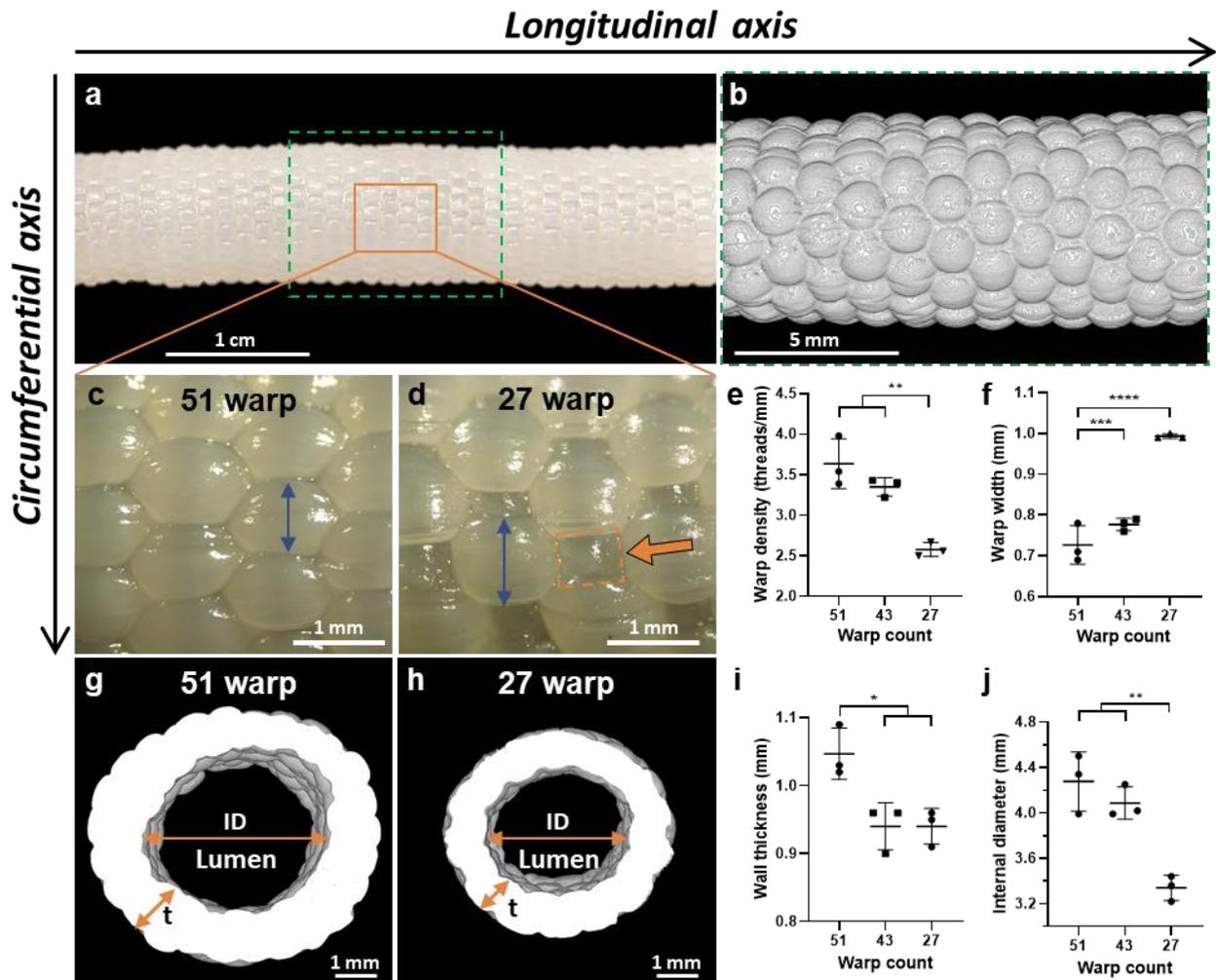


Figure 3. Structural properties of TEVGs woven with different warp counts. (a) Macroscopic side view of the graft and (b) its 3D reconstruction made from μ CT images (warp count = 27). (c, d) Closer views of the TEVG outer surface comparing 51 and 27 warp count designs. Double headed arrows point out the change in warp ribbon width and orange arrow shows the exposed weft. (e, f) Lowering warp count led to a measurable decrease in circumferential warp density and increase in warp ribbon width. (g, h) Representative transversal views from μ CT 3D reconstructions of TEVGs woven with either 51 or 27 warp counts (t: wall thickness; ID: internal diameter). (i) Wall thickness but also (j) internal diameter were significantly decreased with lower warp counts. Results are expressed as mean \pm SD, n = 3. *, **, *** and **** denotes p < 0.05, 0.01, 0.001 and 0.0001 respectively (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

The key mechanical properties of the TEVGs woven with different warp counts are presented in **Figure 4**.

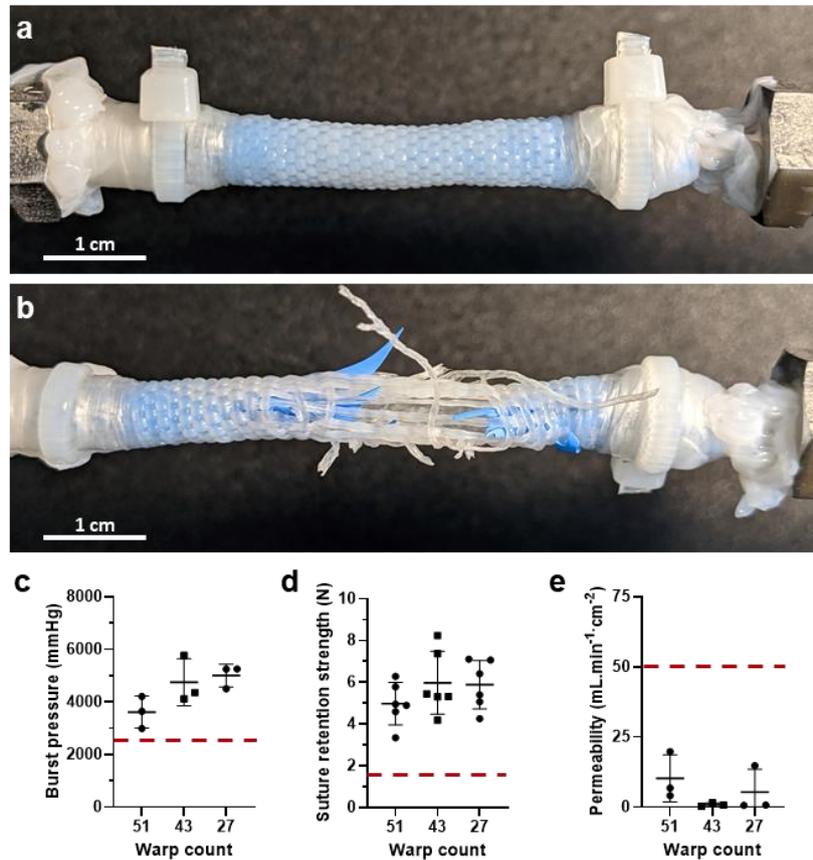


Figure 4. Mechanical properties of TEVGs woven with different warp counts. **(a)** Macroscopic view of a TEVG lined with a blue balloon pre-burst pressure test and **(b)** post-test. **(c)** Burst pressure, **(d)** suture retention strength ($n = 6$) and **(e)** transmural permeability of the TEVGs woven with a different number of warp threads. The red dots lines represent the burst pressure (2480 mmHg) and the suture retention strength (1.8 N) of the human saphenous vein³⁹, and the maximal permeability (50 mL·min⁻¹·cm⁻²) recommended for implantability³⁵, respectively. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ unless otherwise stated (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Burst pressure is an important indicator of graft implantability and reaching sufficient values in completely biological grafts has been a challenge for many approaches. Failure was always observed at pressures that exceeded that of human saphenous veins (2480 mmHg), a conduit routinely used for revascularization surgeries. The burst did not occur at a specific location of the TEVG, which demonstrated the homogeneity of the weaving (Figure 4a-c). No significant differences in burst pressure were observed between the groups (Figure 4c). This is consistent with the fact that all groups had similar weft density (number of weft threads per centimeter in length) since circumferential stress is the cause of failure in burst tests (Suppl. Figure 2). No significant differences between the three graft designs were seen when looking at two other implantability-related properties: suture retention strength and transmural permeability (Figure 4d, e). Finally, a non-statistically significant upward trend was also noted when measuring graft compliance, a property linked to long-term performance (Suppl. Figure 3). Overall, these results showed that lowering the warp count from 51 to 27 produced thinner-walled grafts while reducing material requirements by almost half and keeping implantability properties unchanged. Consequently, a warp count of 27 was used for the rest of the studies.

Effect of weft ribbons width

In addition to reducing the supraphysiologic strength of the vessels to bring it closer to that of native vessels, one of the objectives of this study was to lower wall thickness to make TEVGs more flexible and usable. We hypothesized both objectives could be achieved by reducing the amount of material in the weft, which supports most of the stress since circumferential stress in a tube is twice that of the longitudinal one. Hence, we produced TEVGs woven with a weft made from ribbons of narrower width: from 5 down to 4, and to 3 mm. As expected, using two 3-mm-wide ribbons twisted together resulted in a weft thread with a significantly smaller

diameter (**Figure 5a, b**), which in turn resulted in TEVGs with a significantly higher weft density ($\approx 40\%$ increase from 5 to 3 mm) (**Figure 5c**).

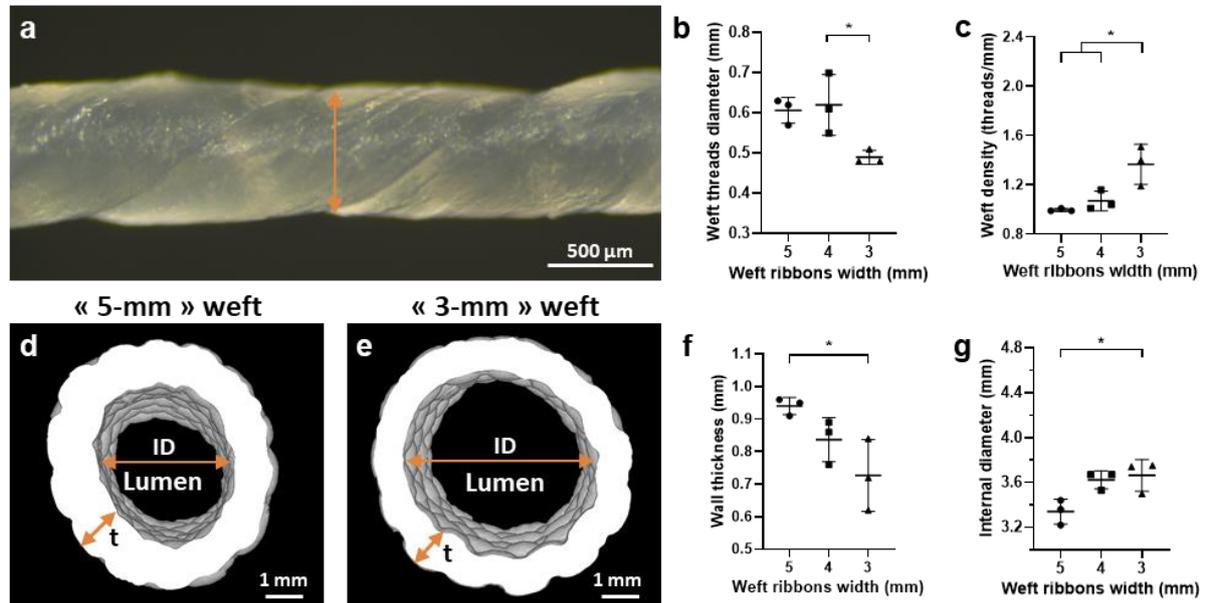


Figure 5. Influence of weft ribbons width on thread diameter and structural properties of woven TEVGs. **(a)** Close view of the thread used for the weft (two 5-mm wide ribbons twisted together at 5 rev/cm). **(b)** Weft thread diameter and **(c)** weft density in the woven TEVGs as a function of the width of the ribbons used. **(d, e)** Representative cross sections of μ CT 3D reconstructions of TEVGs woven with a weft made from two 5-mm-wide ribbons and two 3-mm-wide ribbons, respectively (*t*: wall thickness; *ID*: internal diameter). **(f)** Wall thickness and **(g)** internal diameter of TEVGs woven with weft of different thickness. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. * denotes $p < 0.05$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Moreover, this resulted in TEVGs with thinner walls, as seen on the cross sections of 3D reconstruction from μ CT (**Figure 5d-f**). However, an unforeseen effect of using a thinner weft thread was that the internal diameter of TEVGs woven increased slightly, but statistically significantly, when using a thinner thread (**Figure 5d, e, g**). This phenomenon is likely due to the fact that less tension was put in the weft when weaving with the more fragile thinner

threads. This produced a fabric with less internal tension, which did not contract as much once removed from the mandrel of the loom.

Somewhat surprisingly, despite using a weft thread that contained 40% less material, the implantability-related properties of the TEVGs did not change significantly (**Figure 6**). This loss in material may have been compensated by the 40% increase in weft density previously shown. Suture retention strength tended to decrease with lower weft ribbons width ($\approx 17\%$ decrease from 5 to 3 mm), but it remained far above the suture retention strength of the human saphenous vein, a conduit commonly used in vascular surgery (Figure 6a-d). Similarly, no significant differences in burst pressure and transmural permeability were observed between the different groups (Figure 6e-f). The compliance tended to slightly increase when lowering weft ribbons width from 4 to 3 mm, although no significant differences were observed. (Suppl. Figure 4). Taken together, these results showed that lowering the weft ribbons width from 5 to 3 mm reduced wall thickness and improved flexibility of the TEVGs, while keeping sufficiently strong implantability properties. Consequently, weft threads made of two 3-mm-wide ribbons were used for the rest of the studies.

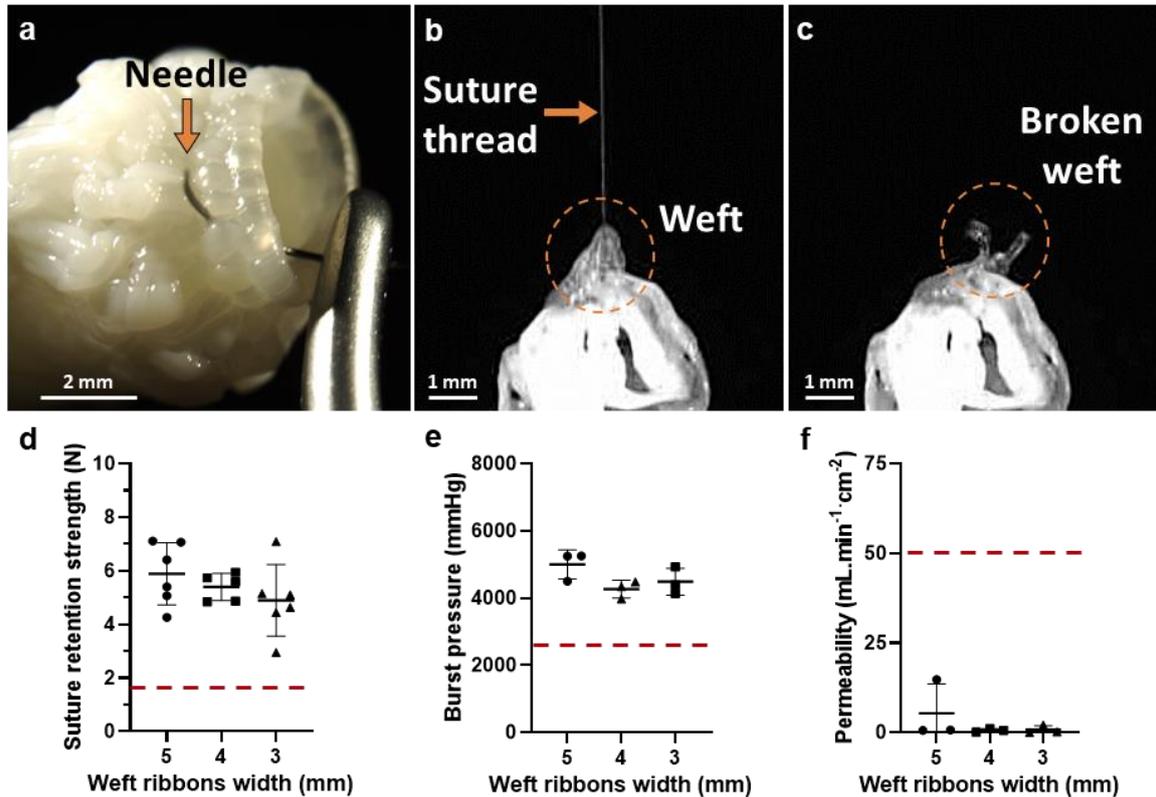


Figure 6. Mechanical properties of TEVGs woven with different weft ribbons width. (a) A single stitch of 6/0 surgical suture is placed at the end of the TEVG to test the suture retention strength. (b) The suture is pulled at a constant rate until (c) failure of the weft. (d) Suture retention strength ($n = 6$), (e) burst pressure and (f) transmural permeability of the TEVGs woven with different weft ribbons width. The red dots lines represent the suture retention strength (1.8 N) and the burst pressure (2480 mmHg) of the human saphenous vein³⁹, and the maximal permeability (50 mL·min⁻¹·cm⁻²) recommended for implantability³⁵, respectively. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ unless otherwise stated (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Effect of weft tension

The observation that some TEVGs contracted once removed from the weaving mandrel (Figures 3j and 5g) led us to hypothesize that we were losing the potential elasticity of the twisted weft ribbon by completely pretensioning it during the weaving process. Since one of the objectives of this study was to improve TEVG compliance, we tested the effect of manually applying different tension levels during weaving. TEVGs were woven either loosely (“low” tension), as tightly as possible (“high”), or at an intermediary level (“medium”).

When looking at the radial cross section of TEVGs woven with a high or a low tension in the weft (**Figure 7a, b**), we can observe that a low tension during weaving significantly increased the internal diameter in comparison to a high tension (4.2 ± 0.1 mm and 3.7 ± 0.2 mm, respectively) and decreased warp density by 9% (Figure 7c, d). The fact that compliance was significantly increased with a lower tension, from 2.9 to 4.8 %/100mmHg, supports our hypothesis (Figure 7e). Whereas the internal diameter only increased by 13%, the compliance increased by 66%. This difference in variation supports the idea that this increase in compliance is not primarily due to the increase in diameter. As anticipated, the permeability was significantly increased in the less tightly woven TEVGs in comparison to the other groups (Figure 7f, g). However, the value (24 ± 8 mL·min⁻¹·cm⁻²) remains way below 50 mL·min⁻¹·cm⁻², which is a threshold often recommended for clinical applicability³⁵. Wall thickness, burst pressure and suture retention strength were not significantly changed (Suppl. Figure 5a-c). After this optimization process, the new TEVG displayed mechanical properties that were lower than those of the first prototype, and closer to those of native blood vessels, which are the gold standard for vascular reconstruction (**Table I**). Moreover, a greater flexibility of the TEVG was noticeable when handling it.

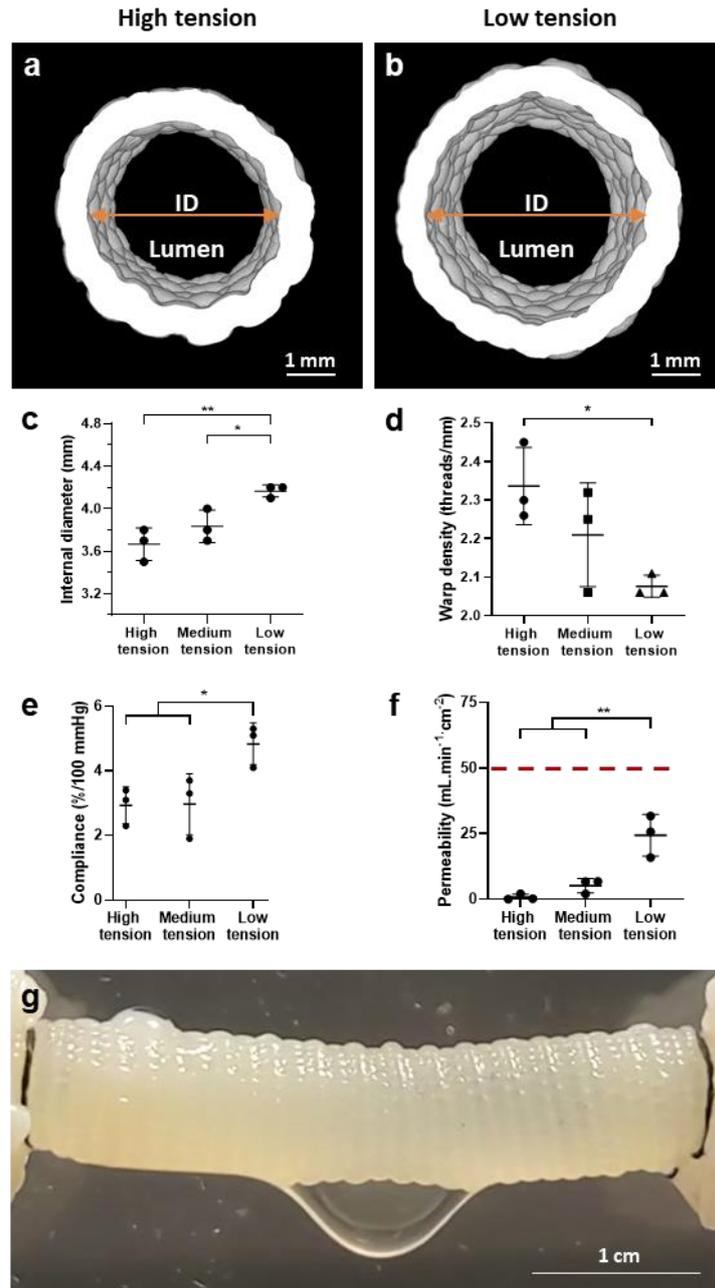


Figure 7. Influence of weft tension on the structural and mechanical properties of woven TEVGs. (a, b) Transversal cut of 3D reconstructed woven TEVGs with (a) high tension and (b) low tension in the weft (ID: internal diameter). (c) Internal diameter and (d) warp density were significantly influenced by the tension applied to the weft. (e) Compliance and (f, g) transmural permeability were significantly increased by a lower tension in the weft. The red dots line represents the maximal permeability ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) recommended for implantability³⁵. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. * and ** denotes $p < 0.05$ and 0.01 , respectively (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Table I. Mechanical properties of optimized woven TEVG compared to native blood vessels and biological TEVGs.

TEVG	Burst pressure (mmHg)	Suture retention Strength (N)	Transmural permeability (mL/min/cm ²)	Compliance (%/100 mmHg)
1 st prototype ovine TEVG	5337 ± 851 n = 3	5.5 ± 1.1 n = 6	4.3 ± 2.3 n = 3	1.3 ± 0.8 n = 3
Optimized ovine TEVG	3492 ± 307 n = 3 (p < 0.05)*	4.8 ± 1 n = 6 (p > 0.05)*	24.4 ± 8 n = 3 (p < 0.05)*	4.8 ± 0.6 n = 3 (p < 0.01)*
Human internal mammary artery ³³	3196 ± 1264 n = 16	1.38 ± 0.50 n = 6	N/A	11.5 ± 3.9 n = 7
Human saphenous vein ^{39, 44}	2480 ± 470 n = 10	1.8 ± 0.3 n = 10	N/A	1.5 ± 0.4 n not specified
TEVGs produced by Niklason <i>et al.</i> ¹³	2914 ± 928 n = 5	2.10 ± 0.53 n = 109	N/A	-
TEVGs produced by Tranquillo <i>et al.</i> ¹¹	3164 ± 325 n = 6	1.99 ± 0.56 n = 6	N/A	-

* Indicates comparison with the 1st prototype ovine TEVG. “-” Indicates that data that were not reported. “N/A” indicates that measurements were not applicable.

Lumen surface waviness

Since we aimed to produce a vascular graft with a surface that would minimize blood flow disturbance, the effects of weaving parameters on the surface waviness were of particular interest. Longitudinal cross sections of the walls of the TEVGs show the surface profile of the luminal surface (**Figure 8a**). We quantified the waviness of our samples by measuring the mean length and height of the waves (**Figure 8b**). We used the aspect ratio (height over length) to quantify the steepness of the wave. When we used a thinner weft ribbon, we saw that we produced a thinner wall with a higher weft density (**Figure 5c, f**). In **Figure 8c**, we can visualize these effects. Quantification of the waviness revealed that using a thinner weft also reduced the length and the height, but not the aspect ratio, of the waves (**Figure 8d**). However, we can see that using a lower warp count reduced the height and the aspect ratio, but not the length,

of the waves (Figure 8e). Neither the strength of CAM sheets nor weft tension had a significant effect of the waviness of woven TEVGs (Suppl. Figure 1c and Suppl. Figure 6).

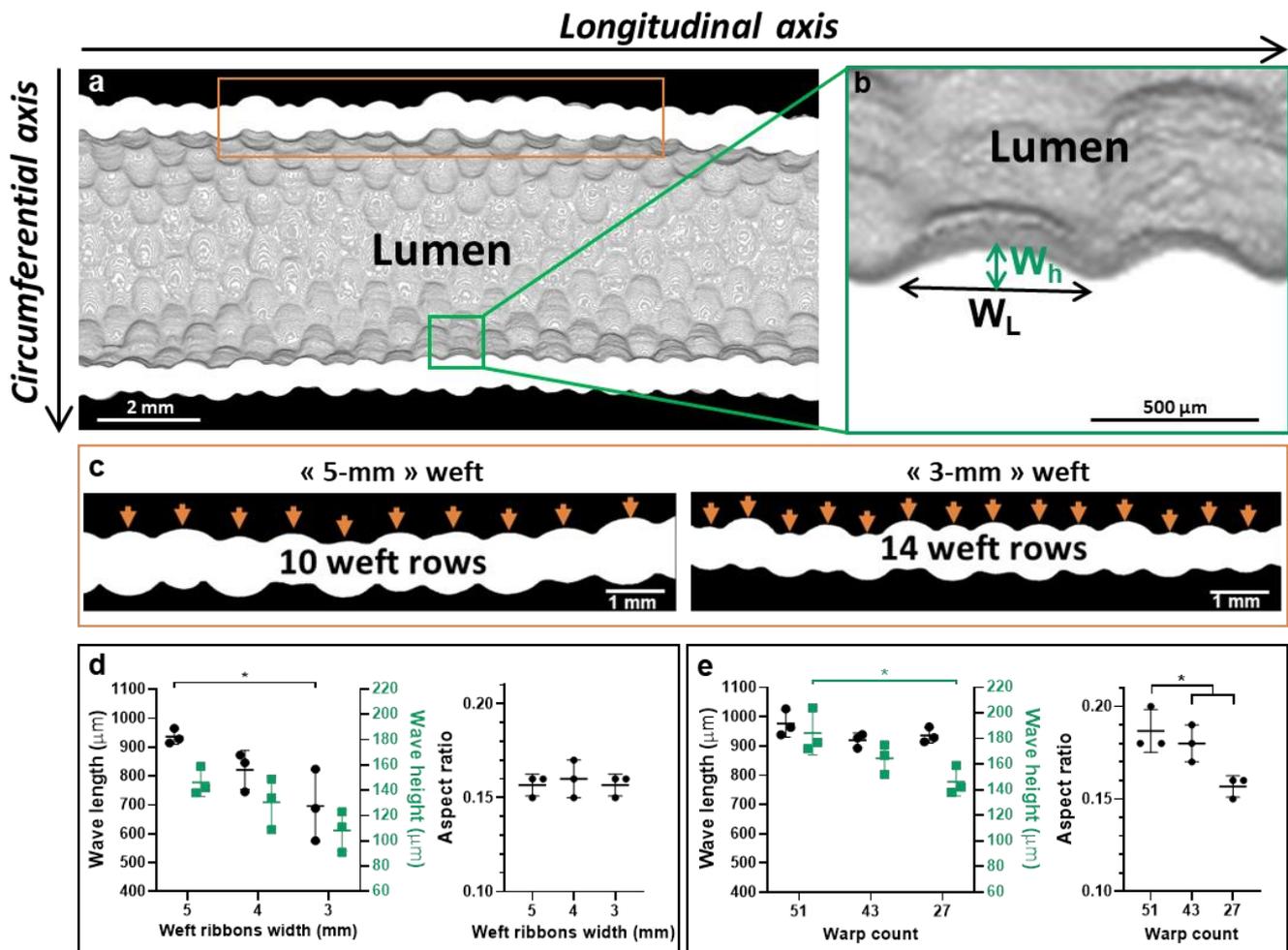


Figure 8. Effect of warp count and weft ribbons width on the luminal surface waviness of woven TEVGs. (a) Longitudinal section of a μ CT 3D reconstruction of a woven TEVG with (b) a higher magnification view of the waves on the luminal surface (W_L : length of the wave; W_h : height of the wave; AR: aspect ratio). (c) Longitudinal binary images of the walls of TEVGs woven with weft made of two 5-mm-wide or 3-mm-wide ribbons twisted together. (d) Effect of the weft size on the waviness of the luminal surface (warp count: 27). (e) Effect of the warp count on the waviness of the luminal surface (weft: 5-mm-wide ribbons). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Computational fluid dynamics (CFD) simulations of blood flow

Next, we wanted to evaluate the effect of changes in weaving design on wall shear stress (WSS). Representative CFD models were made from μ CT images of the TEVGs from our initial weaving design (warp count: 51, weft size: 2 x 5-mm-wide ribbons, weft tension: high) and from grafts with the optimized weaving design (warp count: 27, weft size: 2 x 3-mm-wide ribbons, weft tension: low) to simulate blood flow within the grafts (**Figure 9a, b**). These models predicted that peak shear stress will be generated at the top of the waves with much lower WSS in the valleys between the weft threads. These models also indicated that the optimized design will generate lower peak shear stress as well as a more homogenous WSS. Quantification of WSS value frequencies confirmed these observations as it revealed that intermediate values were more common on the optimized surface while extreme values were rarer (**Figure 9c**). Cumulative frequencies of WSS values were calculated over three ranges: low (<0.5 Pa), normal (0.5-3 Pa) and high (>3 Pa) wall shear stress (**Figure 9d**). The results showed higher frequency over the normal WSS range for the TEVG with the optimized design, with a frequency reduction of 19% and 8% in the high and low WSS ranges respectively.

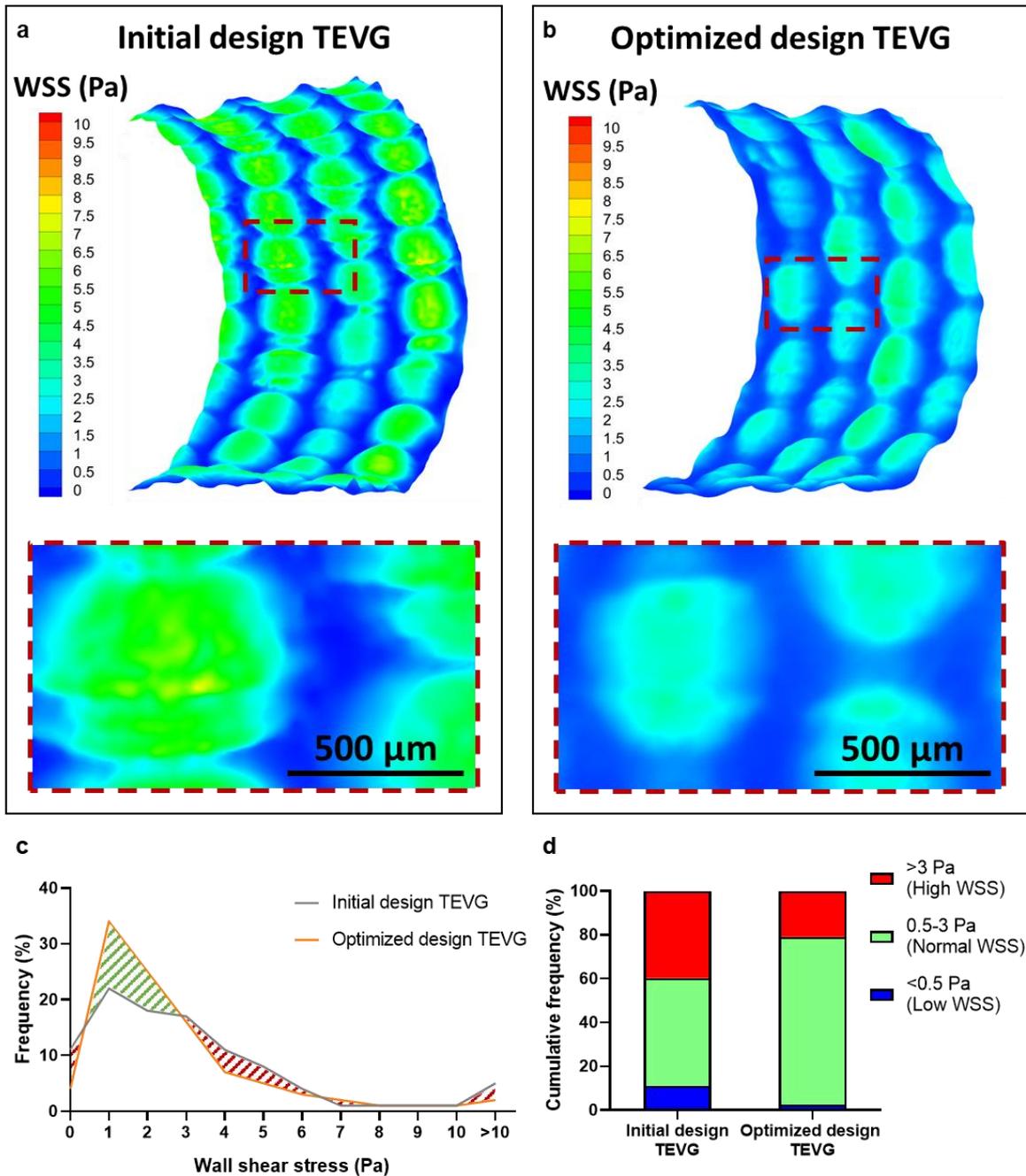


Figure 9. Effect of luminal surface waviness of woven TEVGs on wall shear stress (WSS) simulation. **(a, b)** CFD simulation of WSS distribution in representative 3D reconstructions of woven TEVGs made from **(a)** the first design and **(b)** the optimized design. **(c)** Frequency of WSS values in TEVGs made according to the initial or optimized design. The green hashed zone represents the difference in WSS frequency in the range of normal WSS (0.5 – 3 Pa); the red hashed zones represent the difference in WSS frequency in the range of low (<0.5 Pa) and high WSS (>3 Pa). **(d)** Cumulative frequency of WSS values over low, normal, and high WSS ranges for both models.

Overview of the effect of weaving parameters on TEVG properties

Figure 10 summarizes what was learned about the effect of weaving parameters on the TEVG properties.

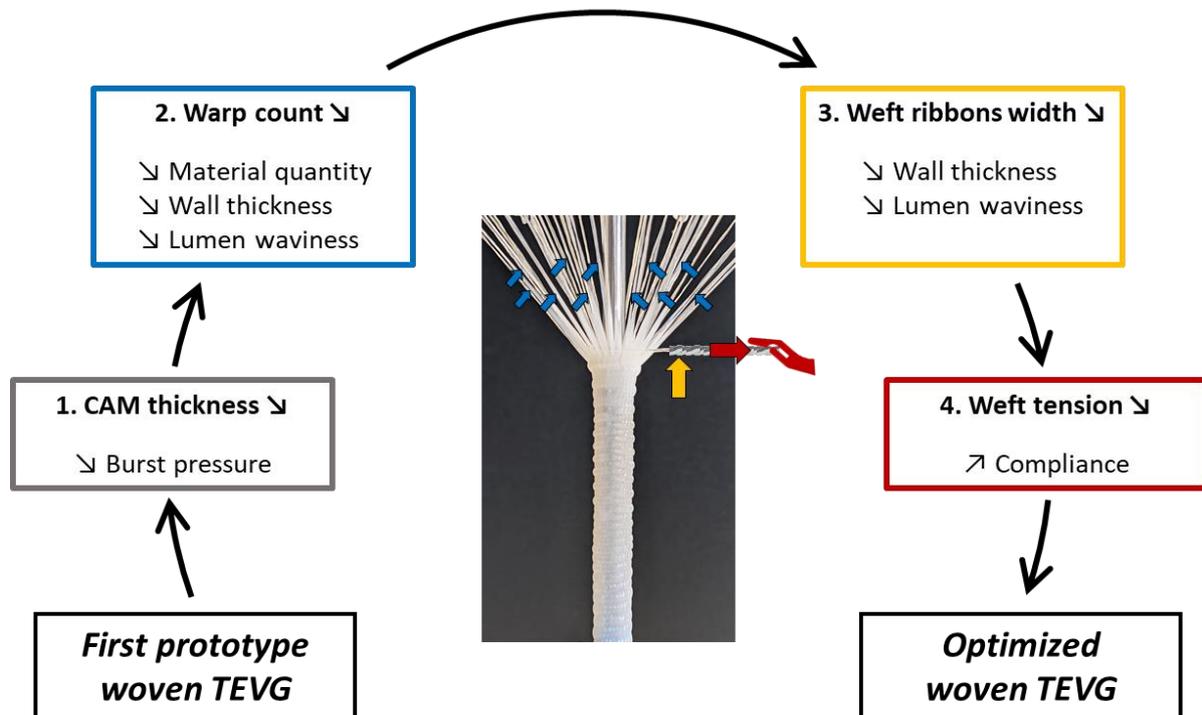


Figure 10. Overview of the effect of weaving parameters on the TEVG properties.

Effect of the decellularization process

In this study, all experiments were performed with “devitalized” CAM (see method section). While previous data suggest that allogeneic “devitalized” CAM will be well-tolerated, we wanted to study the effect of the decellularization process on the mechanical properties of woven TEVGs in case this type of popular ECM treatment would become relevant^{32,36}. Figure 11 shows the comparison between the properties of woven TEVGs from devitalized or decellularized CAM sheets. DAPI staining and DNA quantification confirmed the effectiveness of the decellularization process of the CAM sheets (Figure 11a-c). DNA content was reduced by 97% to 86 ± 34 ng/mg dry CAM. Uniaxial tensile test results showed that decellularized

ribbons had a slightly lower force at failure (-13%) than devitalized ribbons (Figure 11d). The weft threads made from decellularized ribbons had a significantly smaller diameter than weft threads made from devitalized ribbons (Figure 11e), which, consistent with earlier results (Figure 8d), produced a significant decrease in surface waviness (Suppl. Figure 7a). The weave of devitalized TEVGs had visibly wider warp thread and appeared to have a less dense weft than decellularized grafts (Figure 11f and g, respectively). This observation was confirmed by a 62% increase in weft density (Figure 11h) and a more modest, but significant, decrease in warp density of 10% (Figure 11i) when TEVGs were decellularized. Decellularized grafts also had a slightly smaller internal diameter (7%) but a much thinner (35%) wall (Suppl. Figure 7b, c). The most important difference between devitalized and decellularized TEVGs was the much higher transmural permeability (288%) of decellularized TEVGs (Figure 9j). Decellularized TEVGs had a significant higher burst pressure (96%) but unchanged suture retention strength compared to devitalized TEVGs (Figure 11k, l). Finally, consistent with the increased burst pressure, the decellularized TEVGs had a significantly lower compliance (Figure 11m).

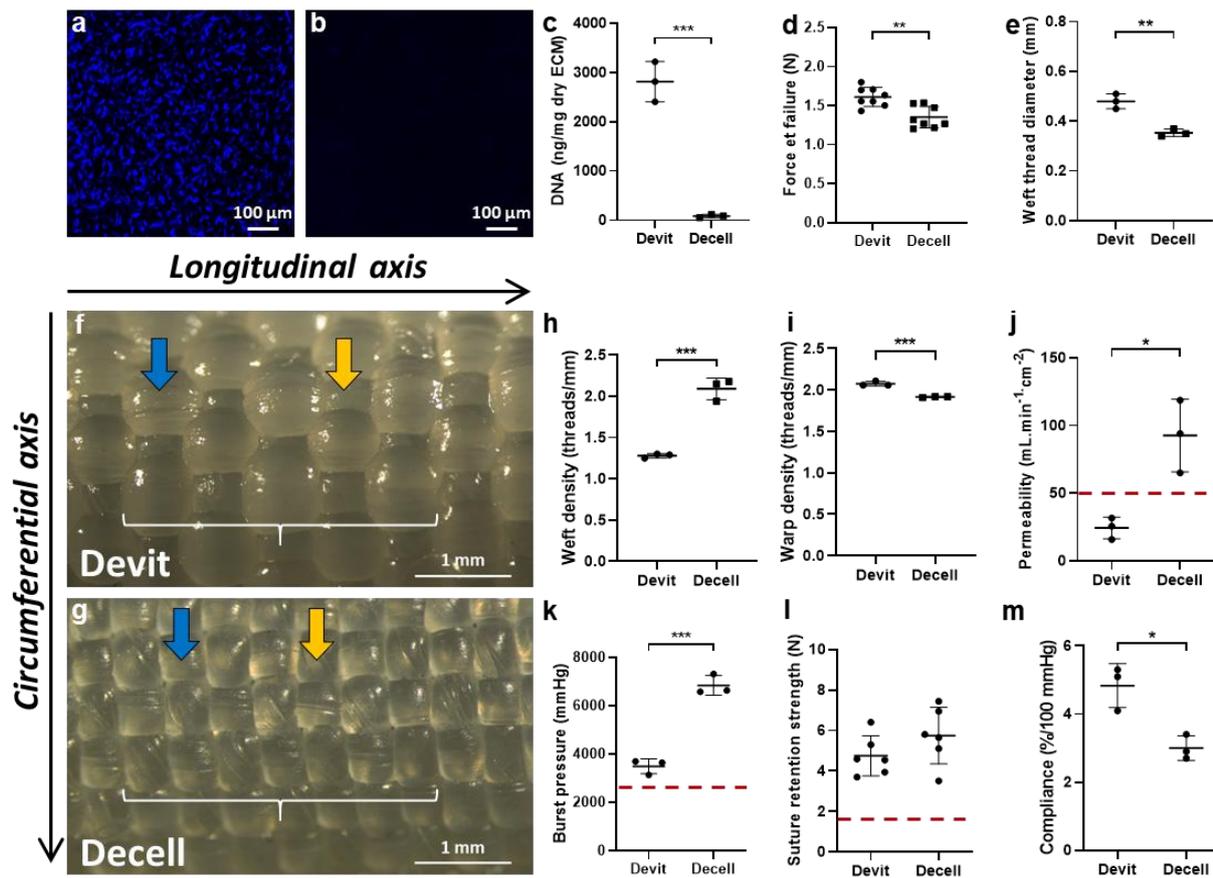


Figure 11. Decellularization of CAM sheets and mechanical properties of woven TEVGs. (a, b) DAPI staining of (a) devitalized and (b) decellularized CAM sheets, confirmed by (c) DNA quantification. (d) Force at failure of devitalized and decellularized threads ($n = 6$, one representative experiment out of three). (e) Weft thread diameter as a function of devitalization or decellularization. Weaving with either (f) devitalized or (g) decellularized threads produced a homogenous wall, although (h) weft density was significantly higher in TEVGs from decellularized CAM, as shown by brackets of equal length. The blue arrows show a warp thread whereas the yellow arrows show the weft in both TEVGs. Devit: devitalized, Decell: decellularized. (i) Warp density was slightly but significantly decreased in decellularized TEVGs. (j) A much higher permeability was observed in decellularized TEVGs. (k) Burst pressure of decellularized TEVGs increased in comparison to devitalized ones, while (l) suture retention strength ($n = 6$) was unchanged. (m) A much higher compliance was observed in TEVGs woven with devitalized threads. The red dots lines in j, k and l represent the maximal permeability ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) recommended for implantability³⁵, the burst pressure (2480 mmHg) and suture retention strength (1.8 N) of the human saphenous vein³⁹, respectively. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ unless otherwise stated. *, ** and *** denotes $p < 0.05$, 0.01 and 0.005, respectively (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).

Discussion

Mechanical mismatch between a vascular graft and the host artery is considered as an important cause of intimal hyperplasia, which is a major cause of graft failure^{21,23–26,37}. Our group recently published two studies in which TEVGs were woven either from CAM or human amniotic membrane threads^{29,38}. Both grafts displayed burst pressure, suture retention strength, and transmural permeability that would support implantation, but would create a mechanical mismatch with native blood vessels. In the amniotic membrane study, high transmural permeability was reduced by using wider threads³⁸. In the current study, we took advantage of the versatility of textile assembly to better understand how to control the overall properties of our woven CAM-based TEVG. We investigated the effects of CAM sheet strength as well as the effects of three key weaving parameters: warp counts, weft width and weft tension during weaving. The optimized woven TEVGs with weaker CAM sheets displayed a burst pressure and a compliance closer to native blood vessels, while still having high suture retention strength and low transmural permeability. In addition, this design required only half the material originally needed. They had thinner walls, which would make them more convenient for clinical use because of their increased flexibility and easier suturability. Moreover, the lumen surface waviness was decreased to reduce high wall shear stress regions. Finally, we demonstrated the feasibility of producing decellularized woven TEVGs with mechanical properties suitable for implantation, although the decellularization process significantly changed the overall properties of the woven substitutes.

Burst pressure, and more generally mechanical strength, is an essential property for the implantation of a vascular graft. The burst pressure of the human saphenous vein (≈ 2500 mmHg) is often taken as the minimum required burst pressure for vascular substitute

development³⁹. Surprisingly, excessive burst pressure values are not discussed in TEVGs studies, despite the fact that high burst pressure should lead to mechanical mismatch^{24,25}. Our first woven TEVGs safely withstood blood pressure once implanted, but displayed a much higher burst pressure than native blood vessels (>5000 mmHg)²⁹. In this work, we effectively reduced their burst pressure primarily by using CAM sheets with lower puncture strength. As far as weaving parameters are concerned, we did not expect the warp count to influence burst pressure since this property depends on circumferential stress, also known as the hoop stress, which should be carried by the weft thread. Nonetheless, we observed an increasing trend in burst pressure (38%). This surprising result may be linked to an unforeseen effect of decreasing the warp count. Indeed, lowering the warp count allowed for an increase compression of the warp in the circumferential direction, resulting in a smaller diameter (-23%) despite using the same support mandrel. We hypothesize that this decrease in diameter, which would reduce the circumferential stress for a given pressure, largely explains the trend of decreasing burst pressure. However, we did expect to significantly decrease the burst pressure by lowering weft ribbons width from 5 mm to 3 mm. But, since weft density concomitantly increased, it compensated for the reduced weft ribbon width, and no significant change in burst pressure was observed. Lastly, we did not expect to lower the burst pressure by lowering weft tension. Although the internal diameter increased with lower tension, this change was minor (14%) and resulted in no significant changes in burst pressure. After optimizing all the production parameters, TEVGs displayed a burst pressure in the range of human small diameter arteries (≈ 3500 mmHg)³³.

The transmural permeability of a vascular substitute remains an important property and $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ is often suggested in the literature as a threshold³⁵. The permeability of our optimized woven TEVG was approximately half this value. By decreasing warp count to 27

warp threads, we decreased warp density from 3.6 to 2.6 threads per mm (-28%), without any visible effect on transmural permeability. However, when we reduced warp density from 2.3 to 2.1 threads per mm (-9%) by reducing tension in the weft thread, leakage was increased by more than 24 folds. This indicates that transmural permeability does not change progressively with warp density but rather that there is a density threshold below which it increases drastically.

Wall thickness has been shown to affect the *in vivo* remodeling of vascular substitutes. Indeed, a wall thickness closer to that of native blood vessel demonstrated better compliance and kink resistance, and led to the generation of a more native neotissu^{40,41}. Moreover, thicker walls make the substitute more challenging to handle and suture. Wall thickness of biological TEVGs is usually measured *in vitro* by analysis of histological images. Here, wall thickness of woven TEVGs was measured with μ CT, which allowed us to image the TEVG without causing structural changes through dehydration and harsh chemical treatments. In this study, we showed that by mainly decreasing the warp count and weft ribbons width, we reduced wall thickness of TEVGs by 38%, from 1.12 mm down to 0.69 mm, which is similar to that of the human coronary artery⁴². In the end, we reduced the amount of material used by 60% compared with the original design. With the new design, we produced an optimized TEVG with thinner walls, which is easier to handle and suture, while drastically reducing production costs.

Although burst pressure, permeability and suture retention strength are preconditions for the implantation and short-term success of a TEVG, compliance is of importance when it comes to mid- to long-term patency^{23,25,43}. In this study, despite the fact that a decreasing warp count or weft ribbons width produced a slightly more flexible TEVG with thinner walls, these changes only resulted in a trend of decreasing in compliance. Woven structures are inherently less

compliant than knitted ones, but we chose that textile assembly method for its ability to produce leakproof walls. Nonetheless, we attempted to introduce elasticity in the circumferential direction of the graft by using a weft made from two ribbons twisted together. However, we hypothesized that the weft was prestretched when TEVG were woven with a high tension, thus cancelling its elasticity. While controlling tension in this thread was challenging since these TEVGs were handmade at this stage, we demonstrated that the compliance of the TEVGs was significantly increased by lowering weft tension. This is likely the result of preserving the elasticity in the twisted thread. Alternatively, the increase in compliance could be the result of the concomitant increase in internal diameter since properties are related. However, the internal diameter increased by only 14% while the compliance increased by 66%, suggesting that most of the change in compliance was due to a lower tension in the weft. Our final design produced a TEVG with a compliance of 4.8%/100 mmHg. This value compares favorably with the current gold standard conduits for vascular repair as it exceeds the compliance of the saphenous vein (1.5%/100 mmHg) and is closer, in comparison to our first prototype, to that of the internal mammary artery (11.5%/100 mmHg)^{39,44}. However, an important limitation is that these were short-term measurements that do not guaranty that this elastic behavior will persist. While long-term *in vitro* studies can be envisioned, their ability to predict *in vivo* results can also be limited considering that a biological tissue-engineered graft is expected to be significantly remodeled after implantation^{17,45-47}.

Another intrinsic property of a woven TEVG is a wavy luminal surface. Flow oscillations and wall shear stress are well-known for influencing cell behavior and *in vivo* remodeling^{48,49}. In particular, low shear stress zones have been correlated with the development of intimal hyperplasia^{50,51}. Sho *et al.* showed that a low wall shear stress (below 5 dynes/cm²) increases

intimal thickening⁵¹. To minimize the surface profile of our TEVG, we decreased luminal waviness by lowering the warp count and weft ribbons width. Computational flow simulations predicted an important reduction of low shear stress areas in optimized TEVG compared to the initial design (from 11.2% to 2.5%). Additionally, simulations predicted optimized TEVG to have less high shear stress regions (superior to 30 dynes/cm²), which have been shown to promote thrombosis through platelet activation⁵². Overall, the waviness of the optimized TEVG is predicted to promote a more physiological range of wall shear stress values, which may limit intimal hyperplasia by promoting an antithrombotic endothelium⁵²⁻⁵⁵. However, it is important to note this numerical model was simplified as it assumed a steady and laminar flow and a non-pulsatile pressure. While this model did not reproduce the complex turbulent flow observed in hemodialysis access grafts, a general improvement of flow conditions would be expected nonetheless.

Our strategy relies on the production of a non-living, allogeneic, and off-the-shelf vascular graft. We have favored devitalization instead of decellularization because it is a simpler process that does not have the potential to leave toxic residues nor to denature the extracellular matrix. We have shown that devitalized CAM-based TEVGs (produced by a rolled sheet approach) did not cause any clinically detectable immune response in the context of the successful implantation of three allogeneic grafts¹⁹. In a more recent study, *in vivo* remodeling and inflammatory response of CAM threads have been investigated in nude rats³². These animals, who have a functional innate immune system, did not aggressively degrade the CAM while they rapidly destroyed a clinically-used denatured ECM. Instead, a slow remodeling with very mild inflammation was observed and mechanically sound CAM threads could even be explanted after 6 months³². Taken together, these studies showed that our material is well-accepted by the host despite the presence of cellular debris. Nonetheless, the active removal

of these debris by decellularization could improve the performance of CAM-based products if some level of immune response was to be detected in future studies. In this study, we demonstrated that we can effectively decellularize the CAM using a CHAPS-based protocol inspired by the approach of the group of Niklason^{56–58}. Decellularized CAM threads had no visible nuclei in standard histology or after DAPI staining and contained only 3% of the initial DNA. This is similar to the results of Syedain *et al.* who showed that, in the case of a TEVG made by ovine fibroblasts cast in a fibrin gel, a DNA content reduced by more than 90% after decellularization did not trigger allogeneic lymphocyte activation⁴⁶. While DNA content was slightly above the often-cited threshold of 50 ng/mg dry ECM, it is good to remember that this value was established as a “rule of thumb” based on disparate animal studies and should not be taken as a precise nor predictive value for all applications⁵⁹.

Decellularization reduced the force at failure of CAM threads by only 13%. Such small loss of mechanical strength after decellularization been reported multiple times for various ECM-derived materials^{32,56,60,61}. However, decellularization substantially reduced the volume of the weft thread (44%). This is consistent with the reported removal of important quantities of ECM components such as glycosaminoglycans (GAGs) by detergent-based decellularization^{57,62–65}. A consequence of using a thinner CAM thread was that the weft density increased in decellularized TEVGs, resulting in a considerably higher burst pressure and lower compliance when compared to devitalized grafts. Moreover, this decrease in thread volume led to a reduced warp density, which resulted in much more permeable TEVGs. These results demonstrate that producing a decellularized CAM-based TEVG with clinically relevant mechanical properties is possible, but further optimization of the weaving design would be needed to develop such a graft. However, these results also show that decellularization drastically affects CAM properties, which suggests that the process can partly denature the

ECM as reported by others^{60,64,65}. For now, we will continue to use devitalized CAM unless convincing evidence suggest that this material causes an immune reaction or if regulatory requirements demand it.

Zhang *et al.* is the only other group that produced a completely biological TEVG using a textile approach. Their strategy relied on the use of chemically-extracted and crosslinked collagen in the form of threads that were knitted in a tube⁶⁶. They produced a graft with satisfactory burst pressure but which was too porous. Therefore, they added an electrospun outer shell of collagen nanofibers to limit the transmural permeability inherent to knitted fabrics. However, the fact that permeability was not determined is somewhat surprising. Moreover, suture retention strength of these grafts was too low for implantation, with or without the added outer layer. To overcome this lack of mechanical strength, they had to resort to introducing biodegradable synthetic polymer threads in their constructs¹⁰. While these grafts displayed burst pressure and suture retention strength appropriate for implantability, the chemically modified collagen and the synthetic polymers will have limited biological functions and will be aggressively degraded by the host. Thus, this approach will depend on the ability of the patient's body to regenerate rapidly a new blood vessel to avoid the mechanical failure of the graft. One of the important challenges of such approaches is that the balance between degradation, inflammation, and regeneration can depend on patient age, health, and other unknown factors. One of the advantages of the CAM-based approach is that it provides a large window for the host to achieve the needed remodeling of the graft.

Conclusion

In this study, we developed an optimized weaving design to produce a completely biological and ovine TEVG with improved structural and mechanical properties in comparison to our first prototype. By better understanding the relationship between weaving parameters and graft properties, we have created a knowledge base that will support the development of woven TEVGs or other CAM-based textiles. In particular, this toolbox could be used to adjust the graft design in view of *in vivo* performance. The next step will be to implant this optimized ovine TEVG as an allogeneic arteriovenous shunt to study its remodeling and performance in a mechanical and immunological context mimicking our clinical strategy.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the authors.

Acknowledgments

This work was supported by the European Research Council (Advanced Grant #785908). We thank Grégory Hauss from *Placamat* for his technical help and acquisitions with μ CT imaging.

Author Disclosure Statement

Authors declare that they have no competing financial interests.

References

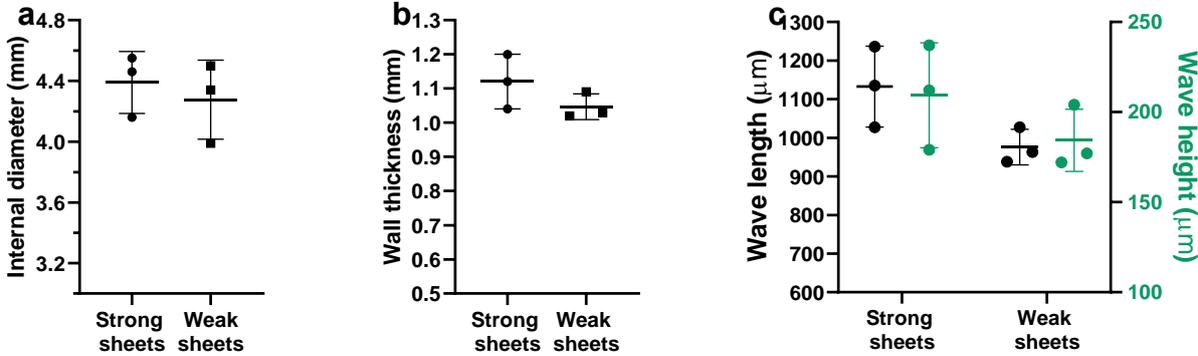
1. Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J. & van Bockel, J. H. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **27**, 357–362 (2004).
2. Rotmans, J. I., Heyligers, J. M. M., Stroes, E. S. G. & Pasterkamp, G. Endothelial progenitor cell-seeded grafts: Rash and risky. *Can. J. Cardiol.* **22**, 1113–1116 (2006).
3. Sayers, R. D., Raptis, S., Berce, M. & Miller, J. H. Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluoroethylene. *Br. J. Surg.* **85**, 137 (1998).
4. Weinberg, C. B. & Bell, E. A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. *Science (80-)*. **231**, 397–400 (1986).
5. Kimicata, M., Swamykumar, P. & Fisher, J. P. Extracellular matrix for small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng. - Part A* **26**, 1388–1401 (2020).
6. Moore, M. J., Tan, R. P., Yang, N., Rnjak-kovacina, J. & Wise, S. G. Bioengineering artificial blood vessels from natural materials. *Trends Biotechnol.* **40**, 1–15 (2022).
7. Hussey, G. S., Dziki, J. L. & Badylak, S. F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 159–173 (2018).
8. Goldstein, J. D. *et al.* Development of a reconstituted collagen tendon prosthesis. A preliminary implantation study. *J. Bone Jt. Surg.* **71**, 1183–1191 (1989).
9. Law, J. K., Parsons, J. R., Silver, F. H. & Weiss, A. B. An evaluation of purified reconstituted type I collagen fibers. *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 961–977 (1989).
10. Zhang, F. *et al.* A hybrid vascular graft harnessing the superior mechanical properties of synthetic fibers and the biological performance of collagen filaments. *Mater. Sci. Eng. C* **118**, (2021).
11. Syedain, Z. H. *et al.* A completely biological “ off-the-shelf ” arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
12. Motta, S. E. *et al.* Human cell-derived tissue-engineered heart valve with integrated Valsalva sinuses: towards native-like transcatheter pulmonary valve replacements. *npj Regen. Med.* **4**, (2019).
13. Lawson, J. H. *et al.* Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: Two phase 2 single-arm trials. *Lancet* **387**, 2026–2034 (2016).
14. Gutowski, P. *et al.* Six-year outcomes of a phase II study of human-tissue engineered blood vessels for peripheral arterial bypass. *JVS-Vascular Sci.* **4**, 100092 (2022).
15. Jakimowicz, T. *et al.* Five Year Outcomes in Patients with End Stage Renal Disease Who Received a Bioengineered Human Acellular Vessel for Dialysis Access. *EJVES Vasc. Forum* **54**, 58–63 (2022).
16. Kirkton, R. D. *et al.* Bioengineered human acellular vessels recellularize and evolve into living blood vessels after human implantation. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1–11 (2019).
17. L’Heureux, N. *et al.* Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* **12**, 361–365 (2006).
18. L’Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L. & Auger, F. A. A completely biological tissue-

- engineered human blood vessel. *FASEB J.* **12**, 47–56 (1998).
19. Wystrychowski, W. *et al.* First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J. Vasc. Surg.* **60**, 1353–1357 (2014).
 20. McAllister, T. N. *et al.* Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* **373**, 1440–1446 (2009).
 21. Post, A. *et al.* Elucidating the role of graft compliance mismatch on intimal hyperplasia using an ex vivo organ culture model. *Acta Biomater.* **89**, 84–94 (2019).
 22. Jeong, Y., Yao, Y. & Yim, E. K. F. Current understanding of intimal hyperplasia and effect of compliance in synthetic small diameter vascular grafts. *Biomater. Sci.* **8**, 4383–4395 (2020).
 23. Abbott, W. M., Megerman, J., Hasson, J. E., L'Italien, G. & Warnock, D. F. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J. Vasc. Surg.* **5**, 376–382 (1987).
 24. Ballyk, P. D., Walsh, C. & Butany, J. Compliance mismatch may promote graft–artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J. Biomech.* **31**, 229–237 (1997).
 25. Kidson, I. G. The effect of wall mechanical properties on patency of arterial grafts. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **65**, 24–29 (1983).
 26. Trubel, W. *et al.* Compliance mismatch and formation of distal anastomotic intimal hyperplasia in externally stiffened and lumen-adapted venous grafts. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **10**, 415–423 (1995).
 27. Singh, C., Wong, C. S. & Wang, X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J. Funct. Biomater.* **6**, 500–525 (2015).
 28. Akbari, M. *et al.* Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 751–766 (2016).
 29. Magnan, L. *et al.* Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly “bio” material for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **105**, 111–120 (2020).
 30. Potart, D. *et al.* The cell-assembled extracellular matrix : A focus on the storage stability and terminal sterilization of this human “ bio ” material. *Acta Biomater.* **166**, 133–146 (2023).
 31. Torres, Y. *et al.* Cell-assembled extracellular matrix (CAM) sheet production : Translation from using human to large animal cells. *J. Tissue Eng.* **12**, 1–14 (2021).
 32. Magnan, L. *et al.* In vivo remodeling of human cell-assembled extracellular matrix yarns. *Biomaterials* **273**, (2021).
 33. Konig, G. *et al.* Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* **30**, 1542–1550 (2009).
 34. Sprenger, L., Dutz, S., Schneider, T., Odenbach, S. & Hafeli, U. O. Simulation and experimental determination of the online separation of blood components with the help of microfluidic cascading spirals. *Biomicrofluidics* **9**, 1–15 (2015).
 35. Jonas, R. A., Schoen, F. J., Levy, R. J. & Castaneda, A. R. Biological Sealants and Knitted Dacron: Porosity and Histological Comparisons of Vascular Graft Materials with and without Collagen and Fibrin Glue Pretreatments. *Ann. Thorac. Surg.* **41**, 657–663 (1986).
 36. Wystrychowski, W. *et al.* Case study: First implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *J. Vasc. Access* **12**, 67–70 (2011).

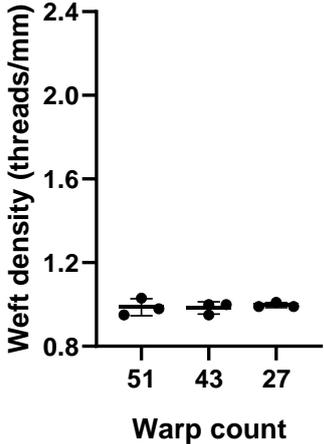
37. Furdella, K. J. *et al.* In-vivo assessment of a tissue engineered vascular graft computationally optimized for target vessel compliance. *Acta Biomater.* **123**, 298–311 (2021).
38. Grémare, A. *et al.* Development of a vascular substitute produced by weaving yarn made from human amniotic membrane. *Biofabrication* **14**, (2022).
39. Schaner, P. J. *et al.* Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J. Vasc. Surg.* **40**, 146–153 (2004).
40. Wu, Y. L. *et al.* Electrospun Tissue-Engineered Arterial Graft Thickness Affects Long-Term Composition and Mechanics. *Tissue Eng. - Part A* **27**, 593–603 (2021).
41. Johnson, R., Ding, Y., Nagiah, N., Monnet, E. & Tan, W. Coaxially-structured fibres with tailored material properties for vascular graft implant. *Mater. Sci. Eng. C* **97**, 1–11 (2019).
42. Fayad, Z. A. *et al.* Noninvasive In Vivo Human Coronary Artery Lumen and Wall Imaging Using Black-Blood Magnetic Resonance Imaging. *Circulation* **102**, 506–510 (2000).
43. Walden, R., L'italien, G. J., Megerman, J. & Abbott, W. M. Matched Elastic Properties and Successful Arterial Grafting. *Arch. Surg.* **115**, 1166–1169 (1980).
44. Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G. & Seifalian, A. M. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br. J. Surg.* **87**, 1516–1524 (2000).
45. Blum, K. M. *et al.* Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth. *Commun. Med.* **2**, 1–21 (2022).
46. Syedain, Z. H., Meier, L. A., Lahti, M. T., Johnson, S. L. & Tranquillo, R. T. Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Eng. - Part A* **20**, 1726–1734 (2014).
47. Breuer, T., Jimenez, M., Humphrey, J. D., Shinoka, T. & Breuer, C. K. Tissue Engineering of Vascular Grafts: A Case Report from Bench to Bedside and Back. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **43**, 399–409 (2023).
48. Motta, S. E. *et al.* Geometry influences inflammatory host cell response and remodeling in tissue-engineered heart valves in-vivo. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
49. van Haaften, E. E., Quicken, S., Huberts, W., Bouten, C. V. C. & Kurniawan, N. A. Computationally guided in-vitro vascular growth model reveals causal link between flow oscillations and disorganized neotissue. *Commun. Biol.* **4**, (2021).
50. Zarins, C. K. *et al.* Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ. Res.* **53**, 502–514 (1983).
51. Sho, E. *et al.* Arterial enlargement, tortuosity, and intimal thickening in response to sequential exposure to high and low wall shear stress. *J. Vasc. Surg.* **39**, 601–612 (2004).
52. Hathcock, J. J. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1729–1737 (2006).
53. Byrom, M. J., Bannon, P. G., White, G. H. & Ng, M. K. C. Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *J. Vasc. Surg.* **52**, 176–195 (2010).
54. Baeyens, N. *et al.* Vascular remodeling is governed by a VEGFR3-dependent fluid shear stress set point. *Elife* **2015**, 1–35 (2015).
55. Dolan, J. M., Meng, H., Singh, S., Paluch, R. & Kolega, J. High fluid shear stress and spatial shear stress gradients affect endothelial proliferation, survival, and alignment. *Ann. Biomed.*

- Eng.* **39**, 1620–1631 (2011).
56. Gui, L., Muto, A., Chan, S. A., Breuer, C. K. & Niklason, L. E. Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2665–2676 (2009).
 57. Dahl, S. L. M. *et al.* Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).
 58. Prichard, H. L. *et al.* An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 674–682 (2011).
 59. Crapo, P. M., Gilbert, T. W. & Badylak, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233–3243 (2011).
 60. Dahl, S. L. M., Koh, J., Prabhakar, V. & Niklason, L. E. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.* **12**, 659–666 (2003).
 61. Narita, Y. *et al.* Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *J. Artif. Organs* **11**, 91–99 (2008).
 62. Mendoza-Novelo, B. *et al.* Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater.* **7**, 1241–1248 (2011).
 63. Uhl, F. E. *et al.* Functional role of glycosaminoglycans in decellularized lung extracellular matrix. *Acta Biomater.* **102**, 231–246 (2020).
 64. Petersen, T. *et al.* Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation. *Science (80-.)*. **329**, 2008–2011 (2010).
 65. Hwang, J. *et al.* Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater.* **53**, 268–278 (2017).
 66. Zhang, F. *et al.* Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with comparable mechanical properties to native vessels. *Biofabrication* **11**, 1173–1178 (2019).

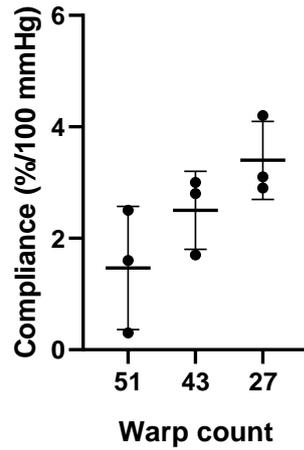
Supplementary material for “Effects of weaving parameters on the properties of completely biological tissue-engineered vascular grafts” by Roudier *et al.*



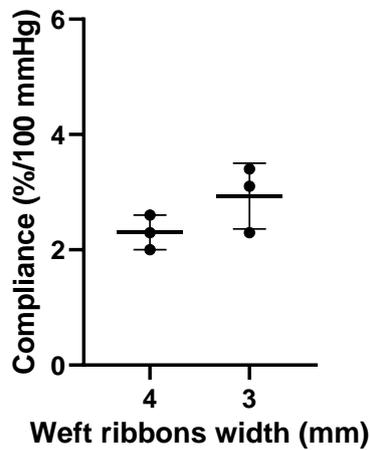
Suppl. Figure 1. Structural properties of TEVGs produced from CAM sheets of different strengths. (a) Wall thickness, (b) internal diameter and (c) wave length and height of TEVGs produced from either stronger or weaker CAM sheets. Results are expressed as mean ± SD, n = 3 (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).



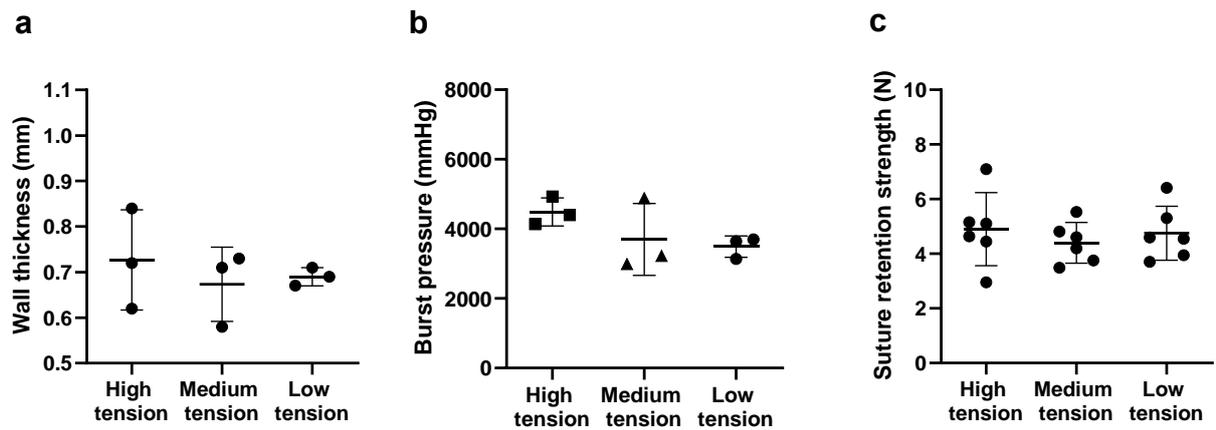
Suppl. Figure 2. Weft density of TEVGs woven with different warp count. Results are expressed as mean ± SD, n = 3 (one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparisons test).



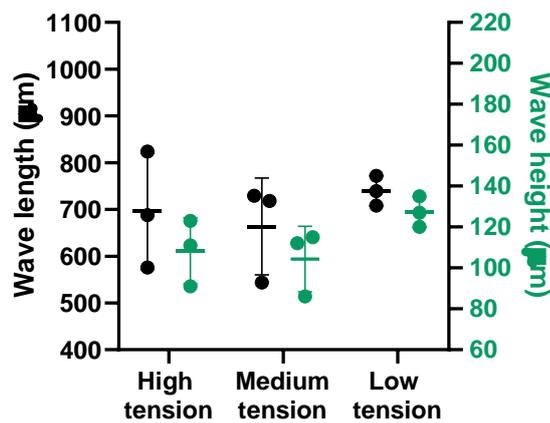
Suppl. Figure 3. Compliance of TEVGs woven with different warp count. The TEVGs were pressurized from 50 to 190 mmHg only once and high-resolution digital images (1.4 μm) were recorded at every pressure change to measure the external diameter. The inside diameter and wall thickness at rest were obtained by analysing μCT images of the TEVGs. Compliance was then calculated with the formula described in the materials & methods section. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).



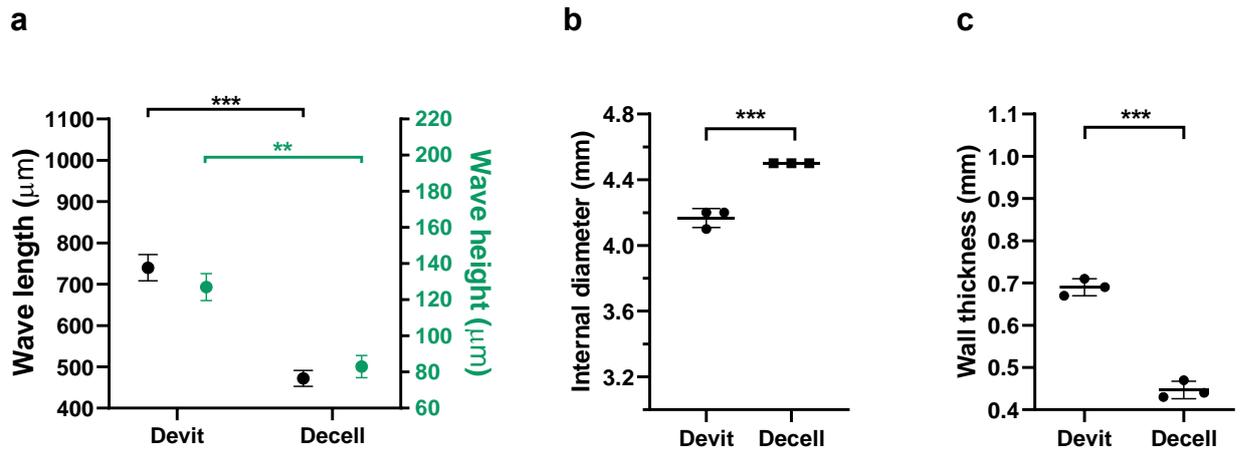
Suppl. Figure 4. Compliance of TEVGs woven with weft thread made from 4-mm-wide and 3-mm-wide ribbons. The TEVGs were pressurized over the 80-120 mmHg range three times and compliance was measured as described in the materials & methods section. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).



Suppl. Figure 5. Structural and mechanical properties of TEVGs woven with different weft tensions. (a) Wall thickness, (b) burst pressure and (c) suture retention strength of the different TEVGs. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).



Suppl. Figure 6. Effect of weft tension on the lumen surface waviness of woven TEVGs. Weft tension had no significant effect on the wave length and wave height of the lumen surface. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test were performed).



Suppl. Figure 7. Structural properties of TEVGs woven from decellularized CAM sheets. (a) Wall thickness, (b) internal diameter and (c) wave length and height of decellularized TEVGs in comparison to devitalized ones. Results are expressed as mean ± SD, n = 3. *, ** and *** denotes p < 0.05, 0.01 and 0.005, respectively (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).

- ARTICLE 2 : PREMIERE UTILISATION D'UN SUBSTITUT VASCULAIRE FAIT DE MATRICE EXTRACELLULAIRE ASSEMBLEE PAR LES CELLULES EN TANT QUE PONTAGE ARTERIOVEINEUX CHEZ LE MOUTON

First use of a vascular graft made of cell-assembled extracellular matrix (CAM) as an arteriovenous shunt in sheep

G. Roudier, M. Gluais, M. Hourques, C. Montfoulet, C. Caradu,

X. Bérard, N. L'Heureux

Biomaterials, article en préparation

First use of a vascular graft made of cell-assembled extracellular matrix (CAM) as an arteriovenous shunt in sheep

Gaëtan Roudier^a, Maude Gluais^a, Marie Hourques^a, Cécile Montfoulet^a, Caroline Caradu^b, Xavier Bérard^{a,b}, Nicolas L'Heureux^{a,*}

^aUniv. Bordeaux, INSERM, Laboratory for the Bioengineering of Tissues – BioTis, UMR 1026, F-33076 Bordeaux, France

^bDepartment of Vascular Surgery, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France

* Corresponding author. BioTis: Laboratory for the Bioengineering of Tissues, UMR1026, University of Bordeaux, Campus Carreire, 2 rue Dr Hoffmann Martinot, Bat BBS, 5ème étage, 33076 Bordeaux Cedex, France

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

E-mail address: nicolas.lheureux@inserm.fr

Key words: Arteriovenous shunt, Tissue engineering, Extracellular matrix, Biological textiles, Ovine model

Abstract

A functional and durable vascular access, such as arteriovenous (AV) grafts, is vital for patients undergoing hemodialysis. Current synthetic AV conduits made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) are prone to thrombosis, intimal hyperplasia and infections. To overcome these limitations, biological Tissue-Engineered Vascular Grafts (TEVGs) were produced by weaving threads made from extracellular matrix produced by ovine fibroblasts in culture. The substitutes (4-cm-long, 6 mm internal diameter) had a burst pressure (3169 ± 546 mmHg) and compliance (4.4 ± 0.5 %/100 mmHg) closer to the ones of native blood vessels than ePTFE prostheses. A bilateral model was used to implant TEVGs and ePTFE grafts as AV shunts between the carotid artery and the jugular vein of sheep. Grafts were harvested after 4- and 8-week post-implantation ($n = 7$ animals). Implantation of TEVGs as AV shunts was uneventful using standard surgical technique. TEVGs patency was 100% at 8 weeks while the luminal neotissue characterized was composed of smooth muscle cells, and mid-graft endothelialization was observed. Inflammatory response decreased between 4 and 8 weeks. In addition, grafts were easily punctured with hemodialysis needles at 4 weeks. In conclusion, we show that a biological, allogeneic, woven TEVG with structural and mechanical properties close to those of native blood vessels can be produced and used as a vascular access conduit in a large animal model.

Introduction

Millions of people worldwide suffer from end-stage renal disease and are waiting to receive a kidney transplant [1–3]. Since the pioneering work of Kolff and Scribner in the mid-20th century, hemodialysis has made it possible to supplement kidney function and cope with limited supply of kidney donors [4–6]. A well-functioning vascular access, i.e., with a sufficiently high flow rate and that can resist 3 punctures weekly, is key for patients undergoing hemodialysis [7–9]. The autogenous arteriovenous fistula (AVF), introduced by Brescia and Cimino in 1966, is created by surgically connecting a vein and an artery, and is considered the gold standard for vascular access [10]. However, as a patient remains on dialysis and AVFs fail (patency rate of 46% at 1 year), the creation of a new AVF is often not possible or successful [11, 12]. A second-line treatment is the implantation of a vascular graft, usually made of synthetic material such as polytetrafluoroethylene (ePTFE) or polyester, to create an arteriovenous shunt (AVS) [8, 13]. However, synthetic AVS lead to considerably more adverse events than autogenous AVF [14, 15]. For example, synthetic AVS are more prone to infections due to repeated punctures, thus resulting in high morbidity [14–17]. Moreover, they cause a chronic inflammation response and a mechanical mismatch with native blood vessels, which may lead to thrombosis, intimal hyperplasia, and loss of patency [16–19]. Indeed, AVS patency rate is significantly lower than that of AVF, and they require more intervention to maintain patency [14, 20–22]. Hence, current synthetic vascular hemodialysis access are associated with substantially higher costs [7, 23]. Therefore, there is a critical need for new options.

Tissue-Engineered Vascular Grafts (TEVGs) have emerged as an alternative to synthetic arteriovenous shunts in pre-clinical studies [24–28]. The biological components of these

engineered substitutes can resist infections much better than synthetic grafts and can be remodeled by the host [24, 28]. In addition, they can be autologous or allogeneic, hence limiting immune response and avoiding graft rejection compared to xenogeneic grafts [25, 29, 30]. Some of these approaches have reached clinical trials and have shown promising results over several years in humans [29, 31–33]. However, these vascular substitutes require prolonged maturation in complex bioreactors, making their production complex and extremely costly.

We have previously produced TEVGs made of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM), a biomaterial synthesized by cultured cells *in vitro* [34–36]. Our group demonstrated the production of large CAM sheets from either human or ovine, normal, adult fibroblasts in commercially available 2D culture flasks [36–38]. Moreover, previous investigations have shown that allogeneic CAM does not elicit clinically significant adverse immune response in humans [29]. Recently, our group produced TEVGs by weaving human and ovine CAM threads, which do not require maturation in a bioreactor [36, 39]. In addition, they have tunable structural and mechanical properties, that can approach the ones of native blood vessels [39]. Therefore, the combination of this cell-friendly material with a textile-inspired assembly method is a promising strategy to produce an effective vascular access for patients undergoing hemodialysis.

The ovine model is widely used to study vascular substitutes as arteriovenous grafts in a large animal [25, 27, 30, 40–42]. One of the justifications is the similarities of its vascular system with the one of humans, particularly in terms of vessel diameters and blood flow, as previously reviewed [43]. Grafts studied in this model are usually implanted for a period ranging between 4 and 12 weeks. Indeed, it has been shown that in this high-pressure and turbulent blood flow

environment, the typical adverse events of this model (e.g., intimal hyperplasia and stenosis at the venous anastomosis and at the venous outflow) appear within this period [25, 27, 40, 41].

The goal of this study was to produce and implant CAM-based woven arteriovenous grafts in sheep for the first time. The main objectives were to study short-term patency, inflammatory response, and remodeling in an allogeneic context for 8 weeks. An additional objective was to demonstrate the puncture resistance of the woven graft. Results of this short-term study will help us identify possible improvements before undertaking longer-term studies.

Materials and methods

TEVG production

CAM sheets were produced as previously described [38]. Briefly, sheep fibroblasts (SSF) were isolated from sheep skin biopsies and were seeded in 225 cm² flasks and in 6-well plates at a density of 10⁴ cells·cm⁻². Cells were cultured for 5 weeks in DMEM/F-12 medium (Gibco®, #31331028) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone™ FetalClone III, #AD19958305) and 0.5 mM sodium L-ascorbate (Sigma, #A4034). Media were changed three times a week. Once produced, CAM sheets were quickly rinsed in sterile distilled water and frozen at -80 °C. When needed, sheets were thawed, rinsed in sterile distilled water, and air-dried under the sterile air flow of a biosafety cabinet at room temperature (about 2 hours). Dried sheets were stored at -80 °C until needed. Prior to use, CAM sheets were rehydrated in sterile water for at least 1 hour and used as a “devitalized”, i.e., non-living, material.

Two sets of threads were produced that are referred to in the textile industry as the warp (longitudinal threads) and the weft (circumferential thread), as previously described [36]. For warp threads production, thawed CAM sheets were placed in a custom-made motorized

cutting device. Evenly distributed circular blades were pressed and rolled on the sheet to cut the CAM to obtain 5-mm-wide by 17-cm-long ribbons. For weft production, CAM sheets were thawed and dried on the back of a thin sacrificial plastic sheet with a spiral pattern of a desired width, printed on the backside. CAM sheets were cut with surgical scissors following the spiral pattern. Using this approach, two 3-mm-wide ribbons of approximately 1.5 meters in length can be produced from a single 225 cm² sheet. Then, the internal part of one spiral was attached with the external part of the second one and the two ribbons were twisted together at a rate 5 revolutions per centimeter of length using a rotating motorized device in order to produce single cohesive thread. Ribbons and threads were then dried under a laminar flow hood, spooled, and stored at -80 °C until needed.

TEVGs of \approx 4 cm in length were woven on a custom-made circular loom over a 6-mm diameter mandrel using 39 warp (longitudinal) ribbons and in a plain weave pattern. To weave TEVG, the weft (circumferential thread) was inserted between a movable and a fixed set of tensioned warp. Then, the movable set of warp was moved to cross over the weft and the latter was run again between the two sets of warp, and so on. To produce angled extremities, the weft was passed between a decreasing number of warp threads for 8 revolutions. To "finish" the ends, one warp was pulled out from under 2 weft revolutions, while the adjacent warp was woven in place. Then, each pair of threads were tied together to obtain clean and easy-to-suture ends. Woven TEVGs were removed from the mandrel, air-dried under a laminar flow hood, sterilized with ethylene oxide and stored at -20 °C until further use.

Mechanical characterization of the grafts

All mechanical tests were performed as described or adapted from ISO standards (ISO 7198:2016) as previously reported [39]. To measure water permeability, TEVGs and ePTFE

grafts (B. Braun, VascuGraft® NEO) were cannulated and pressurized with water at 120 mmHg. The water leaking through the graft material during each of three 1-minute trials was collected and transmural permeability was expressed as mL·min⁻¹·cm². To test compliance, the inside diameter and wall thickness of TEVGs at rest were obtained from μ CT images. Then, TEVGs were cannulated and cannulas were connected to a jig where the distance between the cannulas was fixed at the unpressurized length of the graft. The system was submerged in water and pressurized over the 80–120 mmHg pressure range three times. High resolution digital images (1.4- μ m resolution) were recorded to measure the external diameter. Assuming an incompressible wall, compliance (in %/100 mmHg) was calculated as follows:

$$\% \text{ compliance} / 100 \text{ mmHg} = \frac{R_{ip2} - R_{ip1}}{R_{pi}} \times 10^4$$

Where:

$p_1 = 80 \text{ mmHg}$

$p_2 = 120 \text{ mmHg}$

$R_{ipx} = \text{internal radius at pressure } x$

Suture retention strength was measured with a loop of 6/0 polypropylene suture (SMI) traversing the wall 2 mm from one extremity of the TEVG and pulled at a steady rate of 150 mm/min with a uniaxial tensile testing device until failure (100-N load cell, Shimadzu Autograph AGS-X series). The maximum force applied was recorded digitally by the software TrapeziumX (Shimadzu). Both extremities of each TEVG were tested. Finally, burst pressure was measured by placing a thin latex balloon inside the TEVG to avoid leakage at high pressure. TEVGs were cannulated and slowly pressurized with nitrogen until failure. A digital pressure

gauge (LEO5, Keller) with its data acquisition system (Kolibri Desktop, Keller) and pressure was recorded at a sampling rate of 10 Hz. All ruptures occurred away from the connection to the cannulas. The pressure needed to dilate the balloon to a diameter larger than that of the TEVG (100 mmHg) was negligible compared to the burst pressure and was not subtracted.

In vivo study design

All sheep experiments were approved by the ethics committee for animal experimentation of the University of Bordeaux and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS #36737-2022041912285878 v2). Seven female sheep (age > 12 months, body weight 45 ± 5 kg) were included in the study to date, and divided into two groups implanted for 4 weeks and 8 weeks ($n = 3$ for the 4-week group, $n = 4$ for the 8-week group). One more sheep will be implanted in the near future for 4 weeks to complete the study. Animals were implanted using a bilateral arteriovenous shunt model [27]. The advantage of this model is the elimination of inter-individual variations, thus allowing to directly compare the TEVG and the control graft. Briefly, TEVG (4-cm-long, 6 mm diameter) was implanted as arteriovenous shunt between the common carotid artery and the ipsilateral external jugular vein. An ePTFE graft (B. Braun, VascuGraft® NEO) with the same dimensions was implanted as contralateral control. Mean length of the seven implanted TEVGs was 4.1 ± 0.2 cm.

At least 72 hours prior implantation, TEVGs were rehydrated in a heparinized saline solution (50 U/mL, 0.9% NaCl). Each animal received enoxaparin starting the day of surgery (6 mg/kg the first day, then 3 mg/kg twice a day) and clopidogrel (375 mg, 2 times/day) beginning 4 days prior to grafting and continuing until animal was sacrificed. On the day of surgery, the animal was sedated with ketamine (10-20 mg/kg), acepromazine (0.1 mg/kg) and buprenorphine (10 µg/kg). Anesthesia was initiated by a bolus of propofol (1 mg/kg) and

maintained with isoflurane (2% in 100% oxygen). The common carotid artery and the external jugular vein of the left side of the neck were exposed and heparin was administered (1 mg/kg) five minutes before implantation of the ePTFE graft. The graft was anastomosed with a standard running stitch using vascular needles and 6-0 Prolene (Ethicon). Afterwards, the TEVG was implanted the same way on the contralateral side of the neck of the sheep. Antibiotics (cefalexine, 10 mg/kg) were given the day of surgery, while buprenorphine and flunixin (2 mg/kg) were maintained for 2 and 5 days postoperatively, respectively.

Two animals developed wound infection on the ePTFE side. In the first sheep, the infection led to a serious skin suture dehiscence on the ePTFE side. To treat the infection, antibiotics (amoxicillin) were given from day 10 until the end. Simultaneously, a hematoma on the TEVG side caused bleeding of the wound. Anticoagulant treatment was withheld from day 3 to day 14 to resolve the issue. Then, the anticoagulation treatment was restarted at half the protocol dose until sacrifice at 4 weeks. Flunixin was maintained during the entire implantation period to treat pain. The explanted TEVG was patent, with more intimal hyperplasia than other explanted TEVGs, while the ePTFE graft was thrombosed. In the second sheep, a milder suture dehiscence post-surgery was observed and the wound infection was quickly resolved after 3 days of antibiotics (cefalexine).

Graft puncture

TEVGs and ePTFE grafts implanted for 8 weeks were punctured 4 weeks after implantation on anesthetized sheep ($n = 4$). A 16G needle (1.7 mm external diameter) was used to puncture the middle of the grafts under ultrasound guidance (CX50, Philipps). A few milliliters of blood were allowed to leak to confirm needle entry into the lumen. Time to achieve hemostasis by digital pressure was recorded.

Ultrasound and angiography evaluation

Patency of the grafts and anastomotic stenosis were monitored every two weeks until sacrifice by echo-Doppler with an ultrasound machine (CX50, Philips). Evaluations were performed on anesthetized animals. Graft inner diameters and blood flow velocities were recorded. Average blood flow rate Q (L.min⁻¹) was determined as earlier reported [40]:

$$Q = v \times 100 \times \pi \times \frac{D^2}{4} \times \frac{60}{1000}$$

Where:

v = average blood flow velocity (m.s⁻¹)

D = Graft inner diameter (cm)

Angiography (Artis Zee, Siemens) was performed before euthanasia. Animals were sacrificed with an intravenous injection of pentobarbital sodium (EUTHASOL VET®, Dechra, 80 mg/kg). Grafts were then removed for histological analysis.

Histology

Explanted grafts were fixed in a 4% of paraformaldehyde-based solution (Antigenfix, Microm Microtech) for 72 hours, then rinsed, dehydrated in an automated processor, and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μm) were deparaffinized in toluene followed by a descending series of ethanol baths. Next, they were stained with Hematoxylin-Erythrosine (H&E) and Alizarin Red (AR) using standard protocols, as well as with a modified Verhoeff Elastic-Masson Trichrome (VM). Images were acquired using a NanoZoomer S60 digital slide scanner (C13210-01, Hamamatsu). To assess stenosis, three histological sections (H&E) of the venous anastomosis of each 8-week sample were used. Stenosis was expressed as the percentage of the luminal area at 8 weeks over the initial luminal area.

Immunohistochemistry was performed on deparaffinized and rehydrated sections as previously described. Representative sections were antigen retrieved in a PT Link (PT200, Dako) with either citrate (pH 6) or EDTA (pH 9) for 20 minutes at 95 °C, and washed with 1X PBS. Next, samples were permeabilized for 15 minutes with 0.1% Triton-X100 and blocked for non-specific antibody binding using a mix of 5% normal goat serum (S26-100ML, Sigma-Aldrich) and 3% bovine serum albumin (422361V, VWR) for 30 minutes at room temperature (RT). Then, primary antibodies were applied for 2 hours at RT. To examine immune response, sections were incubated with antibodies raised against CD45 for leucocytes, CD64 for macrophages, CD3 for T lymphocytes and CD20 for B lymphocytes. To study tissue remodeling and vascular phenotype, sections were stained with the following antibodies: alpha-smooth muscle actin (α -SMA), calponin, desmin and VE-cadherin. Information of primary antibodies are summarized in Suppl. Table 1. Then, secondary antibodies, which are summarized in Suppl. Table 2, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, 1:1000) were applied for 1 h at RT. Images were acquired using a confocal microscope (TCS SPE, Leica microsystems).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism, Version 8 (GraphPad Software Inc.). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The normality of the data distribution was checked with a Shapiro-Wilk test. Differences between groups were determined using unpaired t-tests (two tailed) or one-way ANOVA tests with Tukey's multiple comparison test, as specified in the result section. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Production and mechanical characterization of the TEVGs

Our group previously showed the production of an optimized small-diameter (4.2 mm), CAM-based, woven TEVG with structural and mechanical properties close to the ones of the native blood vessels [39]. Synthetic grafts used in clinics as arteriovenous shunt have an internal diameter of at least 6 mm. To produce an arteriovenous graft with a relevant inner diameter, we used a mandrel diameter of 6 mm (**Figure 1A, B**). To keep the optimized properties of the TEVG, the number of warp ribbons was calculated to achieve the same warp and weft densities (Figure 1C and Suppl. Figure 1).

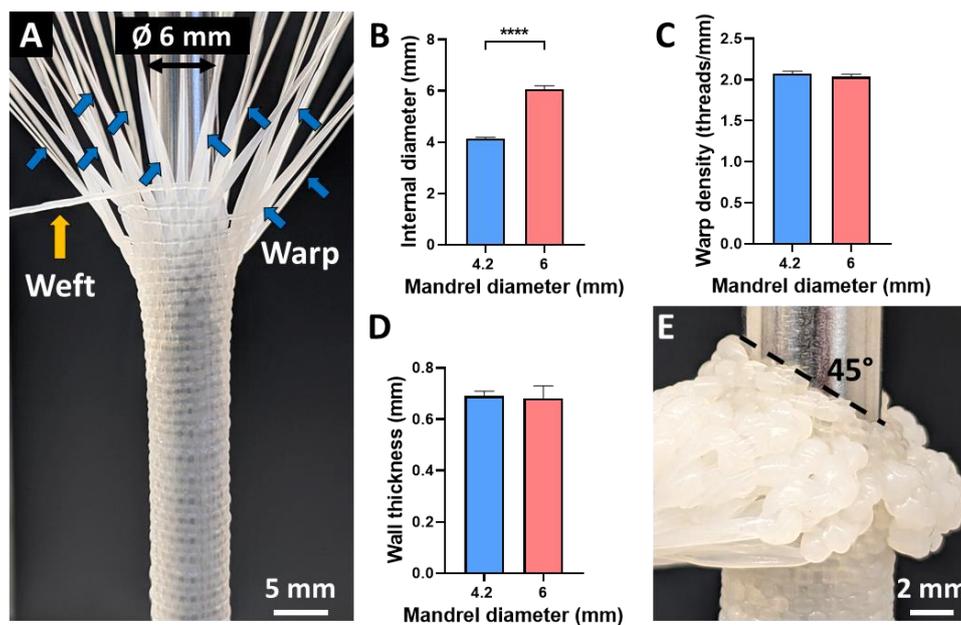


Figure 1. Production of a 6-mm diameter TEVG with beveled endings. **(A)** Macroscopic view of a TEVG made from warp and weft threads of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) and woven on a 6-mm diameter mandrel to produce 6-mm internal diameter substitutes. **(B-D)** TEVG diameter was increased to 6 mm and warp density was kept constant, which resulted in a conserved wall thickness. **(E)** Close view of a 45° beveled ending produced at the extremities of the TEVGs to allow an implantation as an arteriovenous shunt. The data of the 4.2-mm mandrel group were published in [39]. Results are expressed as mean \pm SD (4.2-mm mandrel group: $n = 3$; 6-mm mandrel group: $n = 5$). **** denotes $p < 0.0001$ (unpaired t test and Shapiro-Wilk test).

As anticipated, wall thickness was also preserved between small and larger diameter TEVGs (0.69 ± 0.02 mm and 0.68 ± 0.05 mm, respectively), which is close to the one of the human coronary artery which is 0.75 ± 0.17 mm (Figure 1D) [44]. Next, beveled endings were needed in order to implant the TEVG as an arteriovenous conduit in this ovine carotid-jugular model. By adapting our method to secure the edge of the weave, we successfully produced clear and easy-to-suture ends with a 45° angle (Figure 1E).

The walls of TEVGs displayed a very dense and homogeneous plain weave pattern (**Figure 2A**). As we hoped, the scaled-up version of the TEVG had a burst pressure, compliance, suture retention strength and transmural permeability that was not significantly different than the smaller (Figure 2B-E). The burst pressure of TEVGs was 3169 ± 546 mmHg, which was significantly lower than the one of ePTFE grafts (10456 ± 329 mmHg), and was closer to the burst pressure of 2480 ± 460 mmHg of the human saphenous vein (Figure 2B) [45]. After burst, TEVGs were split lengthwise while ePTFE grafts were completely blown apart (Suppl. Figure 2). As expected, TEVGs compliance (4.4 ± 0.5 %/100 mmHg) was significantly higher than the ones of the synthetic grafts and the saphenous vein (1.2 ± 0.1 %/100 mmHg and 1.5 ± 0.4 %/100 mmHg, respectively), as shown in Figure 2C [46]. Suture retention strength of woven TEVGs (5.0 ± 1.3 N) exceeded the one of the human saphenous vein (1.8 N), therefore allowing easy suturing (Figure 2D). Not surprisingly, TEVGs had a much higher transmural permeability in comparison to impermeable ePTFE grafts (Figure 2E). However, the value (13 ± 15 mL·min⁻¹·cm⁻²) remained far below 50 mL·min⁻¹·cm⁻², which is the threshold often recommended for clinical applicability [47].

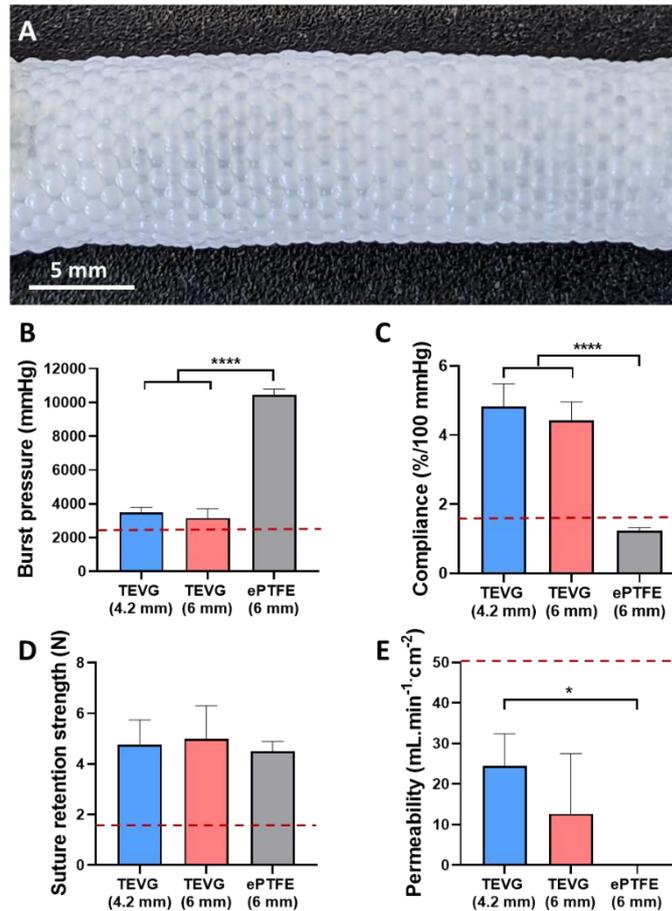


Figure 2. Pre-implantation TEVG mechanical properties. **(A)** Macroscopic view of the mesh of a 6-mm diameter woven TEVG. **(B)** Burst pressure (ePTFE group: $n = 3$), **(C)** compliance, **(D)** suture retention strength (4.2-mm TEVG group: $n = 6$; 6-mm TEVG and ePTFE groups: $n = 10$) and **(E)** transmural permeability of different diameters TEVGs and ePTFE grafts. The red dots lines represent the burst pressure (2480 mmHg), the compliance (1.5 %/100 mmHg) and the suture retention strength (1.8 N) of the human saphenous vein [45, 46], and the maximal permeability ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) recommended for implantability [47], respectively. The data of the 4.2-mm mandrel group were published in [39]. Results are expressed as mean \pm SD (4.2-mm TEVG group: $n = 3$; 6-mm TEVG and ePTFE groups: $n = 5$, unless otherwise stated). * denotes $p < 0.05$, **** denotes $p < 0.0001$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test).

Graft implantation

A bilateral model was used to implant TEVGs, and ePTFE grafts as control, as arteriovenous shunts between the common carotid artery and the ipsilateral external jugular vein of sheep (**Figure 3A**). TEVGs were easy to handle and the adapted woven endings allowed the surgeon to suture the graft easily, using standard surgical technique, and without damaging it (Figure 3B, C). A slight local transmural bleeding was observed in some TEVGs but was resolved after the brief use of a warm compress as hemostatic agent. These were likely due to occasional imperfections that are unavoidable in such hand-woven grafts.

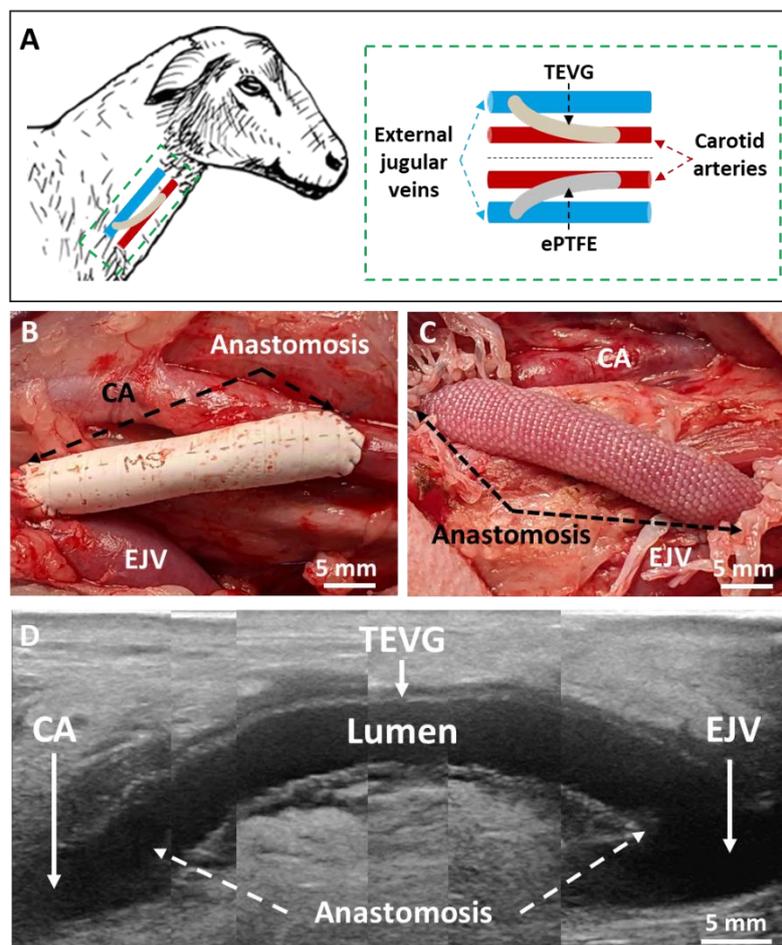


Figure 3. Implantation of 6-mm diameter arteriovenous shunts. (A) Schematic illustration of the bilateral model used to implant a woven TEVG and an ePTFE graft in sheep. Macroscopic view of (B) ePTFE graft and (C) a TEVG right after implantation between the carotid artery (CA) and the external jugular vein (EJV) of a sheep. (D) Ultrasound image of a representative implanted TEVG at 2 weeks (composite made from ultrasound movie of the entire length of the graft).

TEVGs showed both good adaptability to the structure of the native vessels, and resistance to a high-pressure setting (Figure 3D). Ultrasound images showed a well-defined wall with visible weaving pattern. No kinking occurred through the entire length of the TEVG.

Patency assessment with ultrasound and angiography

Grafts underwent ultrasound assessment every two weeks post-implantation until explantation. Doppler ultrasound showed that TEVGs and ePTFE grafts were patent at 4 and 8 weeks with high and turbulent blood flow through the lumen (Figure 4A-D and Suppl. Figure 3). The threads composing TEVG walls were clearly visible on cross-section images (Figure 4A, C). Internal diameters of grafts were measured on cross-section echography images. The diameter of one TEVG implanted for 8 weeks progressively increased over the implantation period while the other implants did not show signs of dilatation, and was therefore excluded from the calculation (Figure 4E). When excluding the dilatating TEVG from the calculations, there was no significant increase in the lumen diameter of the mid-graft region of both TEVGs and ePTFE grafts between 2 and 8 weeks. However, TEVGs had a significantly higher internal diameter than ePTFE grafts at 4 weeks (6.7 ± 1.1 mm and 5.1 ± 0.6 mm), 6 weeks (6.6 ± 0.4 mm and 5.3 ± 0.1 mm) and 8 weeks (7.1 ± 0.6 mm and 5.1 ± 0.7 mm), respectively. As typically observed in this model, some venous stenosis was observed in both types of grafts starting at 2 weeks. It occurred at the anastomosis between the graft and the vein, and/or in the venous outflow tract near the anastomosis (Figure 4F). At 8 weeks, stenosis at the venous anastomosis of TEVGs was higher than in the ePTFE grafts ($48 \pm 20\%$ and $11 \pm 9\%$, respectively). As anticipated, there was an outflow vein accommodation in response to high blood flow, as shown by angiography at 8 weeks (Figure 4G). Indeed, the diameter of native external jugular veins distal to the TEVGs increased by 63% (from 9.3 ± 1.9 mm to 15.2 ± 2.5 mm) between the 2nd and the 8th weeks, respectively, although it was not statistically significant (Suppl. Figure

4A). The diameter of external jugular veins distal to the ePTFE grafts increased significantly, by 73%, between the 2nd and the 8th weeks, respectively. There were no other significant differences between veins diameters of both types of grafts. High flow rates were observed (Suppl. Figure 4B). At 4 weeks, mean blood flow rate was 4.2 ± 2 L/min for TEVGs, and was not significantly different to the 3.3 ± 0.7 L/min in ePTFE grafts (Suppl. Figure 4B).

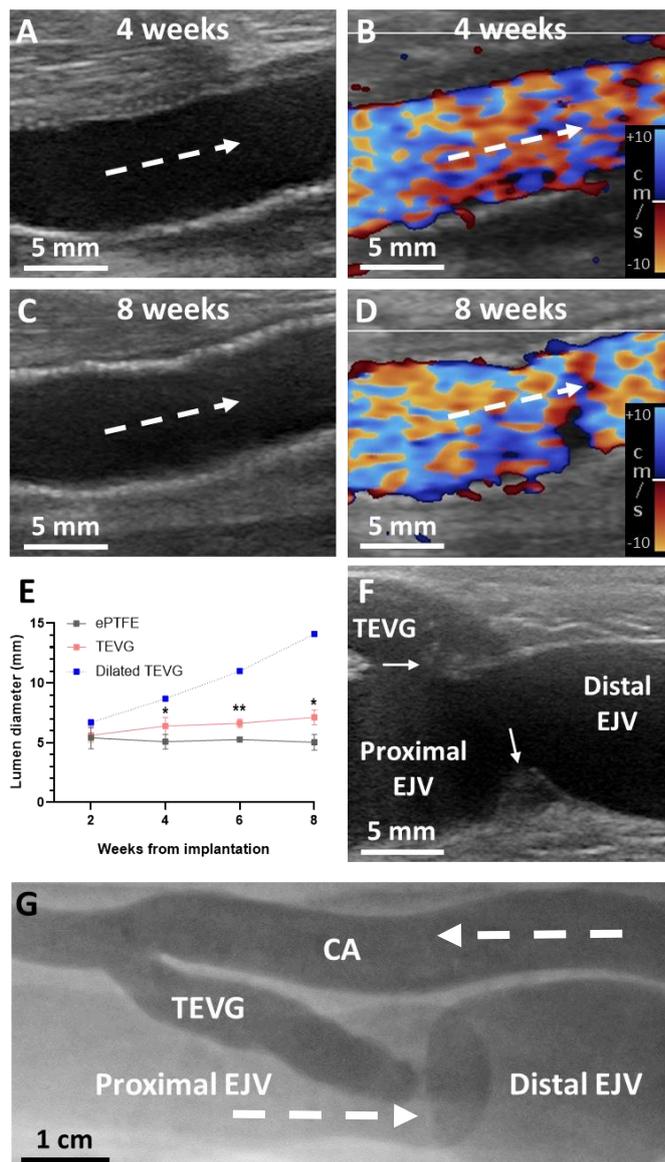


Figure 4. Ultrasound and angiography assessment of implanted TEVGs. (A-D) Ultrasound images, without and with Doppler, of mid-TEVG region at 4 and 8 weeks. The white dotted lines indicate blood flow direction. (E) Internal diameter of ePTFE grafts and TEVGs during implantation. One TEVG undergone dilatation and was represented alone. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 5$ at 2 and 4 weeks, $n = 3$ at 6 and 8 weeks). Asterisks (*) represent significant differences between ePTFE and TEVG groups. * and ** denotes $p < 0.05$ and 0.01 , respectively (unpaired t -test with Holm-Sidak multiple comparison test). (F) Ultrasound image of stenosis observed at 4 weeks at the graft-vein anastomosis and in the venous outflow tract (white arrows indicate stenosis). (G) Angiography image of a TEVG at 8 weeks (CA: carotid artery; EJV: external jugular vein). The white dotted lines indicate blood flow direction.

TEVGs puncture

All TEVGs and ePTFE grafts of the 8-week group were punctured with a hemodialysis needle of clinically relevant size (16G) under ultrasound guidance at 4 weeks (**Figure 5A**). Punctures through the TEVG walls were easier than through ePTFE, which tended to roll away and required more force to puncture (Figure 5B, C). No hematoma or other complications were observed, and hemostasis time was less than 90 seconds of digital compression for both types of grafts.

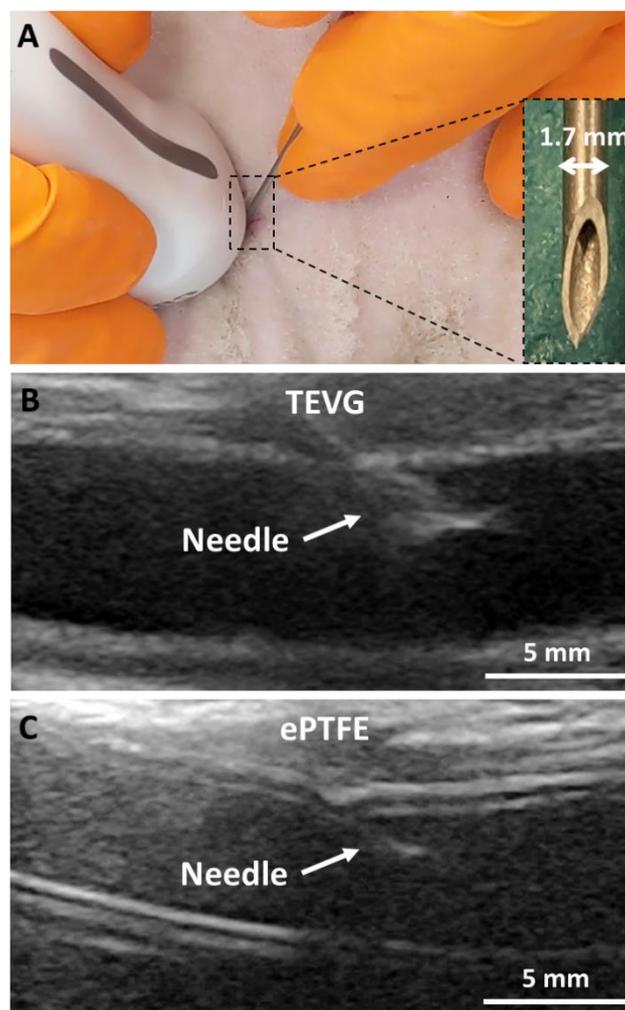


Figure 5. Needle puncture of the arteriovenous grafts at 4 weeks. (A) Macroscopic observation of the ultrasound-guided puncture with a 16G needle (inset) done at 4 weeks ($n = 4$). Five milliliters of blood were drawn to confirm needle penetration into graft lumen. (B, C) Ultrasound images showing the successful puncture of both TEVG and ePTFE graft, respectively. The poor compliance of the ePTFE wall in comparison to the TEVG one can be observed at the needle entry point.

Histology of the TEVGs

To observe cellular response and graft structure, Hematoxylin-Erythrosin (H&E) and a modified Verhoeff Elastic-Masson Trichrome (VM) staining were performed on cross-sections of the mid-graft region of explanted TEVGs, as shown in **Figure 6**.

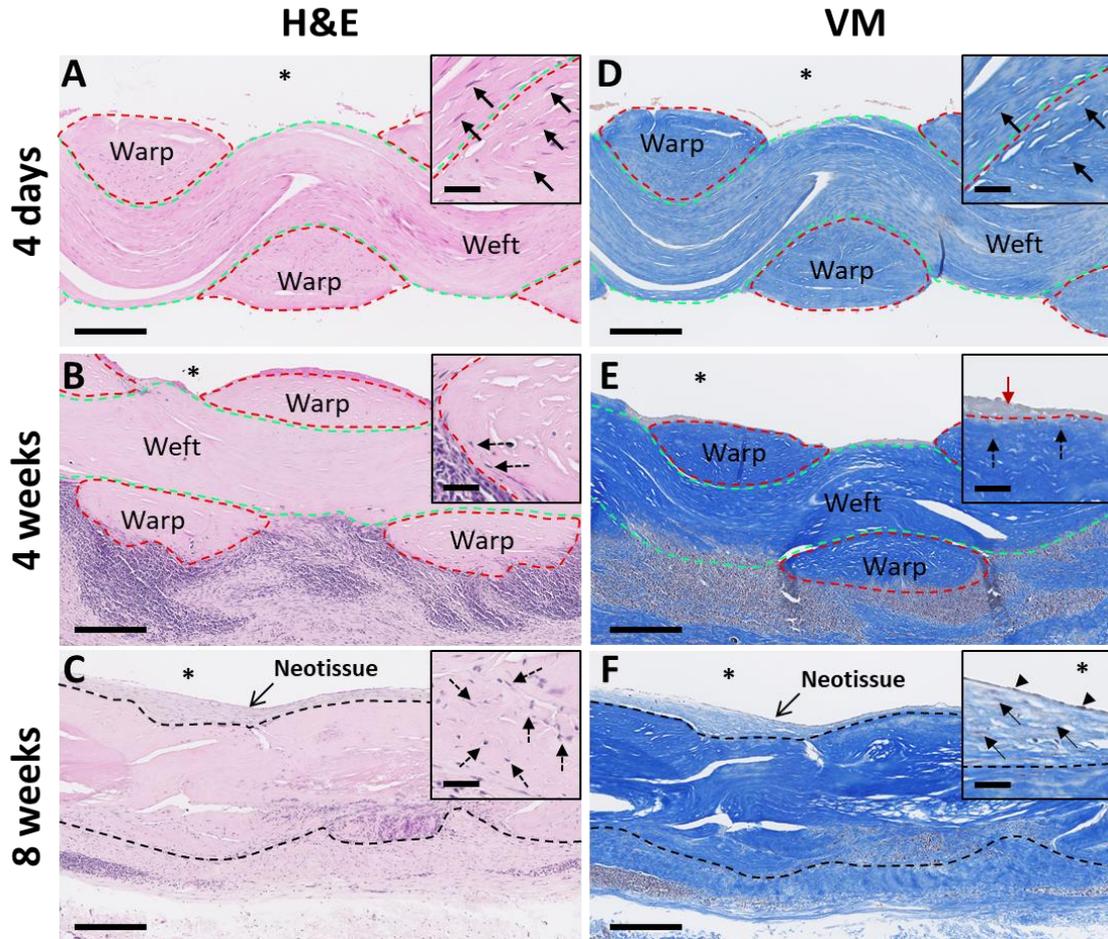


Figure 6. Histology of explanted TEVGs. Representative images of (A-C) Hematoxylin-Erythrosine (H&E) and (D-F) Verhoeff Elastic-Masson Trichrome (VM) staining of mid-graft region of explanted TEVGs at 4 days ($n = 1$), 4 weeks ($n = 2$), and 8 weeks ($n = 4$), respectively. (A) After 4 days, the initial fibroblasts were still visible in CAM threads (thick black arrows). (B, C) There was no more cell remnants after 4 weeks, however few cells penetrated CAM threads, while they were more numerous after 8 weeks (dotted lines black arrows). (D) The fibroblasts are still included in the collagenous matrix of our TEVGs after 4 days (thick black arrows). (E) Fibrin deposition on the luminal surface is shown at 4 weeks (red arrow) while a few cells are beneath (dotted lines black arrows). (F) Cells on the luminal surface (black arrowheads) and elongated cells in the luminal neotissue (thin black arrows) could be observed at 8 weeks. Red dotted lines indicate warp threads, while green dotted lines outline the weft thread. Black dotted lines on the 8-week explant are the supposed limit of the grafts, as the threads were hardly recognizable. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars: large images = 250 μm , insets = 50 μm .

In the 4-week group, grafts of two sheep have been histologically studied ($n = 2$) at this stage of the study. TEVG and ePTFE grafts of another sheep are currently under investigation, while one more TEVG will be implanted very soon in an additional animal. As mentioned in the material and methods section, one animal from the 4-week group underwent a different coagulation treatment due to a bleeding complication. Therefore, the neotissue covering its luminal surface was considered not representative of the 4-week group, and TEVG was excluded from VM analysis. In the 8-week group, TEVGs and ePTFE grafts of four sheep were studied ($n = 4$). TEVGs are difficult to characterize histologically pre-implantation because of their textile nature. Indeed, when the woven CAM is sectioned, it is cut in a multitude of microsections that fall apart and will not stick to histological slides through the staining process when they are not held together by some surrounding tissue. To show the initial structure of our TEVG, we took a patent graft that was explanted after 4 days in a sheep that died of unknown reason. Protein or cell deposition during 4 days provided enough support to allow successful histological sectioning and staining. The weft thread was clearly visible, passing under a warp thread, then over the next one, and so on (Figure 6A). Its partly discontinuous aspect is due to the fact that the weft is a twisted ribbon and that it is cut longitudinally. The fibroblasts that were killed by the devitalization of CAM sheets are widely apparent in both sets of threads. After 4 weeks of implantation, the structure of the woven TEVG was still easily recognizable with well-defined weft and warp threads (Figure 6B). Interestingly, all cell remnants in the CAM disappeared despite the fact that almost no living cells are observed in the CAM. However, host cells massively surrounded TEVG explants suggesting a significant immune response. A few cells started to penetrate the CAM threads from the outside of the TEVG. After 8 weeks, a higher number of cells penetrated the TEVG in comparison to the 4-week explants but many areas remained cell-free (Figure 6C). The woven

structure of the grafts was clearly still present but much more difficult to recognize. Graft remodeling proceed more rapidly from outside of the grafts. The apparent immune response was much less intense at 8 weeks than at 4 weeks with less and smaller foci of immune cells. VM staining at 4 days showed fibroblasts embedded in a collagenous network (Figure 6D). The analysis at 4 weeks showed a thin fibrin deposition nearly along the entire circumference of the lumen, with a few cells observed underneath (Figure 6E). Luminal fibrin deposition was rarer and less homogeneous at 8 weeks than at 4 weeks. Instead, the lumen was covered by a cell-containing tissue of variable thickness (Figure 6F). This tissue filled the wavy spaces between threads, hence creating a smoother luminal surface. VM staining showed no elastic fibers in TEVG explants at both 4 and 8 weeks. Cross-sections of the mid-region of TEVGs explanted at 8 weeks showed inter-individual and intra-graft variations in neotissue deposition (Suppl. Figure 5). Indeed, two TEVGs showed a thick neotissue on the entire circumference of their lumen, while it was less developed in the two others. Interestingly, the 8-week TEVG that dilated was much more remodeled than the other three, with almost a complete loss of weaving pattern recognition and a completely cellularized wall with elongated cells and a few immune cells (Suppl. Figure 6). Its dilatation may be the result of a stronger immune response in this animal compared to other sheep. Histology of ePTFE grafts showed that a few cells penetrated the outer thin layer after 4 and 8 weeks (Suppl. Figure 7). Moreover, giant cells were shown to line the outer surface of the synthetic grafts at both times. Absolutely no degradation of the ePTFE was observed, and luminal surface was not covered by any tissue.

Alizarin Red (AR) was performed to assess calcification of the grafts. Calcification was absent in the TEVG after 4 days (Figure 7A). A few calcification spots were observed in the TEVGs at 4 weeks, while it was much more prominent in the TEVG explants at 8 weeks (Figure 7B and

C, respectively). Calcification was predominantly localized in the weft thread (Figure 7C). Interestingly, in the dilated TEVG that was more remodeled than the others, only few dots of calcification were observed (Suppl. Figure 8). AR staining of ePTFE grafts at 4 and 8 weeks revealed no calcification (Suppl. Figure 9).

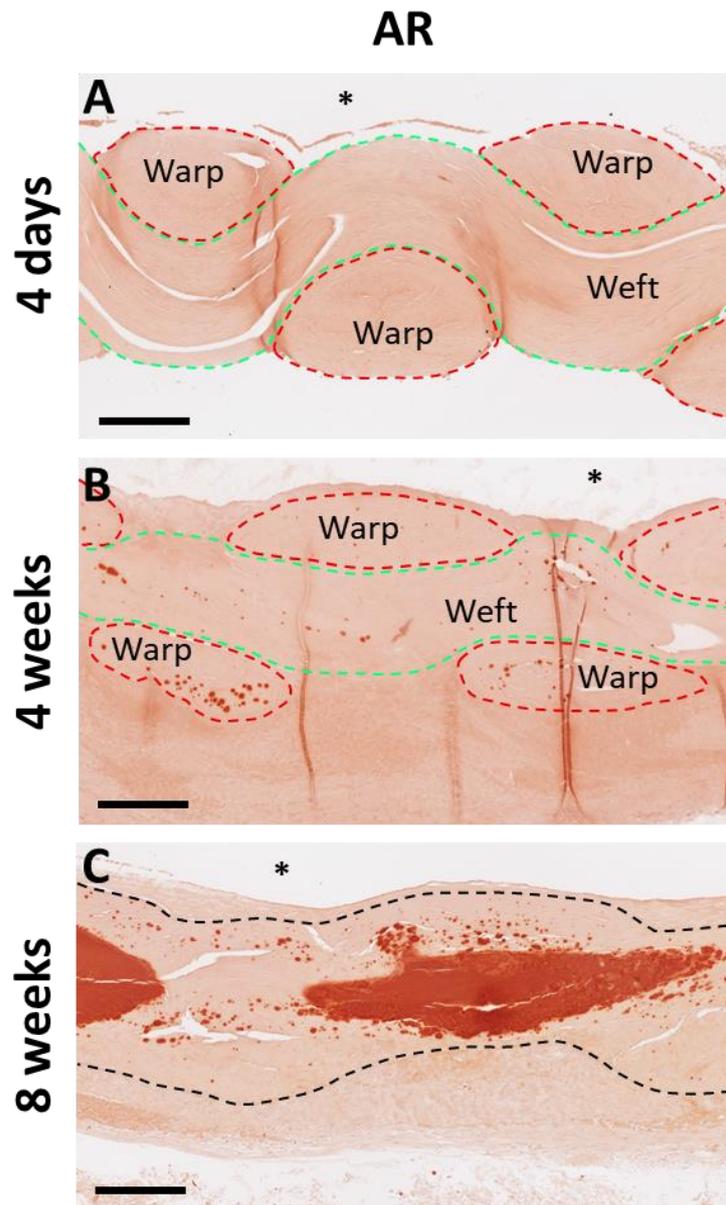


Figure 7. Calcification assessment of explanted TEVGs. Representative images of Alizarin Red (AR) staining of mid-graft region of explanted TEVGs at (A) 4 days ($n = 1$), (B) 4 weeks ($n = 2$) and (C) 8 weeks ($n = 4$), respectively. Red dotted lines indicate warp threads, while green dotted lines outline the weft thread. Black dotted lines on the 8-week explant are the supposed limit of the grafts, as the threads were hardly recognizable. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars = 250 μm .

Immune response and remodeling

We used immunostaining to identify the cells surrounding the TEVG. Leucocytes were identified by staining CD45. The results showed a large concentration of leucocytes in the TEVGs at 4 and 8 weeks, in comparison to ePTFE explants (**Figure 8A, B**).

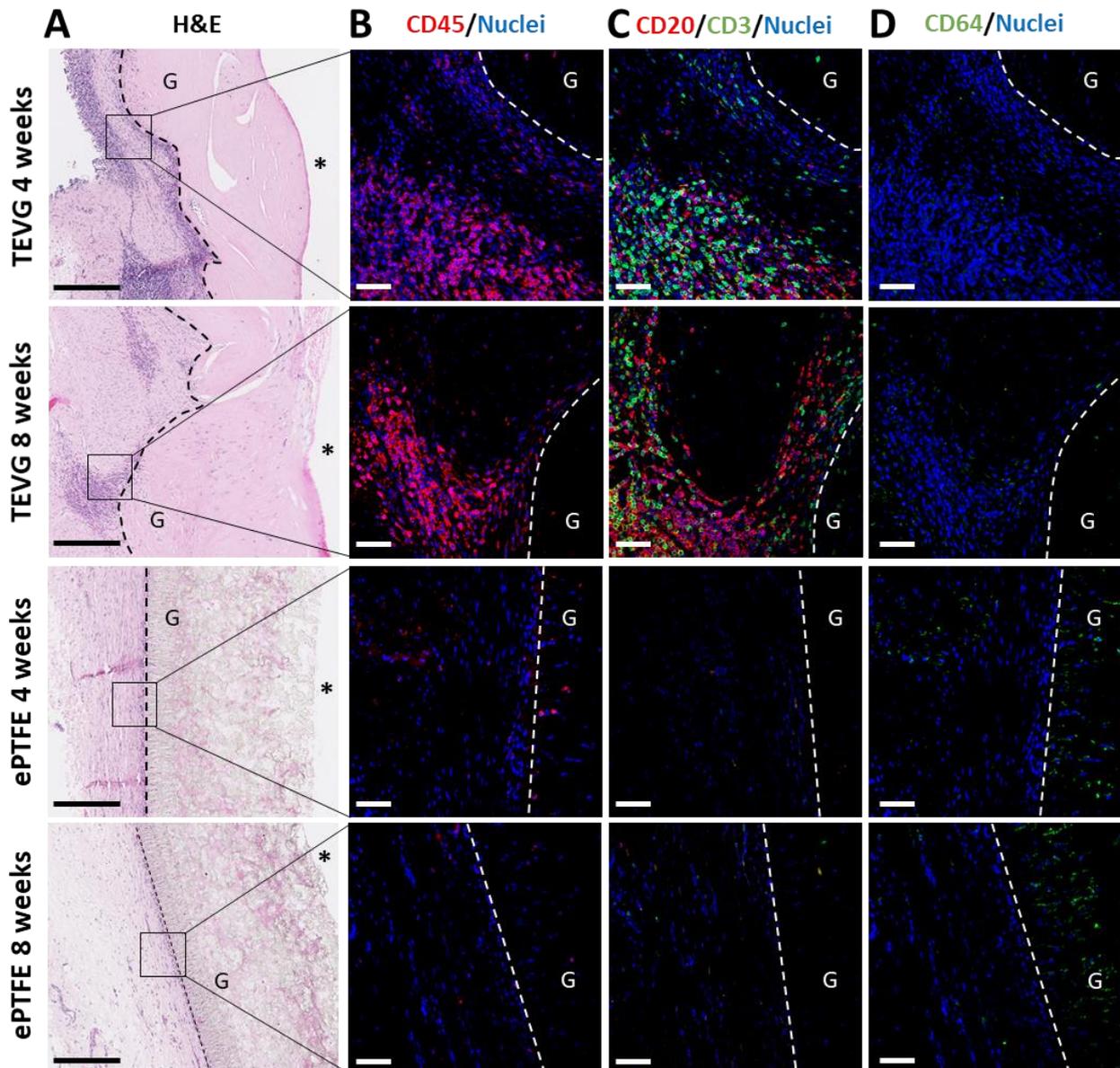


Figure 8. Immune response to explanted grafts at 4 and 8 weeks. (A) Hematoxylin-Erythrosin (H&E) staining images and immunofluorescence images of stained (B) CD45 (red), (C) CD20 (red) and CD3 (green), and (D) CD64 positive cells with nuclei (blue) of the midgraft region of explanted TEVGs and ePTFE grafts after 4 weeks ($n = 2$) and 8 weeks ($n = 4$). Dotted lines represent the supposed limit between the abluminal tissue and the grafts. Graft is indicated by "G". Asterisks (*) indicate the lumen. Black scale bars = 250 μm , white scale bars = 50 μm .

Further characterization of these CD45 positive cells showed that they were a mixture of CD20 or CD3 positive cells, indicating that these are mainly B and T lymphocytes, respectively (Figure 8C). Both cell types were present in large and comparable quantities. These results indicate an adaptive immune response against our grafts. Macrophages were identified with CD64 and the results showed that they infiltrated ePTFE grafts at 4 and 8 weeks, while only a few were shown on the abluminal side of TEVGs at 4 and 8 weeks (Figure 8D). The presence of macrophages around ePTFE grafts suggest a foreign body reaction of the host against these grafts.

To characterize the neotissue in the TEVGs, one TEVG from the 4-week group was studied ($n = 1$), while one is currently under investigations, another one will soon be implanted, and the fourth was excluded from analysis, as previously specified. The luminal neotissue of four TEVGs were characterized in the 8-week group. We started by looking for SMC. We used α -SMA antibody which stains for myofibroblasts and SMC. The staining showed most cells in the neotissue are myofibroblasts or SMC, both at 4 and 8 weeks (**Figure 9A, B**). Staining was more evident for TEVG explants at 8 weeks than at 4 weeks. To further identify SMC, we stained with markers to determine their degree of differentiation. Calponin is a protein exclusively found in SMC and is involved in the regulation of contraction [48, 49]. The results showed that many but not all of the elongated cells were calponin-positive (Figure 9C). Such as for α -SMA, the staining was more evident for the TEVGs explanted at 8 weeks than at 4 weeks. In comparison, the native artery also has most cells α -SMA-positive, but also most cells calponin-positive. We also used desmin as a marker for differentiated SMC. Desmin is associated with a contractile phenotype of the SMC [50, 51]. The staining showed uncommon desmin-positive cells in one TEVG explanted after 8 weeks, while there was no at 4 weeks (Figure 9D). The native carotid artery has most of the subendothelial cells desmin-positive. To further assess

tissue maturity, we looked for endothelialization of the grafts. We used VE-cadherin antibody to stain junctions between endothelial cells. Results showed that the same graft that stained positive for desmin was also VE-cadherin-positive, indicating a homogeneous and dense endothelium in its mid-graft region (Figure 9E). An endothelium was not detected in the mid-graft samples of the other TEVGs. Sections closer to the anastomoses will be stained to further assess grafts endothelialization.

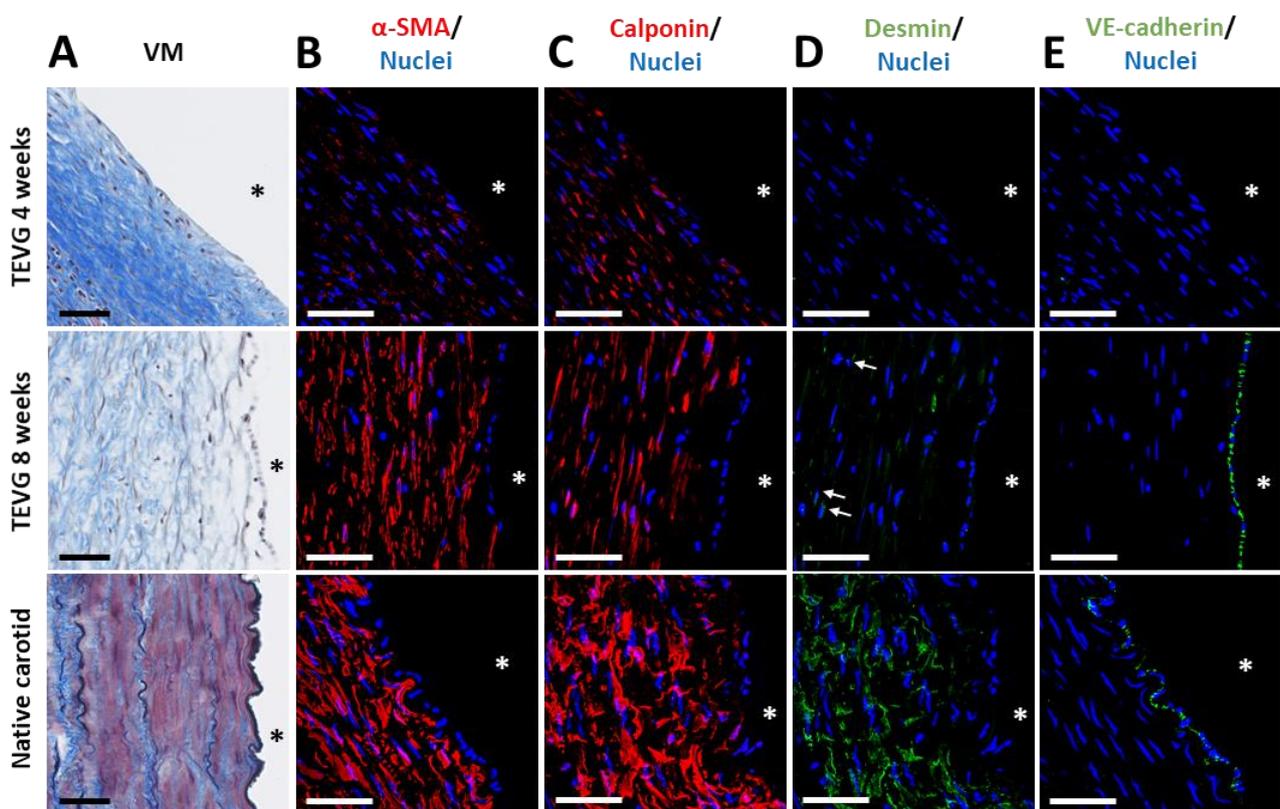


Figure 9. Characterization of the luminal tissue in TEVGs after 4 and 8 weeks compared to ovine carotid. (A) Histology images of Verhoeff Elastic-Masson Trichrome (VM) staining and immunofluorescence images of (B) α -smooth muscle actin (α -SMA) (red), (C) calponin (red), (D) desmin (green), white arrows indicate desmin-positive cells for the TEVG) and (E) VE-cadherin (green) associated with cell nuclei (blue) of the luminal tissue of the mid-graft region of explanted TEVGs at 4 ($n = 1$) and 8 weeks ($n = 4$) compared with the intima of a native carotid artery. Asterisks (*) indicate the lumen. Black and white scale bars = 50 μ m.

Discussion

Vascular access is the lifeline of patients under hemodialysis. Current synthetic arteriovenous grafts (AVG) made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) suffer from various limitations including thrombosis, intimal hyperplasia, and susceptibility to infections [16–18]. In the past, our group introduced the use of TEVGs made from sheets of Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM) [35]. Implantation of these biological grafts as a vascular access showed promising results in humans [29, 31, 52, 53]. However, further development and commercialization was impaired by the high costs associated with the necessity of complex and expensive bioreactors. To reduce costs, our group demonstrated the weaving of completely biological vascular grafts that do not need maturation in bioreactors [39]. In this study, we aimed to address the critical need for functional and durable vascular access by introducing the first use of a TEVG woven from CAM threads as an allogeneic AV shunt in sheep. We demonstrated successful TEVG implantation and 100% of patency at 8 weeks. Inflammatory response decreased between 4 and 8 weeks, and mature SMCs were observed in a luminal neotissue at 8 weeks. Endothelialization could be observed in the mid-graft region of one TEVG. In addition, we demonstrated the feasibility to puncture the grafts with a 16G needle at 4 weeks, without bleeding or loss of mechanical function of the woven TEVGs.

Patency rate of TEVGs at 4 and 8 weeks was 100%, and was superior to that of ePTFE grafts at 8 weeks (86%). TEVG patency reported in this study was superior to the ones reported in other studies using an arteriovenous shunt model in sheep after 4 to 12 weeks, ranging from 60% to 89% [25, 27, 40]. However, one should note that ePTFE grafts patency was also significantly superior to the usually reported values for these grafts after 4 to 12 weeks, ranging from 25% to 83% [25, 41]. This high patency may be the result of the anticoagulant treatment used in

this study. In this study, we used clopidogrel as an antiplatelet agent as part of the coagulation treatment. The daily dosage used was between 1.7 and 5 times the one given in other studies using the same antiplatelet agent [25, 27, 40]. However, it has been shown that the efficiency of clopidogrel on sheep is very variable, hence making the effect of the difference in dosing harder to evaluate [54, 55]. Enoxaparin, which was also used in this study, is an anticoagulation agent whose efficacy was proven on sheep [54]. In our study, enoxaparin was maintained daily until explantation. Only another group used this anticoagulation agent in their study, and only for seven days post-surgery. Therefore, the anticoagulation regiment used in this study certainly could explain the high patency rates observed for both ePTFE grafts and TEVGs. Although patients receive anticoagulation treatment for hemodialysis, it is hard to compare it to treatments given to sheep considering the difference in clotting factors and medication sensitivity [54, 56]. In further studies, anticoagulation should be decreased to levels that increase ePTFE thrombosis to determine if TEVG display a superior performance.

While a textile-inspired assembly has many advantages, the inherent transmural permeability of these constructs is an obvious concern. In this study, we implanted woven TEVGs with a mean *in vitro* water transmural permeability of $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, which remains way below $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, threshold often recommended for clinical use of synthetic grafts without the need for pre-sealing [47]. Only slight local transmural bleeding was observed, but easily controlled, in some grafts during surgery. We attribute these leaks to the presence of imperfection in the hand-woven biological fabric, which should be avoided with a more mature production system, and not an intrinsic property of the weave. The fact that no transmural bleeding was observed in most graft suggest that a higher *in vitro* water permeability value could be acceptable. This mean that using a less dense, and consequently

more flexible, weave should be tested in the future. This also highlights the fact that guidance designed with synthetic grafts in mind may not always be relevant for TEVGs.

Host response to a biological tissue-engineered product is a key criterion for short-term and long-term success. In this study, histological analysis at 4 weeks showed the presence of numerous leucocytes (CD45-positive) around TEVGs. Observations at 8 weeks showed a sharp decrease of cell foci around the grafts, which suggests inflammation resolution in progress. This decrease in the inflammation response is consistent with the results from the group of Tranquillo [57]. They showed that a TEVG produced by ovine dermal fibroblasts *in vitro* and implanted in the femoral artery of sheep caused an intense inflammatory response at 8 weeks, but observed a decrease after 24 weeks. Characterization of these leucocytes showed a high concentration of T and B lymphocytes, and further investigations are needed to determine the cause of this response. Three likely causes can be proposed as a trigger for this immune response: allogeneic fibroblasts, cell remnants, and xenogeneic serum. We have previously shown that devitalized allogeneic TEVGs made from rolled CAM sheets synthesized by human dermal fibroblasts were successfully implanted as AV shunt in humans for up to 11 months [29]. In that study, patients did not produce antibodies against major histocompatibility complex (MHC) class II molecules and lymphocytes cross-reactivity tests were negative demonstrating a lack of recognition of allogeneic cells. This is consistent with the fact that fibroblasts express low levels of CMH class I molecules and no class II molecules under normal conditions [58]. This is also not surprising considering that allogeneic fibroblasts have been implanted as part of commercial products for decades with no adverse events (Apligraf®, Dermagraf®) or used in experimental skin treatments without complications [59, 60].

Cell remnants created by the devitalization process can be seen as a cause for concern because cell death is often associated with inflammatory signaling through molecules such as damage-associated molecular patterns (DAMPs). However, it is important to remember that these molecules are released by cells undergoing necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and even apoptosis [61]. The devitalization process is rapid so the cell remnants should not contain these molecules. Little is known about the potential effect of such fibroblast debris on immune response but one should remember that rapid cell death through drying as well as mechanical or heat/cold damage are common in many surgical procedures. Finally, devitalized TEVGs made from rolled autologous (1) and allogeneic (3) CAM sheets were implanted in humans without clinical signs of inflammation or causing a rise in standard inflammatory blood markers [29, 52]. However, it should be noted that the local inflammatory response caused by the cell remnants could have been too small to be detected by humoral markers. One way to test the role of cell remnants would be to use decellularized CAM. This process, which is widely used to remove the antigenic components of xenogeneic tissues, also removes element of the ECM and can partly denature it [62–64]. While we would prefer to avoid such a process, we have shown our ability to produce decellularized woven CAM without losing its mechanical strength [39]. We have shown that devitalized and decellularized human CAM ribbons were remodeled similarly in the subcutaneous space of nude rats and we are in the process of testing this remodeling in an allogeneic ovine model [37]. This data should help us determine if decellularized TEVGs should be tested.

In a previous study, rolled CAM-based TEVGs were implanted as autologous AV shunts in 10 patients over 3 years [53]. One graft developed an acute aneurysm that resulted in failure 3 days after implantation. This outcome was associated with a strong acute immune response. For complex regulatory reasons, this graft had been grown in a different bovine serum product

than the serum used for the production of the previous grafts, and was shown to contain considerably higher concentrations of immunoglobulin G (IgG). With the use of IgG depleted serum, such negative reactions were not observed again. This strongly suggests that high IgG concentrations were responsible for the acute immune response, although we should not set aside other immune components of the xenogeneic serum. To test this hypothesis, one option will be to make TEVG with CAM sheets produced in IgG depleted serum. In the long term, one solution would be to produce CAM sheets in serum-free medium. However, the very high cost of such media could jeopardize the commercial feasibility of this approach. To date, even after significant optimization efforts, no media formulation has been able to allow the synthesis of CAM with comparable strength (data not shown).

Neotissue formation following TEVG implantation is key for long-term success. Here, there was almost no visible neotissue on the luminal side in the mid-section of TEVGs at 4 weeks, except for the one which experienced the interruption of anticoagulation treatment. This isolated observation may indicate that anticoagulation could have a role beyond maintaining patency and have an impact on the remodeling of this biological graft. At 8 weeks, a luminal neotissue was clearly visible in the mid-section of all grafts but it was more developed in two of them. The timing of neotissue formation in the mid-region of TEVGs suggests that cells migrated from anastomoses to the center of the grafts, which is a recognized process [65]. In this study, we observed that cells from the outside started to migrate through the wall at 4 weeks, while they were inside after 8 weeks. These observations may suggest that the cells that migrated to the lumen also contributed to neotissue formation. Other possible contributors to TEVG remodeling are the circulating cells from the blood [66, 67]. It is interesting to highlight the absence of visible luminal tissue in any of the ePTFE grafts, and therefore the difference between ePTFE grafts and our TEVGs in terms of allowing cell

migration. The lack of endothelialisation of ePTFE grafts is well known and is a cause for long-term thrombosis risks. Our results indicate that our TEVGs have a much better potential for reendothelialization.

At 8 weeks, the neotissue was mainly composed of α -SMA positive cells, with a large part being calponin-positive, hence indicating the presence of mature smooth muscle cells as early as 8 weeks [49, 68]. The group of Kong, who implanted their graft as AV shunt in the neck of sheep, reported calponin-positive cells at 12 weeks [30]. Cells positive for desmin, which is a marker for vascular smooth muscle cells of higher maturity, could be observed occasionally in one graft after 8 weeks [68]. The group of Rotmans, who also implanted their graft as AV shunt between the carotid artery and jugular vein of sheep, reported large population of desmin-positive cells after 8 weeks [25]. The implanted graft is an autologous tissue, hence avoiding adverse immune response. One of the reasons why we do not observe the same amount of desmin in our TEVGs may be that the development of the luminal neotissue is delayed by the adverse immune response that we observed.

The dilatation that occurred in one graft was clearly observed at 4 weeks. In fact, this graft already had a slightly larger diameter than the other grafts at 2 weeks. This dilation was therefore not attributable to the puncture of the graft at 4 weeks. One hypothesis to explain this dilation is that the immune response towards the TEVG in this animal was more severe than in the other sheep. The difficulty to recognize the TEVG on histological sections in comparison to other TEVGs underlines the fact that it was remodeled more aggressively. Indeed, its degradation appears to have been too rapid, and the loss of mechanical strength led to dilatation. The fact that this happened in a single TEVG highlights inter-individual variabilities and the need to expand this study in the future.

The formation of an endothelial lining on the luminal surface of TEVGs is of importance for non-thrombogenicity, as our grafts are made of natural ECM that can provide attachment sites for platelets. The presence of a homogeneous and dense endothelium is shown after 8 weeks in the mid-graft region of one TEVG. The group of Rotmans, with their autologous TEVG implanted as AV shunt in sheep, reported comparable observations at 8 weeks [25]. Riboldi *et al.*, who implanted an hybrid graft made of silk fibroin and polyurethane as an AV shunt in the neck of sheep, did not observe endothelium formation before 12 weeks [40]. The group of Tranquillo, who implanted in sheep a TEVG produced by ovine fibroblasts as previously described, reported mid-graft partial endothelialization at 8 weeks, while it was complete at 24 weeks [57]. Therefore, these results support the hypothesis that TEVG endothelialization is in progress and that it only reached the mid-graft region in one graft, highlighting once more inter-individual variations.

Calcification, which is known to be a failure mechanism that can compromise the long-term performance of a vascular graft, was observed in three out of four TEVG explants at 8 weeks. This was unexpected, as mineralization of vascular substitutes made from CAM has never been reported either in animals or humans [29, 31, 35, 52, 53]. However, calcification is a pathophysiological phenomenon widely reported in cardiovascular applications [41, 69–72]. Calcification mechanisms in vascular implants remain unclear, but it is widely accepted that it is inflammatory-driven [73, 74]. More specifically relevant to this study, calcification has been shown to be induced by an inflammatory response towards cells remnants [75–77]. If this is the case, TEVGs could be actively decellularized, using a protocol we have shown to preserve CAM strength, to remove the cell remnants to avoid calcification [39]. However, decellularization has some associated negative effects such as removing ECM components, partly denaturing ECM, creating a risk of leaving toxic residues, and adding production steps.

Decellularization would also require to re-evaluate the current weaving parameters since we have shown that this process significantly changes the density of the ECM and the transmural permeability of woven CAM-based TEVG [39]. An additional observation that was made is that calcification seemed to occur preferentially in the weft thread. The weft is made of two CAM ribbons twisted together, hence resulting in densely compacted ECM. It has been shown previously that the compaction of the weft thread limits cellular access to debris [37]. Hence, evacuation of fibroblasts debris is prevented, which promotes calcification [75–77]. Therefore, future studies may focus on using a barely twisted ribbon as weft thread to allow cell remnants disposal by the host. Change in weft thread will lead to adaptation of weaving parameters to produce a TEVG with optimized properties [39].

A vascular access is characterized as functional with a blood flow rate of at least 0.3 to 0.6 L/min to allow hemodialysis in a reasonable amount of time, and ability to resist to punctures 3 times a week [5, 9, 78]. In this study, we reported a mean blood flow rate of 4.8 L/min within the TEVGs, at 4 weeks. While this AV model is far from the dimensions and locations used with patients, the blood flow rate achieved would allow hemodialysis of a patient. In addition, TEVGs were successfully punctured at 4 weeks with a hemodialysis-size needle (16G). Puncture of TEVG wall was easier than that of the hard to puncture ePTFE wall. One of our concerns about the warp and weft threads composing our TEVGs was their susceptibility to breakage during puncture. Here, no structural damages were observed by echography or at explantation, and puncture did not lead to dilatation of the grafts which remained implanted for 4 more weeks. We hypothesize that tissue integration during 4 weeks prior to puncture, which is clinically relevant, contributed to the performance of the graft by providing cohesiveness and, whereby, possibly avoiding slippage of the damaged threads. Taken together, these results demonstrate that our woven TEVG may be promising as a

vascular access. However, further evaluation will be needed to evaluate the ability of this TEVG to resist to 3 punctures a week during months, as was done by Tillman *et al.* in a sheep study [42].

Synthetic grafts made of ePTFE are known to be prone to infection, specifically in a context repeated punctures associated with hemodialysis [14, 20]. One of the advantages of biological TEVGs over ePTFE grafts is their higher resistance to infection [79, 80]. In this study, 2 of 8 animals suffered spontaneous infections at the wound site of ePTFE grafts, while no infection was detected on the TEVG side. During implantation, ePTFE grafts were systematically the first implanted, followed by TEVGs. This means that if an infectious agent has been in contact with the ePTFE graft, probability is high that it has been in contact with the TEVG as well. While this is anecdotal data and wound infections are not necessarily graft infections, this may highlight the superior resistance of our biological grafts to infection.

Intimal hyperplasia at the venous anastomosis of arteriovenous shunts is the primary mode of failure of these grafts [81]. The ovine model used in this study is known to cause stenosis in the venous outflow tract and at the anastomosis [41, 42]. Here, we reported venous stenosis rate on the TEVG side that was comparable to the one reported by Riboldi *et al.*, which was approximately 40% at 8 weeks [40]. Interestingly, they reported in the same study a decrease of the venous stenosis from 60% to 25% between 4 and 12 weeks, respectively. This decrease in TEVG-venous stenosis was also reported by Geelhoed *et al.* between 4 and 8 weeks, while they reported an increase for ePTFE-venous stenosis [25]. These results suggest that grafts that promote remodeling may limit venous stenosis in comparison to ePTFE grafts over months.

The approach used in this work to produce TEVGs has several advantages over other vascular tissue engineering approaches, which have produced TEVGs that showed good short-term performances as arteriovenous shunt in sheep [25, 30, 40]. TEVGs woven from CAM threads produced *in vitro* allow the production of reproducible TEVGs from selected cells [24, 28]. In addition, *in vitro* approaches allow a quality control of the grafts produced before implantation. One of the advantages of the textile assembly approach used in this study over other *in vitro* approaches is that the structural and mechanical properties of the grafts can be tuned to match the ones of native blood vessels [39]. Another advantage is that allogeneic TEVGs can be produced without the need for complex and costly bioreactors [24, 28, 39]. *In vivo* strategies, that involve the implantation of a rod so the body can produce an autologous fibrous capsule, are challenging for multiple reasons. First, they require an *in situ* step that increases morbidity risks. Then, the *in vivo* approach depends on the ability of the patient's body to create a fibrous capsule, whose composition and properties may vary considerably between individuals [82]. *In situ* strategies, that rely on the implantation of biodegradable synthetic polymers, are also limited by patient variability. Indeed, in this approach, balance between degradation of the biodegradable polymer and tissue formation is key to avoid graft dilatation or aneurysms [27, 83, 84].

Conclusion

The goal of this study was to produce a CAM-based woven TEVG for an arteriovenous shunt application in an ovine model. We successfully implanted this completely biological, devitalized, allogeneic ovine graft and observed blood flow and patency rate at 8 weeks that were similar to that of ePTFE grafts. This first study demonstrated the mechanical stability, the puncturability and the early remodeling of this TEVG including the formation of a luminal neotissue in mid-TEVG region at 8 weeks, which was composed of mature SMCs covered by, in one instance, a confluent endothelium. In contrast, ePTFE grafts were hard to puncture, supported no luminal tissue formation, were associated with wound infections, and caused a macrophage-driven foreign body reaction. Surprisingly, a significant lymphocyte-driven immune response was observed around the TEVG as well as some calcification in the weft of the weave. Further investigations are needed to understand the causes of these negative reactions in order to improve our production strategy. This study is the first demonstration of the adaptability of our textile approach to produce vascular substitutes for multiple applications and specifically demonstrates the potential of a woven CAM-based AV shunt.

Author disclosure statement

Authors declare that they have no competing financial interests.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the authors.

Acknowledgments

This work was supported by the European Research Council (Advanced Grant #785908).

We thank Clément Bordenave for ultrasound monitoring during animal experiments. We also thank the staff of the Heart rhythm disease Institute (Liryc) for assistance with animal studies.

References

1. Bikbov, B., Purcell, C. A., Levey, A. S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., ... Murray, C. J. L. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *395*, 709–733. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)
2. USRDS. (2019). *US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.09.003>
3. Liyanage, T., Ninomiya, T., Jha, V., Neal, B., Patrice, H. M., Okpechi, I., ... Perkovic, V. (2015). Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review. *The Lancet*, *385*(9981), 1975–1982. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61601-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61601-9)
4. Shaw, C. (1955). THE KOLFF-MERRILL ARTIFICIAL KIDNEY—Clinical Application in Acute Renal Insufficiency. *California Medicine*, *82*(4).
5. Kolff, W. J., & Berk, H. T. J. (1997). The Artificial Kidney: a dialyser with a great area. *Journal of the American Society of Nephrology*, *8*(12).
6. Scribner, B. H. (1990). A Personalized History of Chronic Hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, *16*(6), 511–519. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(12\)81034-1](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(12)81034-1)
7. Leermakers, J. J. P. M., Bode, A. S., Vaidya, A., Van Der Sande, F. M., Evers, S. M. A. A., & Tordoir, J. H. M. (2013). Cost-effectiveness of vascular access for haemodialysis: Arteriovenous fistulas versus arteriovenous grafts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, *45*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2012.10.012>
8. Lok, C. E., Huber, T. S., Lee, T., Shenoy, S., Yevzlin, A. S., Abreo, K., ... Valentini, R. P. (2020). KDOQI clinical practice guideline for vascular access: 2019 update. *American Journal of Kidney Diseases*, *75*(4), S1–S164. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.12.001>
9. Akoh, J. A. (2009). Prosthetic arteriovenous grafts for hemodialysis. *Journal of Vascular Access*, *10*(3), 137–147. <https://doi.org/10.1177/112972980901000301>
10. Brescia, M. J., Cimino, J. E., Appel, K., & Hurwich, B. J. (1966). Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula. *The New England Journal of Medicine*, *275*(20), 1089–1966.
11. Voorzaat, B. M., van der Bogt, K. E. A., Janmaat, C. J., van Schaik, J., Dekker, F. W., & Rotmans, J. I. (2018). Arteriovenous Fistula Maturation Failure in a Large Cohort of Hemodialysis Patients in the Netherlands. *World Journal of Surgery*, *42*(6), 1895–1903. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4382-z>
12. Allon, M. (2019). Vascular access for hemodialysis patients: New data should guide decision making. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(6), 954–961. <https://doi.org/10.2215/CJN.00490119>
13. Stegmayr, B., Willems, C., Groth, T., Martins, A., Neves, N. M., Mottaghy, K., ... Walpoth, B. (2021). Arteriovenous access in hemodialysis: A multidisciplinary perspective for future solutions. *International Journal of Artificial Organs*, *44*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1177/0391398820922231>
14. Keuter, X. H. A., De Smet, A. A. E. A., Kessels, A. G. H., van der Sande, F. M., Welten, R. J. T. J., & Tordoir, J. H. M. (2008). A randomized multicenter study of the outcome of brachial-basilic arteriovenous fistula and prosthetic brachial-antecubital forearm loop as vascular access for

- hemodialysis. *Journal of Vascular Surgery*, 47(2), 395–401.
<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.09.063>
15. Oliver, M. J., McCann, R. L., Indridason, O. S., Butterly, D. W., & Schwab, S. J. (2001). Comparison of transposed brachiobasilic fistulas to upper arm grafts and brachiocephalic fistulas. *Kidney International*, 60(4), 1532–1539. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00956.x>
 16. Bachleda, P., Kalinova, L., Utikal, P., Kolar, M., Hricova, K., & Stosova, T. (2012). Infected prosthetic dialysis arteriovenous grafts: A single dialysis center study. *Surgical Infections*, 13(6), 366–370. <https://doi.org/10.1089/sur.2011.041>
 17. Minga, T. E., Flanagan, K. H., & Allon, M. (2001). Clinical consequences of infected arteriovenous grafts in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 38(5), 975–978. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.28583>
 18. Lee, T. (2013). Novel Paradigms for Dialysis Vascular Access: Downstream Vascular Biology-Is There a Final Common Pathway? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(12), 2194–2201. <https://doi.org/10.2215/CJN.03490413>
 19. Ballyk, P. D., Walsh, C., & Butany, J. (1997). Compliance mismatch may promote graft–artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *Journal of Biomechanics*, 31, 229–237.
 20. Arhuidese, I. J., Purohit, A., Elemuo, C., Parkerson, G. R., Shames, M. L., & Malas, M. B. (2020). Outcomes of autogenous fistulas and prosthetic grafts for hemodialysis access in diabetic and nondiabetic patients. *Journal of Vascular Surgery*, 72(6), 2088–2096. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2020.02.035>
 21. Huber, T. S., Carter, J. W., Carter, R. L., & Seeger, J. M. (2003). Patency of autogenous and polytetrafluoroethylene upper extremity arteriovenous hemodialysis accesses : A systematic review. *Journal of Vascular Surgery*, (November). [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(03)00426-9)
 22. Thwaites, S. E., Holt, S. G., & Yii, M. K. (2021). Inferiority of arteriovenous grafts, in comparison to autogenous fistulas, is underestimated by standard survival measures alone. *ANZ Journal of Surgery*, 91(1–2), 162–167. <https://doi.org/10.1111/ans.16472>
 23. Himmelfarb, J., Vanholder, R., Mehrotra, R., & Tonelli, M. (2020). The current and future landscape of dialysis. *Nature Reviews Nephrology*, 16(10), 573–585. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0315-4>
 24. Syedain, Z. H., Graham, M. L., Dunn, T. B., Brien, T. O., Johnson, S. L., Schumacher, R. J., & Tranquillo, R. T. (2017). A completely biological “ off-the-shelf ” arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Science Translational Medicine*, 9.
 25. Geelhoed, W. J., van der Bogt, K. E. A., Rothuizen, T. C., Damanik, F. F. R., Hamming, J. F., Mota, C. D., ... Rotmans, J. I. (2020). A novel method for engineering autologous non-thrombogenic in situ tissue-engineered blood vessels for arteriovenous grafting. *Biomaterials*, 229. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119577>
 26. Furukoshi, M., Tatsumi, E., & Nakayama, Y. (2020). Application of in-body tissue architecture–induced Biotube vascular grafts for vascular access: Proof of concept in a beagle dog model. *Journal of Vascular Access*, 21(3), 314–321. <https://doi.org/10.1177/1129729819874318>
 27. Ong, C. S., Fukunishi, T., Liu, R. H., Nelson, K., Zhang, H., Wieczorek, E., ... Hibino, N. (2017). Bilateral Arteriovenous Shunts as a Method for Evaluating Tissue-Engineered Vascular Grafts in Large Animal Models. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 23(11), 728–735.

<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0217>

28. Dahl, S. L. M., Kypson, A. P., Lawson, J. H., Blum, J. L., Strader, J. T., Li, Y., ... Niklason, L. E. (2011). Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Science Translational Medicine*, 3(68). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001426>
29. Wystrychowski, W., McAllister, T. N., Zagalski, K., Dusserre, N., Cierpka, L., & L'Heureux, N. (2014). First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *Journal of Vascular Surgery*, 60(5), 1353–1357. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.018>
30. Zhi, D., Cheng, Q., Midgley, A. C., Zhang, Q., Wei, T., Li, Y., ... Kong, D. (2022). Mechanically reinforced biotubes for arterial replacement and arteriovenous grafting inspired by architectural engineering. *Science Advances*, 8(11), 1–18.
31. Wystrychowski, W., Garrido, S. A., Marini, A., Dusserre, N., Todd, M., & L'Heureux, N. (2022). Long-term results of autologous tissue-engineered vascular graft for haemodialysis access. *Journal of Vascular Access*, 1–24. <https://doi.org/10.1177/11297298221095994>
32. Nakayama, Y., Kaneko, Y., Okumura, N., & Terazawa, T. (2020). Initial 3-year results of first human use of an in-body tissue-engineered autologous “Biotube” vascular graft for hemodialysis. *The Journal of Vascular Access*, 21(1), 110–115. <https://doi.org/10.1177/1129729819852550>
33. Jakimowicz, T., Przywara, S., Turek, J., Pilgrim, A., Macech, M., Zapotoczny, N., ... Niklason, L. E. (2022). Five Year Outcomes in Patients with End Stage Renal Disease Who Received a Bioengineered Human Acellular Vessel for Dialysis Access. *EJVES Vascular Forum*, 54, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejvsf.2022.01.003>
34. L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., & Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *The FASEB Journal*, 12(1), 47–56. <https://doi.org/10.1096/fsb2fasebj.12.1.47>
35. L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., ... McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature Medicine*, 12(3), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nm1364>
36. Magnan, L., Labrunie, G., Fénelon, M., Dusserre, N., Foulc, M. P., Lafourcade, M., ... L'Heureux, N. (2020). Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly “bio” material for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 105, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.037>
37. Magnan, L., Kawecki, F., Labrunie, G., Gluais, M., Izotte, J., Marais, S., ... L'Heureux, N. (2021). In vivo remodeling of human cell-assembled extracellular matrix yarns. *Biomaterials*, 273. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120815>
38. Torres, Y., Gluais, M., Silva, N. Da, Rey, S., Grémare, A., Magnan, L., ... L'Heureux, N. (2021). Cell-assembled extracellular matrix (CAM) sheet production : Translation from using human to large animal cells. *Journal of Tissue Engineering*, 12, 1–14. <https://doi.org/10.1177/2041731420978327>
39. Roudier, G., Hourques, M., Da Silva, N., Gluais, M., Binyet, E., Olive, J.-M., & L'Heureux, N. (2023). Effects of weaving parameters on the properties of completely biological tissue-engineered vascular grafts. *Biofabrication*.
40. Riboldi, S. A., Tozzi, M., Bagardi, M., Ravasio, G., Cigalino, G., Crippa, L., ... Acocella, F. (2020). A Novel Hybrid Silk Fibroin/Polyurethane Arteriovenous Graft for Hemodialysis: Proof-of-

- Concept Animal Study in an Ovine Model. *Advanced Healthcare Materials*, 9(20), 1–11. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000794>
41. Kohler, T. R., & Kirkman, T. R. (1999). Dialysis access failure: A sheep model of rapid stenosis. *Journal of Vascular Surgery*, 30(4), 744–751. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(99\)70114-X](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(99)70114-X)
 42. Tillman, B. W., Yazdani, S. K., Neff, L. P., Corriere, M. A., Christ, G. J., Soker, S., ... Yoo, J. J. (2012). Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. *Journal of Vascular Surgery*, 56(3), 783–793. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.02.030>
 43. Byrom, M. J., Bannon, P. G., White, G. H., & Ng, M. K. C. (2010). Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *Journal of Vascular Surgery*, 52(1), 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.10.080>
 44. Fayad, Z. A., Fuster, V., Fallon, J. T., Jayasundera, T., Worthley, S. G., Helft, G., ... Sharma, S. K. (2000). Noninvasive In Vivo Human Coronary Artery Lumen and Wall Imaging Using Black-Blood Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*, 102, 506–510.
 45. Schaner, P. J., Martin, N. D., Tulenko, T. N., Shapiro, I. M., Tarola, N. A., Leichter, R. F., ... Dimuzio, P. J. (2004). Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*, 40(1), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.03.033>
 46. Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2000). Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *British Journal of Surgery*, 87, 1516–1524.
 47. Jonas, R. A., Schoen, F. J., Levy, R. J., & Castaneda, A. R. (1986). Biological Sealants and Knitted Dacron: Porosity and Histological Comparisons of Vascular Graft Materials with and without Collagen and Fibrin Glue Pretreatments. *Annals of Thoracic Surgery*, 41(6), 657–663. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(10\)63083-4](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(10)63083-4)
 48. Frid, M. G., Shekhonin, B. V., Koteliensky, V. E., & Glukhova, M. A. (1992). Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: Late expression of heavy caldesmon and calponin. *Developmental Biology*, 153(2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90104-O](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90104-O)
 49. Samaha, F. F., Ip, H. S., Morrisey, E. E., Seltzer, J., Tang, Z., Solway, J., & Parmacek, M. S. (1996). Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene: A contractile smooth muscle cell marker. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 395–403. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.395>
 50. Ko, Y. S., Yeh, H. I., Haw, M., Dupont, E., Kaba, R., Plenz, G., ... Severs, N. J. (1999). Differential expression of connexin43 and desmin defines two subpopulations of medial smooth muscle cells in the human internal mammary artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(7), 1669–1680. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.7.1669>
 51. Osborn, M., Caselitz, J., & Weber, K. (1981). Heterogeneity of Intermediate Filament Expression in Vascular Smooth Muscle: A Gradient in Desmin Positive Cells from the Rat Aortic Arch to the Level of the Arteria Iliaca Communis. *Differentiation*, 20(1–3), 196–202. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1981.tb01176.x>
 52. Wystrychowski, W., Cierpka, L., Zagalski, K., Garrido, S., Dusserre, N., Radochonski, S., ... L'Heureux, N. (2011). Case study: First implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *Journal of Vascular Access*, 12(1), 67–70.

<https://doi.org/10.5301/JVA.2011.6360>

53. McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., ... L'Heureux, N. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet*, *373*(9673), 1440–1446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60248-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60248-8)
54. Weigand, A., Boos, A. M., Ringwald, J., Mieth, M., Kneser, U., Arkudas, A., ... Beier, J. P. (2013). New aspects on efficient anticoagulation and antiplatelet strategies in sheep. *BMC Veterinary Research*, *9*(192). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-192>
55. Connell, J. M., Khalapyan, T., Al-Mondhiry, H. A., Wilson, R. P., Rosenberg, G., & Weiss, W. J. (2007). Anticoagulation of juvenile sheep and goats with heparin, warfarin, and clopidogrel. *ASAIO Journal*, *53*(2), 229–237. <https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31802e192b>
56. Goodman, S. L. (1999). Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*, *45*(3), 240–250. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990605\)45:3<240::AID-JBM12>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990605)45:3<240::AID-JBM12>3.0.CO;2-C)
57. Syedain, Z. H., Meier, L. A., Lahti, M. T., Johnson, S. L., & Tranquillo, R. T. (2014). Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Engineering - Part A*, *20*(11–12), 1726–1734. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0550>
58. Branchet, M. C., Boisnic, S., Blétry, O., Robert, L., Charron, D., & Francès, D. (1992). Expression of HLA class II antigens on skin fibroblasts in scleroderma. *British Journal of Dermatology*, *126*(5), 431–435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb11814.x>
59. Venugopal, S. S., Epi, M. C., Yan, W., Tran, K., Melbourne, W., & Nelson, J. A. (2013). A phase II randomized vehicle-controlled trial of intradermal allogeneic fibroblasts for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of American Dermatology*, *69*(6), 898-908.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.08.014>
60. Moravvej, H. D., Abdollahimajd, F. D., Naseh, M. H., Piravar, Z., Abolhasani, E., Mozafari, N., & Niknejad, H. (2018). Cultured allogeneic fibroblast injection vs. fibroblasts cultured on amniotic membrane scaffold for dystrophic epidermolysis bullosa treatment*. *British Journal of Dermatology*, *179*, 72–79. <https://doi.org/10.1111/bjd.16338>
61. Xu, W., & Huang, Y. (2022). Regulation of Inflammatory Cell Death by Phosphorylation. *Frontiers in immu*, *13*(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.851169>
62. White, L. J., Taylor, A. J., Faulk, D. M., Keane, T. J., Saldin, L. T., Reing, J. E., ... Badylak, S. F. (2017). The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*, *50*, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>
63. Dahl, S. L. M., Koh, J., Prabhakar, V., & Niklason, L. E. (2003). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplantation*, *12*(6), 659–666. <https://doi.org/10.3727/000000003108747136>
64. Lopera Higueta, M., & Griffiths, L. G. (2020). Antigen removal process preserves function of small diameter venous valved conduits, whereas SDS-decellularization results in significant valvular insufficiency. *Acta Biomaterialia*, *107*, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.003>
65. Pennel, T., Zilla, P., & Bezuidenhout, D. (2013). Differentiating transmural from transanastomotic prosthetic graft endothelialization through an isolation loop-graft model. *Journal of Vascular Surgery*, *58*(4), 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.11.093>

66. Smith, R. J., Nasiri, B., Kann, J., Yergeau, D., Bard, J. E., Swartz, D. D., & Andreadis, S. T. (2020). Endothelialization of arterial vascular grafts by circulating monocytes. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15361-2>
67. Nasiri, B., Yi, T., Wu, Y., Smith, R. J., Podder, A. K., Breuer, C. K., & Andreadis, S. T. (2022). Monocyte Recruitment for Vascular Tissue Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, *2200890*, 2200890. <https://doi.org/10.1002/adhm.202200890>
68. Frid, M. G., Moiseeva, E. P., & Stenmark, K. R. (1994). Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circulation Research*, *75*(4), 669–681. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.4.669>
69. Sugiura, T., Tara, S., Nakayama, H., Yi, T., Lee, Y. U., Shoji, T., ... Shinoka, T. (2017). Fast-degrading bioresorbable arterial vascular graft with high cellular infiltration inhibits calcification of the graft. *Journal of Vascular Surgery*, *66*(1), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.05.096>
70. Fioretta, E. S., Lintas, V., Mallone, A., Motta, S. E., von Boehmer, L., Dijkman, P. E., ... Hoerstrup, S. P. (2020). Differential Leaflet Remodeling of Bone Marrow Cell Pre-Seeded Versus Nonseeded Bioresorbable Transcatheter Pulmonary Valve Replacements. *JACC: Basic to Translational Science*, *5*(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.09.008>
71. van der Valk, D. C., Fomina, A., Uiterwijk, M., Hooijmans, C. R., Akiva, A., Kluin, J., ... Smits, A. I. P. M. (2023). Calcification in Pulmonary Heart Valve Tissue Engineering: A Systematic Review and Meta-Analysis of Large-Animal Studies. *JACC: Basic to Translational Science*, *8*(5), 572–591. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.09.009>
72. Valencia Rivero, K. T., Jaramillo Escobar, J., Galvis Forero, S. D., Miranda Saldaña, M. C., López Panqueva, R. del P., Sandoval Reyes, N. F., & Briceño Triana, J. C. (2018). New Regenerative Vascular Grafts for Hemodialysis Access: Evaluation of a Preclinical Animal Model. *Journal of Investigative Surgery*, *31*(3), 192–200. <https://doi.org/10.1080/08941939.2017.1303100>
73. Coté, N., Mahmut, A., Bosse, Y., Couture, C., Pagé, S., Trahan, S., ... Mathieu, P. (2013). Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation*, *36*(3), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9579-6>
74. Aikawa, E., & Libby, P. (2017). A rock and a hard place chiseling away at the multiple mechanisms of aortic stenosis. *Circulation*, *135*(20), 1951–1955. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027776>
75. Messika-Zeitoun, D., Bielak, L. F., Peyser, P. A., Sheedy, P. F., Turner, S. T., Nkomo, V. T., ... Enriquez-Sarano, M. (2007). Aortic valve calcification: Determinants and progression in the population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(3), 642–648. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000255952.47980.c2>
76. Schoen, F. J., Hirsch, D., Bianco, R. W., & Levy, R. J. (1994). Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *108*(5), 880–887. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(94\)70186-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(94)70186-5)
77. Valente, M., Bortolotti, U., & Thiene, G. (1984). Ultrastructural Substrates of Dystrophic Calcification in Porcine Bioprosthetic Valve Failure. *American Journal of Pathology*, *119*(1), 12–21.
78. Monroy-Cuadros, M., Yilmaz, S., Salazar-Bañuelos, A., & Doig, C. (2013). Independent prediction factors for primary patency loss in arteriovenous grafts within six months. *Journal of Vascular Access*, *13*(1), 29–35. <https://doi.org/10.5301/JVA.2011.8425>

79. Wang, J., Blalock, S. K. F., Levitan, G. S., Prichard, H. L., Niklason, L. E., & Kirkton, R. D. (2023). Biological mechanisms of infection resistance in tissue engineered blood vessels compared to synthetic expanded polytetrafluoroethylene grafts. *JVS-Vascular Science*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.jvssci.2023.100120>
80. Shell, D. H., Croce, M. A., Cagiannos, C., Jernigan, T. W., Edwards, N., Fabian, T. C., ... Barbul, A. (2005). Comparison of small-intestinal submucosa and expanded polytetrafluoroethylene as a vascular conduit in the presence of gram-positive contamination. *Annals of Surgery*, 241(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000165186.79097.6c>
81. Roy-Chaudhury, P., Kelly, B. S., Miller, M. A., Reaves, A., Armstrong, J., Nanayakkara, N., & Heffelfinger, S. C. (2001). Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney International*, 59(6), 2325–2334. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00750.x>
82. Geelhoed, W. J., Moroni, L., & Rotmans, J. I. (2017). Utilizing the Foreign Body Response to Grow Tissue Engineered Blood Vessels in Vivo. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, (10), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9731-7>
83. Matsushita, H., Inoue, T., Abdollahi, S., Yeung, E., Ong, C. S., Lui, C., ... Hibino, N. (2020). Corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent kinking for arteriovenous shunts in an ovine model. *Journal of Vascular Surgery*, 1, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jvssci.2020.03.003>
84. Matsushita, H., Hayashi, H., Nurminsky, K., Dunn, T., He, Y., Pitaktong, I., ... Hibino, N. (2022). Novel reinforcement of corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent aneurysm formation for arteriovenous shunts in an ovine model. *Journal of Vascular Surgery*, 3, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.jvssci.2022.01.002>

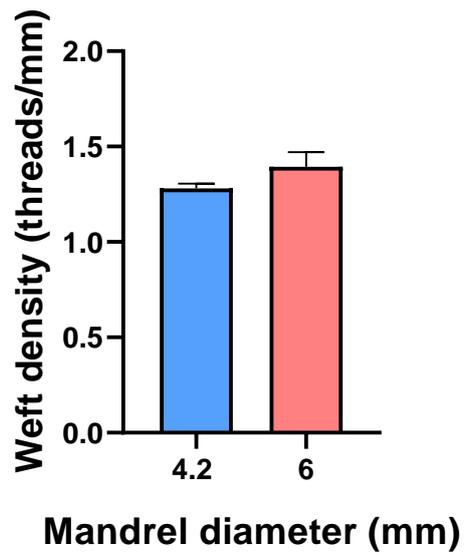
Supplementary material for “First use of a vascular graft made of cell-assembled extracellular matrix (CAM) as an arteriovenous shunt in sheep” by Roudier *et al.*

Supplementary Table 1: Immunohistochemistry primary antibodies

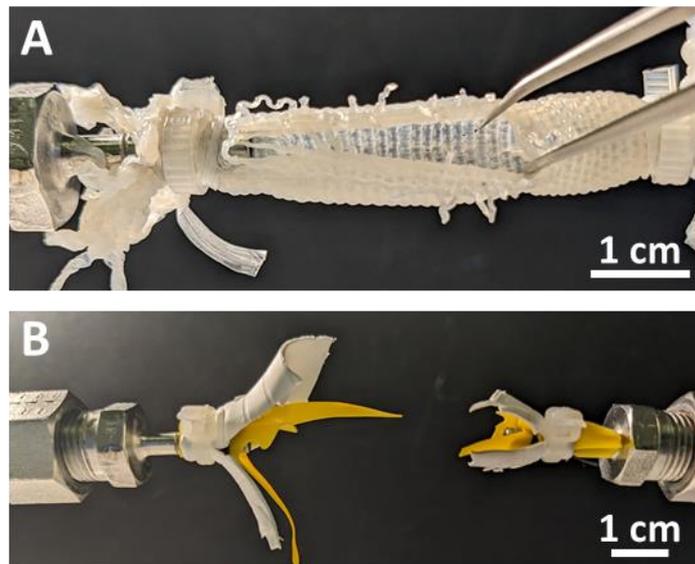
Primary antibody	Manufacturer	Catalog number	Dilution	Antigen retrieval buffer	Host species
CD45	Abcam	ab10558	1:200	EDTA (pH 9)	Rabbit
CD64	Abcam	ab140779	1:50	EDTA (pH 9)	Mouse
CD3	BioRad	MCA1477	1:100	Citrate (pH 6)	Rat
CD20	Invitrogen	PA516701	1:100	Citrate (pH 6)	Rabbit
α -SMA	Abcam	ab7817	1:250	EDTA (pH 9)	Mouse
Desmin	Merck	SAB4200707	1:40	EDTA (pH 9)	Mouse
Calponin	Abcam	ab46794	1:100	EDTA (pH 9)	Rabbit
VE-cadherin	Ozyme	D87F2	1:50	EDTA (pH 9)	Rabbit

Supplementary Table 2: Immunohistochemistry secondary antibodies

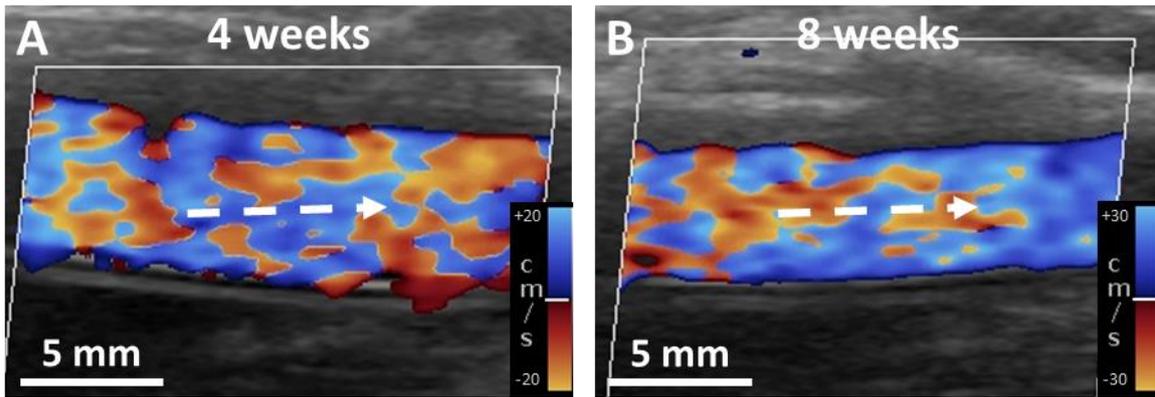
Fluorochrome	Manufacturer	Catalog number	Dilution	Host species	Host reactivity
Alexa 568	Invitrogen	A10042	1:500	Donkey	Rabbit
Alexa 488	Invitrogen	A21202	1:500	Donkey	Mouse
Alexa 488	Invitrogen	A21208	1:500	Donkey	Rat
Alexa 488	Invitrogen	A32790	1:500	Donkey	Rabbit
Alexa 568	Invitrogen	A10037	1:500	Donkey	Mouse



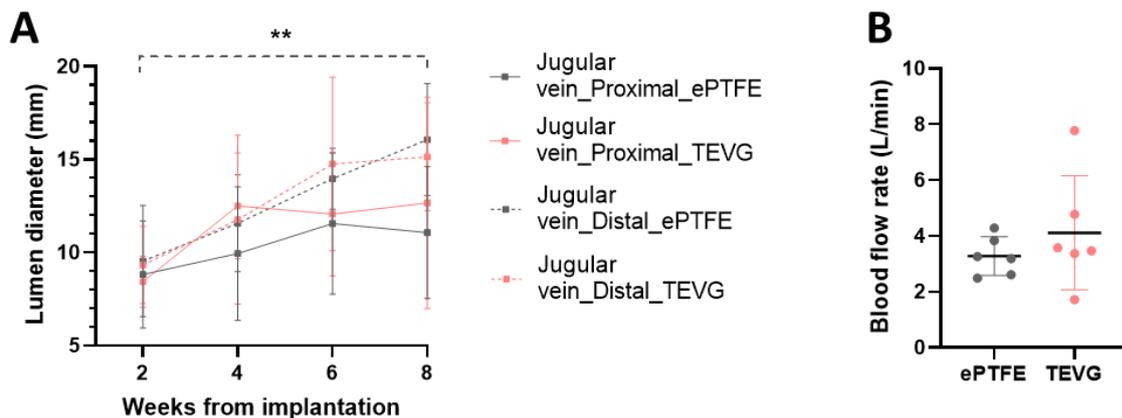
Supplementary Figure 1. Weft density of TEVGs woven over two mandrels of different diameters were not different. Results are expressed as mean \pm SD (4.2-mm mandrel group: $n = 3$; 6-mm mandrel group: $n = 5$. Unpaired t test and Shapiro-Wilk test).



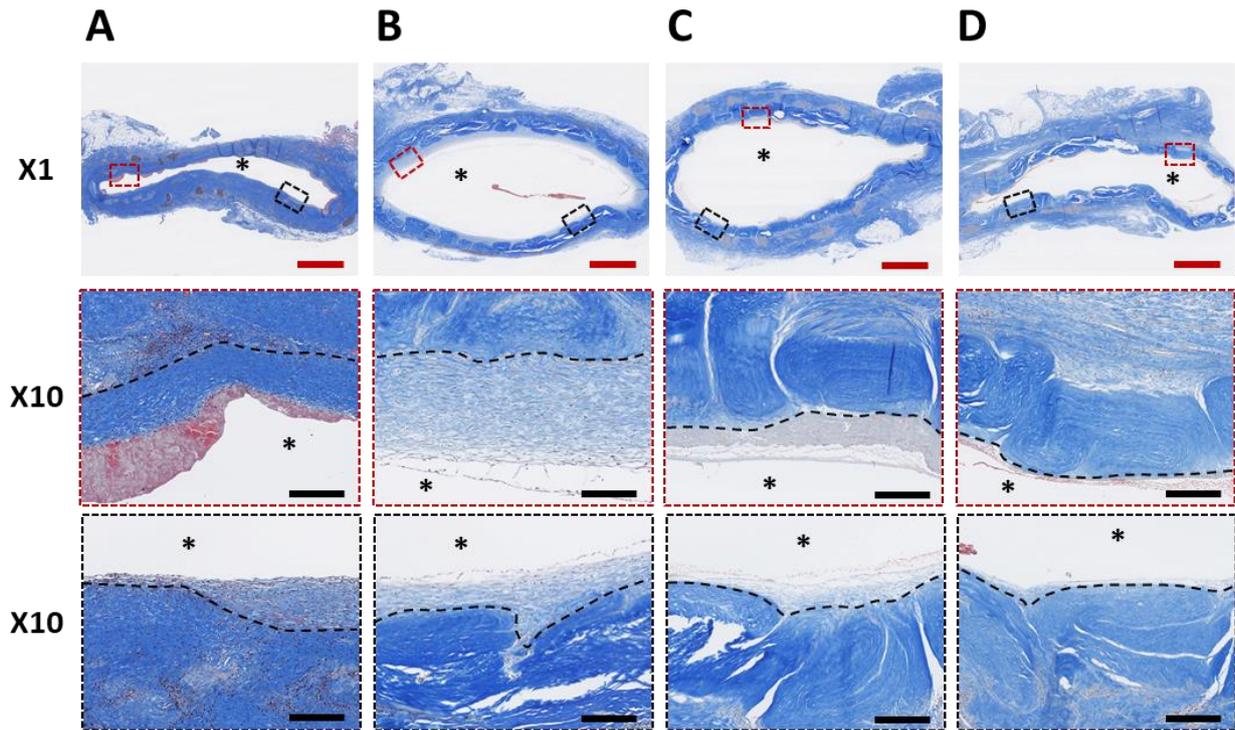
Supplementary Figure 2. Macroscopic view of (A) a TEVG and (B) an ePTFE graft after burst pressure test.



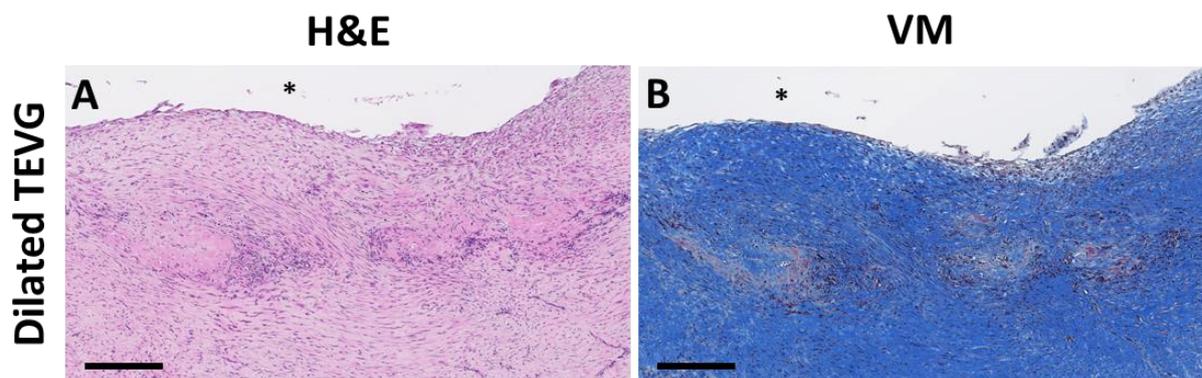
Supplementary Figure 3. Doppler ultrasound and angiography assessment of implanted ePTFE grafts. (A) Doppler ultrasound image of ePTFE mid-graft at 4 weeks and (B) 8 weeks. The white dotted lines indicate blood flow direction.



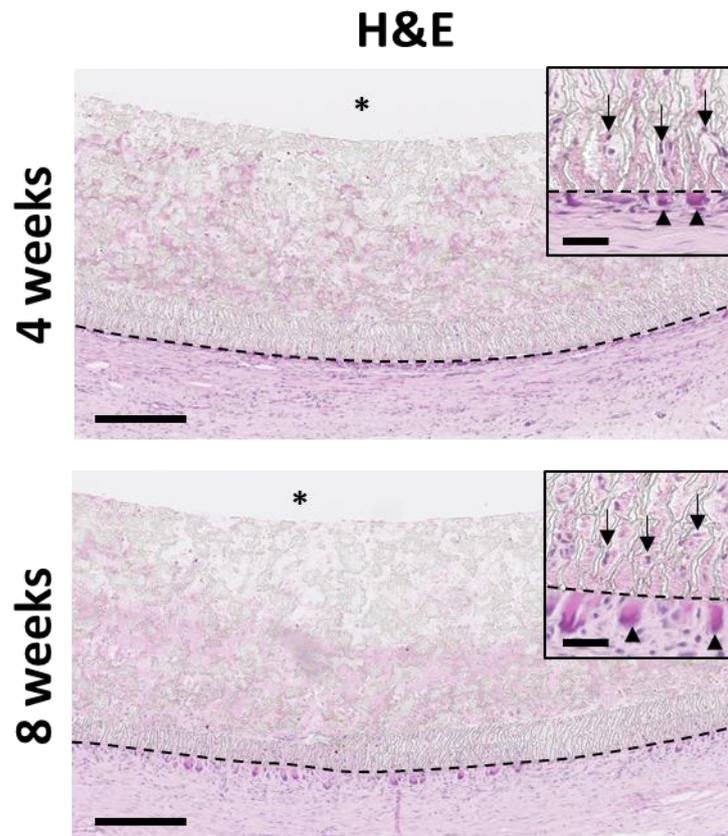
Supplementary Figure 4. (A) Internal diameter of proximal and distal jugular veins on both TEVG and ePTFE sides during implantation. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 7$ at 2 and 4 weeks, $n = 4$ at 6 and 8 weeks). ** denotes $p < 0.01$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). (Unpaired t test and Shapiro-Wilk test). (B) Blood flow rate in ePTFE grafts and TEVGs at 4 weeks. Thrombosed ePTFE graft and dilated TEVG were excluded from analysis. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 6$. Unpaired t test and Shapiro-Wilk test).



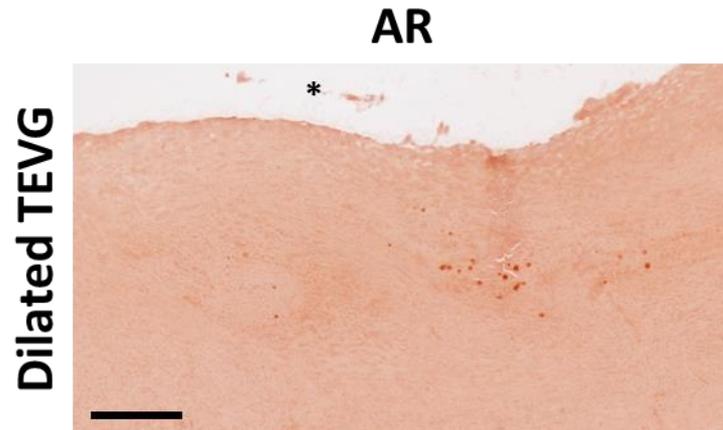
Supplementary Figure 5. Verhoeff Elastic-Masson Trichrome staining images of transversal cross-sections from the mid-graft region of the four (A-D) TEVGs explanted at 8 weeks, showing inter-individual variabilities, and differences within a same graft. Black dotted lines indicate the limit between the luminal tissue and the TEVGs. Asterisks (*) indicate the lumen. Red scale bars = 2 mm, black scale bars = 200 μ m.



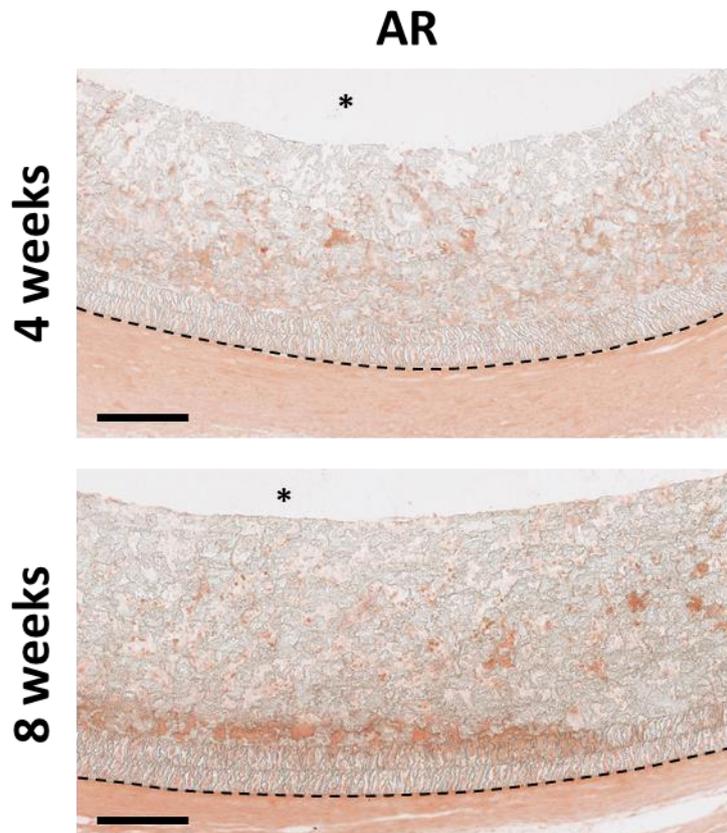
Supplementary Figure 6. Histology of the dilated explanted TEVG. (A) Hematoxylin-Erythrosine (H&E), and (B) Verhoeff Elastic-Masson Trichrome (VM) staining of mid-graft region of the TEVG that was dilated at 8 weeks. CAM threads are hardly visible and the wall is completely cellularized. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars = 250 μ m.



Supplementary Figure 7. Hematoxylin-Erythrosine (H&E) staining of mid-region of ePTFE grafts at 4 weeks and 8 weeks. At both times, cells that penetrated the first layer of the grafts were observed (black arrows), as well as giant cells lining their outer surface (black arrowheads). Black dotted lines indicate the limit between the abluminal neotissue and the ePTFE graft. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars : large images = 250 μ m, insets = 50 μ m.



Supplementary Figure 8. Alizarin Red (AR) staining of mid-graft region of the TEVG that was dilated at 8 weeks. CAM threads are hardly visible and only few calcification points were visible. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars = 250 μm .



Supplementary Figure 9. Alizarin Red (AR) staining of mid-region of ePTFE grafts at 4 weeks and 8 weeks. Black dotted lines indicate the limit between the abluminal neotissue and the ePTFE graft. Asterisks (*) indicate the lumen. Scale bars = 250 μm .

VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a porté sur l'utilisation de matrice extracellulaire assemblée par des fibroblastes ovins associée à la versatilité d'une technique d'assemblage textile, le tissage. L'objectif générale de ce projet était de développer un substitut vasculaire biologique tissé, qui puisse avoir des propriétés structurales et mécaniques proches de celles des vaisseaux natifs. Pour ce faire, l'objectif premier était d'étudier l'influence des paramètres de tissage sur les propriétés du substitut. Les résultats de cette étude seront utilisés pour réduire le décalage mécanique entre ce dernier et les vaisseaux natifs, car il s'agit d'une cause bien connue des faibles performances à long terme des greffons vasculaires de faibles diamètres³¹. Le second objectif était de produire un substitut vasculaire tissé aux propriétés adaptées à une implantation en tant que pontage artérioveineux. Enfin, le dernier objectif était d'étudier la faisabilité d'utiliser notre substitut en tant qu'accès vasculaire dans un contexte allogénique chez le gros animal.

Dans la première partie, la possibilité d'adapter et de contrôler les propriétés structurales et mécaniques des vaisseaux tissés en modifiant les paramètres d'assemblage a été démontrée. L'utilisation d'une MAC à la force de perforation moins élevée s'est avérée la façon la plus efficace de produire des vaisseaux tissés avec une pression à l'éclatement significativement moins forte, mettant en avant l'influence de la force du fil utilisé sur les propriétés du substitut. Il a ensuite été montré que la réduction du nombre de fils de chaîne (longitudinaux) ainsi que de la largeur des rubans utilisés pour la production du fil de trame (circonférentiel) ont permis de réduire efficacement l'épaisseur de la paroi du substitut ainsi que le profil de la surface luminale. Bien que non quantifié, nous avons observé que le substitut ainsi produit était également plus souple, plus maniable que le premier prototype. Enfin, l'influence de la tension mise dans le fil de trame sur la compliance du substitut tissé a été mise en évidence. En définitive, le modèle optimisé a permis de réduire la pression à l'éclatement et l'épaisseur de la paroi du substitut de 35 % et 38 %, respectivement, et d'augmenter sa compliance de 269 %, par rapport au modèle initial. Ainsi, le substitut produit avec ce modèle optimisé possède des propriétés plus proches de celles des vaisseaux natifs, avec une pression à l'éclatement de 3492 mmHg, une épaisseur de la paroi de 0,69 mm et une compliance de 4,8 %/100 mmHg. Le modèle optimisé a aussi permis d'améliorer le profil de

surface de la lumière, tout en diminuant de 47 % la quantité de MAC utilisée, réduisant alors drastiquement son coût de production.

Dans la deuxième partie, nous avons utilisé la versatilité du tissage pour créer un greffon implantable en tant que pontage artérioveineux chez le gros animal. En conservant la densité circonférentielle des vaisseaux optimisés produits dans la première partie, nous avons été capables d'augmenter le diamètre du substitut de manière significative, tout en gardant ses propriétés structurales et mécaniques améliorées. Aussi, une technique pour produire des extrémités angulées a été développée. Ces extrémités sont nécessaires à l'implantation d'un substitut vasculaire en tant que pontage artérioveineux dans le modèle carotido-jugulaire de la brebis.

Dans la troisième partie, nous avons implanté les greffons produits suite aux résultats de la deuxième partie en tant que pontages artérioveineux chez la brebis, dans un contexte allogénique. Les analyses histologiques ont montré un remodelage du greffon après 8 semaines avec la mise en place d'un néotissu sur la face luminale, ainsi qu'une diminution de la réaction inflammatoire entre 4 et 8 semaines. Également, nous avons démontré la faisabilité d'utiliser notre substitut en tant qu'accès vasculaire, en ponctionnant ce dernier après 4 semaines avec une aiguille 16G, sans créer de dommages menant à l'échec du greffon.

Bien qu'une pression à l'éclatement minimale soit essentielle à l'implantation d'un substitut vasculaire, une pression à l'éclatement trop importante peut créer un décalage avec la force des vaisseaux natifs et mener à l'échec du greffon. Dans ce travail, nous avons réussi à réduire l'écart de pression à l'éclatement entre notre substitut biologique tissé et les vaisseaux sanguins natifs (veine saphène et artère thoracique interne), considérés comme la référence des substituts vasculaires de faible diamètre¹⁴⁻¹⁶. Ainsi, nous avons montré que la réduction de la force de perforation de la MAC d'environ 50 % permettait à elle seule une diminution significative de la pression à l'éclatement des substituts tissés. Ainsi, après optimisation des différents paramètres testés, nous avons produit un substitut ovin dont la pression à l'éclatement (3492 mmHg) est significativement moins forte que celle du premier prototype ovin (5337 mmHg). En conséquence, elle est plus proche des valeurs de référence de l'artère thoracique interne et de la veine saphène humaines (3196 mmHg et 2480 mmHg, respectivement)¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Ainsi, nous avons produit un substitut dont la pression à l'éclatement est du même ordre de grandeur que les groupes les plus avancés dans le domaine^{17,232,250}.

Alors que la force des vaisseaux tissés avec des fils de MAC repose essentiellement sur les propriétés du fil circonférentiel, il est intéressant de noter que la diminution de la largeur des rubans formant ce fil (afin d'en diminuer la force) n'a pas résulté en une baisse de la pression à l'éclatement. En effet, la perte d'épaisseur, et donc de force du fil circonférentiel, a été compensée par l'augmentation de la densité longitudinale lors du tissage. Jusqu'à présent, les vaisseaux ont été tissés avec une densité longitudinale maximale. Diminuer la densité longitudinale aurait pour conséquence une diminution de la pression à l'éclatement, mais provoquerait une augmentation de la perméabilité transmurale. L'étude de l'influence de la densité longitudinale sur l'ensemble des propriétés des vaisseaux serait donc nécessaire afin de mieux appréhender les relations entre paramètres de production et propriétés. Une autre suite à ce travail sur l'étude de l'influence des paramètres de tissage sur les propriétés des substituts sera de valider avec la MAC humaine les résultats obtenus avec la MAC ovine. En effet, les deux MAC étant différentes, ce travail sera nécessaire pour le tissage de substituts humains optimisés²⁰².

La compliance est une des propriétés mécaniques les plus recherchées des substituts vasculaires, car un décalage entre cette dernière et celles des vaisseaux natifs a été démontrée comme entraînant l'hyperplasie intimale et l'échec des greffons à long terme²⁷⁻²⁹. Cependant, la compliance est aussi une des propriétés les plus difficiles à développer en ingénierie tissulaire vasculaire. En effet, cette dernière repose essentiellement sur l'organisation des fibres élastiques au sein de la paroi des vaisseaux sanguins. Or, comme présenté précédemment, l'élastogénèse, le processus d'assemblage de ces fibres à partir de la tropoélastine, a lieu principalement lors du stade fœtal³⁵². Ainsi, les fibres élastiques chez l'adulte ne sont pas régénérées³⁵³. Aussi, alors que certaines cellules ont la capacité de participer à l'élastogénèse *in vivo* dans les phases précoces de la vie, elles ne le font pas spontanément *in vitro*³⁵². Dans ce travail, nous utilisons un matériau, la MAC, qui ne possède pas de fibres élastiques, avec une technique d'assemblage, le tissage, qui confère peu de propriétés élastiques. Notre stratégie de tissage repose sur l'utilisation de rubans et d'un fil circonférentiel, lui-même produit par l'association par torsion de deux rubans. Le fil circonférentiel a donc une certaine élasticité grâce à ce procédé^{200,457}. Après avoir fait l'hypothèse que ce fil perdait son élasticité à cause de la tension mise lors du tissage, nous avons réussi à augmenter la compliance de nos substituts en diminuant ladite tension. Ainsi,

le substitut optimisé possède une compliance supérieure à celle du premier prototype tissé (4,8 %/100 mmHg et 1,3 %/100 mmHg, respectivement), et plus élevée que celle de la veine saphène humaine, une des références en termes de substituts vasculaires de petit diamètre (1,5 %/100mmHg)¹⁷⁷. Il est à noter que le test ayant permis la quantification de la compliance consiste en la mesure de la déformation du substitut après trois changements de pression. Or, l'hypothèse peut être faite que la capacité du substitut à reprendre sa forme décroît avec l'augmentation du nombre de répétitions. Ainsi, dans des expérimentations futures, il serait intéressant de tester la compliance dynamique des substituts tissés *in vitro* sur des temps plus longs (p. ex. heures, jours), avec un rythme pulsé mimant le rythme cardiaque moyen. Cependant, il faut garder à l'esprit que les résultats *in vitro* ne prédisent pas nécessairement les résultats *in vivo*, sachant qu'un remodelage significatif des substituts issus de l'ingénierie tissulaire est attendu^{191,207,282}. Aussi, bien que supérieure à la veine saphène humaine, la compliance de nos substituts reste inférieure à celle de l'artère mammaire interne humaine (11,5 %/100 mmHg), référence ultime en termes de substituts vasculaires de faibles diamètres¹⁷⁹. Dès lors, de nouvelles pistes pourraient être envisagées pour essayer d'augmenter davantage la compliance des greffons. L'une d'entre elles pourrait mener à l'utilisation de fils circonférentiels davantage torsionnés, afin d'étudier l'influence de la torsion sur la compliance, à tension égale. Une autre piste pourrait être de changer de méthode d'assemblage en utilisant le tricot. En effet, cette méthode, déjà utilisée dans la production de substituts vasculaires, permet l'obtention de structures plus souples, et potentiellement plus compliantes^{453,463}. De plus, la possibilité de tricoter des produits d'ingénierie tissulaire avec notre matériau a été démontrée, et cette méthode est actuellement mise au point et utilisée au sein de notre équipe²⁰¹. Cependant, un substitut tricoté aurait une perméabilité transmurale trop élevée pour être implanté sans créer de fuites de sang trop importante. Il serait donc nécessaire de modifier la paroi afin de réduire cette perméabilité transmurale inhérente au tricot, par l'ajout d'un revêtement, de gélatine par exemple, pour sceller le substitut, comme cela se fait pour les prothèse synthétiques tricotées^{258,463}. Une autre piste menant à plus d'élasticité et de compliance pourrait être la production d'un fil circonférentiel guipé. Le guipage est un procédé permettant d'assembler un fil, dit « en âme », avec un deuxième fil qui entoure le premier, dit « enrobant » (**Figure 37**). Ainsi, associer un fil en âme aux propriétés élastiques avec un fil enrobant, assurant un maintien de la structure ainsi qu'une certaine résistance mécanique, mimerait d'une certaine

manière l'organisation et l'association des propriétés des fibres élastiques et des fibres de collagène dans la paroi des vaisseaux sanguins.

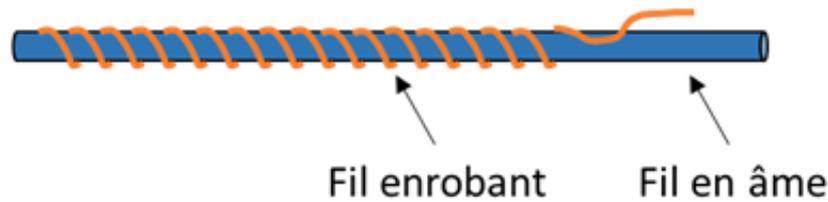


Figure 37 : Illustration du guipage, procédé par lequel un fil dit « en âme » est entouré d'un fil dit « enrobant ».

Dans les années 1990, une étude a mis en avant le bénéfice de cette approche pour la production d'un greffon vasculaire en associant deux types de fils synthétiques aux propriétés complémentaires, avec un des deux fils étant élastique¹⁶⁷. Ainsi, une des pistes à explorer pourrait être l'utilisation de fils biologiques élastiques associés aux rubans de MAC utilisés dans cette étude. Le groupe de recherche d'Anthony Weiss, en Australie, a mis au point une tropoélastine recombinante humaine qui peut servir, entre autres, à former des fibres élastiques insolubles *in vitro* ou des fils aux propriétés élastiques^{456,478}. Récemment, des travaux ont montré que l'ajout de cette tropoélastine à une MEC produite *in vitro* pouvait induire une légère formation de fibres élastiques³⁶². Ainsi, l'ajout d'un tel composé durant la culture des feuillets de MAC est une perspective intéressante afin d'essayer d'induire la formation de fibres élastiques au sein de notre matériau. Une piste supplémentaire serait de produire des feuillets de MAC avec des fibroblastes transduits avec l'isoforme V3 du versicane. En effet, il a été montré que des chaînes de glycosaminoglycanes de certains protéoglycanes, dont le versicane, participent à l'inhibition de la synthèse et de l'assemblage de l'élastine^{479,480}. L'isoforme V3 du versicane est une forme du PG dont les chaînes de chondroïtine sulfate sont absentes. Il a été montré que la transduction du versicane V3 dans des SMC permettait la production de MAC avec un accroissement du dépôt d'élastine et de la synthèse de fibres élastiques³⁴¹. Dans cette même étude, il est montré que l'arrêt d'ascorbate après 4 semaines de culture (sur 18 semaines totales) permettait d'augmenter le dépôt d'élastine dans les feuillets de MAC, par rapport à ceux produits avec de l'ascorbate en continu. L'effet positif du versicane V3 sur le dépôt d'élastine a aussi été montré lors de la synthèse de MEC *in vitro* par des fibroblastes du derme humain transduits⁴⁸¹. Cette méthode

pourrait donc être testée avec les fibroblastes humains et ovins de notre banque cellulaire, afin d'essayer de produire des feuillets de MAC avec des fibres élastiques. L'arrêt de l'ascorbate durant le temps de culture des feuillets de MAC, par exemple après 4 semaines, sera également intéressant à explorer.

En ingénierie tissulaire vasculaire, un des inconvénients de l'approche *in vitro* pour la production de substituts vasculaires est le coût, engendré notamment par les longs temps de culture. Dans notre approche, les feuillets de MAC produits doivent être suffisamment forts pour être découpés, montés sur un métier à tisser, puis tissés. Les feuillets de MAC utilisés pour produire le premier prototype de vaisseau tissé avaient une force de perforation d'environ 1000 gf, ce qui nécessitait 56 jours de culture. Après s'être rendu compte que le tissage des vaisseaux ne nécessitait pas des feuillets avec tant de force, nous avons produit des feuillets moitié moins forts, d'environ 500 gf. Ces feuillets de MAC nécessitent 38 jours de culture dans les conditions actuelles. Ainsi, nous avons réduit de 32 % le temps de culture nécessaire à l'obtention de feuillets de MAC suffisamment forts pour être utilisés dans notre application. De plus, suite à l'étude de l'influence des paramètres de tissage sur les propriétés des substituts, nous avons également réduit de 47 % la quantité de MAC utilisée, et ce tout en produisant un substitut vasculaire tissé aux propriétés optimisées par rapport au premier prototype. Ainsi, en résumé, nous avons produit un substitut vasculaire aux propriétés plus proches de celles des vaisseaux sanguins natifs, tout en réduisant son coût de production de 64 % par rapport au premier prototype. D'autres pistes pourraient être envisagées pour réduire davantage le coût de production des substituts tissés. L'une d'elles, notamment, consiste en l'utilisation d'agents macromoléculaires afin de diminuer le temps de culture. En effet, certains groupes ont démontré que la production de MEC *in vitro* pouvait être augmentée par l'utilisation de certains de ces agents comme le Ficoll®, l'acide hyaluronique, les carraghénanes ou encore le sulfate de dextrane⁴⁸²⁻⁴⁸⁶. Une autre piste pourrait être d'étudier l'effet de la quantité de milieu utilisée lors de la culture des feuillets. En effet, actuellement, 60 mL sont utilisés par changement pour une flasque de 225 cm². Des tests préliminaires ont montré qu'utiliser 50 mL ne réduisait pas la force de perforation des feuillets de MAC produits. Ainsi, une confirmation de ces résultats est nécessaire, et la mise en place d'une culture avec 50 mL par flasque au lieu de 60 mL réduirait davantage le coût de production.

La plicature, lorsqu'un substitut vasculaire se plie au lieu de se courber, est un phénomène qui peut engendrer l'obstruction du greffon. Dans le cadre de cette thèse, cette caractéristique n'était pas la priorité en termes de paramètres à améliorer, car nous n'avions pas prévu d'implanter notre greffon de manière courbée. Les substituts ont pu être implantés en tant que pontage artérioveineux sans que ce phénomène soit observé. Ainsi, pour les conditions dans lesquelles nos greffons ont été utilisés (petite longueur et non courbé), la plicature n'a pas été un problème. Cependant, c'est un aspect sur lequel il faudra davantage se concentrer dans le futur pour pouvoir implanter sous forme de boucle des greffons plus longs sans risquer une plicature. Pour éviter ce problème, certains greffons synthétiques sont ondulés ou gaufrés (cosselage), ce qui leur permet d'être pliés sans rétrécissement de la lumière^{285,460,477,487}. Cependant, le procédé utilisé est thermique, afin de faire prendre au matériau la forme ondulée souhaitée. Dès lors, l'emploi de ce genre de méthode thermique n'est pas envisageable pour notre MAC qui serait détériorée. Une idée testée durant cette thèse a été la production d'un mandrin fileté. L'idée était alors de tisser le substitut directement avec la forme souhaitée, et qu'il puisse garder cette forme ensuite. Pour sortir le substitut du mandrin sans l'endommager, il ne suffirait plus qu'à le "dévisser" du mandrin fileté. Des premiers prototypes de mandrin et de substitut ont été produits (**Figure 38**). Cependant, des modifications sont à apporter au niveau du mandrin, car le pas et l'angle du filetage étaient tous deux trop grands. Également, il est nécessaire de prendre en compte le fait que les surfaces ondulées perturbent le flux sanguin, tel que démontré dans « l'article 1 », et provoquent des modifications dans les forces de cisaillement, ce qui peut mener à des phénomènes pathologiques^{60,475,476,488,489}. Permettre une courbure du greffon sans plicature tout en limitant les ondulations de surface sera donc l'objectif à atteindre en développant le mandrin. Une autre piste pourrait être d'adapter le tissage du vaisseau, par exemple en produisant une partie plus lâche d'un côté par rapport à l'axe de la lumière dans le milieu du corps du greffon. Ainsi, une sorte de "coude" serait créé. Cependant, avant la flexion du substitut, une zone de plus grande perméabilité transmurale existera. Cette idée nécessite donc d'être testée pour voir si le degré de courbure offrira une perméabilité suffisante et compatible avec une utilisation clinique.

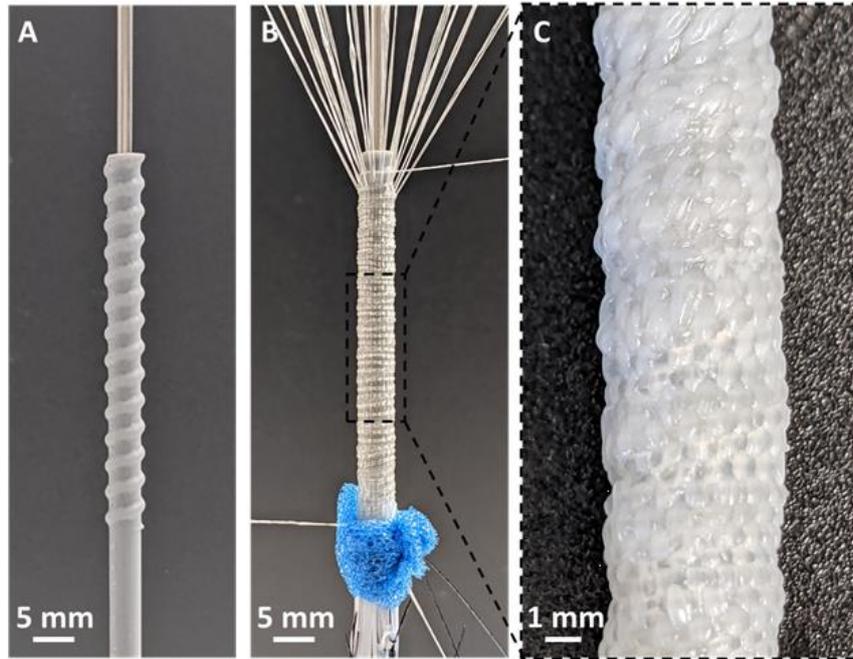


Figure 38 : Production d'un substitut tissé avec cosselage.

(A) Un mandrin fileté a été produit afin de (B) tisser directement dessus un substitut fait à base de fils de MAC. (C) Le substitut hydraté a ensuite pu être « dévissé » du mandrin, et a présenté une forme ondulée.

Bien que le tissage soit une méthode d'assemblage versatile, permettant ainsi d'adapter les propriétés mécaniques du substitut tissé ainsi que ses propriétés géométriques, une de ses limites réside dans le fait qu'il ne permet pas la découpe du substitut sans que cela engendre un effilochage. Dans ce travail de thèse, nous avons créé des substituts d'environ 4 cm avec des extrémités d'environ 45°, paramètres que le chirurgien n'a pas pu changer pour s'adapter au mieux à la situation anatomique rencontrée lors de l'implantation. Dès lors, il est nécessaire de faire évoluer la conception de nos substituts afin de donner la possibilité aux chirurgiens d'adapter la taille et la forme des extrémités des greffons au moment de l'implantation. Une des pistes qui pourrait être explorée est l'utilisation d'une colle pour matériaux biologiques⁴⁹⁰⁻⁴⁹³. Cette colle pourrait être appliquée aux endroits de découpe, et le substitut tissé pourrait alors être coupé sans risque d'effilochage. Outre les aspects de biocompatibilité habituellement évalués pour ce type de colles, il serait nécessaire d'évaluer également son influence sur la rétention à la suture.

L'étude chez le gros animal est une étape indispensable dans le développement de produits d'ingénierie tissulaire. Ici, nous avons implanté avec succès notre substitut biologique

tissé en tant que pontage artérioveineux chez le mouton. Tous les greffons biologiques étaient perméables jusqu'à 4 et 8 semaines, ce qui est supérieur ou égal aux résultats des études faites dans un contexte de pontage artérioveineux chez le brebis^{20,276,285,295,326,327}. Cependant, il est à noter la perméabilité des contrôles de notre étude, les greffons en ePTFE, qui est également très supérieure à celles présentées dans les autres études de greffons artérioveineux chez le mouton. Une des hypothèses est que le traitement anticoagulant utilisé a significativement amélioré la perméabilité des greffons. D'ailleurs, le greffon synthétique dans lequel de la thrombose a été observée est celui dont l'animal a eu une absence de traitement anticoagulant pendant quelques jours, puis des doses réduites de moitié jusqu'à la fin des 4 semaines d'étude. Cet événement supporte donc notre hypothèse. Dans notre étude, le protocole prévoyait une dose de 750 mg par jour d'antiagrégant plaquettaire (clopidogrel), ce qui est parfois près de 3 voire 4 fois supérieur aux doses utilisées dans les autres études sur le même modèle. Cependant, il a été montré que le clopidogrel pouvait avoir une efficacité limitée chez le mouton, et très variable entre les individus^{494,495}. La supériorité de la dose utilisée dans cette étude n'a donc pas nécessairement apporté d'avantages en termes de perméabilité par rapport aux autres études. Le traitement anticoagulant utilisé comprenait aussi de l'énoxaparine, dont l'action a été montrée plus efficace que celle du clopidogrel chez le mouton⁴⁹⁴. L'énoxaparine a été utilisée seulement par un autre groupe et pendant 7 jours post-chirurgie³²⁷. Dans notre cas, elle a été utilisée tous les jours jusqu'au terme de l'implantation. Ainsi, les doses d'anticoagulants utilisées pourraient expliquer les fortes perméabilités observées dans les greffons. Bien que les patients hémodialysés reçoivent un traitement anticoagulant, il est difficile, en raison des différences physiologiques et de réponses aux médicaments, de le comparer aux traitements utilisés chez le mouton^{494,496}. Dans de prochaines études, la dose d'anticoagulants devrait être ajustée afin de limiter la perméabilité des greffons synthétiques, et ainsi étudier si nos substituts ont de meilleures performances.

Une autre limite de cette étude reste la longueur des substituts implantés (environ 4 cm) qui reste très inférieure à celle des substituts utilisés en clinique pour une telle application (qui font jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres), et inférieure à la taille des autres substituts implantés en tant qu'AVG chez le mouton^{20,24,285,326,327}. Cette petite taille peut avoir eu un effet sur la forte perméabilité des greffons. En effet, une petite longueur, pour un

diamètre similaire, entraîne moins de surface au contact du sang qu'un greffon plus grand, limitant la probabilité d'agrégation plaquettaire. De plus, une petite longueur favorise l'endothélialisation transanastomotique par rapport à des greffons plus longs, où l'endothélium mettra davantage de temps à se former et à atteindre le centre. Le rôle de l'endothélium dans la prévention d'évènements thrombotiques étant connu, un greffon de grande taille aura plus de chances de se thromboser qu'un petit substitut^{149,159}. Ainsi, dans de futures implantations, il sera important d'évaluer des substituts plus longs.

La réponse de l'hôte à l'implantation d'un substitut vasculaire est primordiale dans sa performance à long terme. Notamment, la réponse immunitaire est un facteur d'échec à court terme si celle-ci est adverse suite à l'implantation. Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu observer une forte réponse lymphocytaire suite à l'implantation de nos greffons, après 4 et 8 semaines. Notre hypothèse qui est qu'un substitut fait à partir de MAC ovine dévitalisée n'engendrerait pas de réponse immunitaire forte dans un contexte allogénique n'est donc pas confirmée par ces résultats. Bien qu'une précédente étude chez l'humain ait démontré l'implantation de trois greffons allogéniques dévitalisés sans signes cliniques et humoraux de rejets, aucune analyse histologique n'avait été possible. Des substituts vasculaires faits d'une MEC produite *in vitro* par des fibroblastes ovins, puis décellularisée, ont déjà été implantés avec succès dans un contexte allogénique, sans preuve de réponse immunitaire excessive^{207,209}. Une des raisons de la réponse immunitaire rencontrée avec nos greffons pourrait être causée par l'utilisation de la dévitalisation au lieu de la décellularisation. En effet, la dévitalisation tue les cellules, permettant la production d'un substitut non-vivant. Or, contrairement à la décellularisation, ce procédé ne retire pas une grande partie des composants antigéniques des cellules, qui sont susceptibles d'amener à une réaction immunitaire indésirable. Ayant une méthode de décellularisation déjà fonctionnelle au sein de notre groupe, tel que démontré dans « l'article 1 », une des pistes pourrait être de décellulariser nos greffons avant implantation. Cependant, cela impliquerait une adaptation des paramètres de tissage du vaisseau, car la décellularisation change les propriétés de la MAC et donc du vaisseau tissé, comme nous l'avons vu dans les résultats de la première partie de ces travaux de thèse. Une deuxième piste à explorer est le sérum bovin utilisé pour la culture des feuillettes de MAC. En effet, des taux d'immunoglobuline G dans des lots de sérum bovins ont déjà été démontrés comme responsables d'une réaction immunitaire indésirable dans de

précédentes implantations de MAC³³. Lors des essais cliniques utilisant des greffons vasculaires faits de MAC roulée, des sérums déplétés en immunoglobulines ont été utilisés. Cela n'a pas été possible dans notre étude car ce traitement n'était pas disponible pour le lot de sérum que nous avons déjà sélectionné pour la production de MAC. Ainsi, dans de futures études, notre groupe devrait utiliser des sérums avec un faible taux d'immunoglobuline G pour déterminer s'il s'agit de la cause de la réaction lymphocytaire observée. Une autre piste serait d'utiliser un sérum ovin pour la culture de feuillet de la même espèce, ce qui limiterait ainsi la présence éventuelle d'antigènes xénogéniques. Nous avons déjà testé un sérum ovin pour la production de MAC ovine mais celui-ci n'a pas permis la synthèse d'un feuillet de MAC. La production de MEC humaine *in vitro* a récemment été démontrée en remplaçant le sérum xénogénique par du sérum humain, démontrant la possibilité de cette approche même pour une application clinique⁴⁹⁷. Un aspect supplémentaire dont il faut tenir compte est que l'environnement dans lequel sont tissés les greffons n'assure pas une production selon les bonnes pratiques de fabrication. Ainsi, des impuretés invisibles macroscopiquement (p. ex. ramenées par les gants) peuvent se retrouver sur le greffon final.

En ingénierie tissulaire vasculaire, le remodelage d'un substitut par l'hôte après implantation est une étape indispensable au succès à long terme du greffon. En effet, quelle que soit l'approche utilisée, l'objectif est de promouvoir le remodelage du substitut implanté en un qui sera s'adapter aux besoins du corps. Dans ce travail, nous avons montré la bonne intégration de nos greffons aux tissus hôtes. Nous avons observé un remodelage de nos greffons avec la formation d'un néotissu interne dans l'ensemble des quatre greffons explantés après 8 semaines. Ce néotissu est notamment composé de nombreuses cellules positives à la calponine, marqueur de cellules musculaires lisses. Ces résultats supportent les résultats du peu d'études faites sur le même modèle chez le mouton, qui montrent la présence de cellules au phénotype de cellules musculaires lisses dès 8 et 12 semaines^{20,24}. De plus, nous avons montré la présence de cellules positives à la VE-cadhérine à la surface du néotissu d'un des greffons explantés après 8 semaines. Ces résultats démontrent la présence d'un endothélium au centre du greffon, comme observé dans l'étude du groupe de Rotmans²⁰. Deux autres études ne l'ont quant à elles montré qu'après 12 semaines^{24,327}. Bien que ces résultats ont pour le moment été démontrés uniquement dans un des greffons, des variabilités inter-individuelles dans le remodelage à 8 semaines ont été soulignées dans

d'autres études et pouvaient donc être attendues²⁰. Le marquage de nos explants avec un Verhoeff Elastic-Trichrome Masson modifié n'a pas mis en évidence la présence de fibres élastiques dans nos substituts à 4 et 8 semaines. Dans leur étude, Geelhoed *et al.* n'ont pas fait de marquage histologique permettant d'observer ou non la présence de fibres élastiques organisées au sein du tissu. Cependant, ils ont mis en évidence par immunohistochimie la présence d'élastine après 8 semaines²⁰. Dans le cadre de notre étude, des marquages immunohistochimiques seront faits dans un futur proche afin de déterminer s'il y a de l'élastine au sein de nos substituts. Dans un modèle ovin, le groupe de Tranquillo a implanté un greffon allogénique fait d'une MEC produite *in vitro* en interposition dans l'artère fémorale²⁰⁷. Alors que la présence d'élastine était négligeable après 8 semaines, ils ont montré qu'elle s'est déposée dans l'ensemble du greffon après 6 mois. De plus, une coloration au Verhoeff-Van Gieson des greffons explantés à 6 mois a mis en évidence des fibres élastiques. Ainsi, il serait d'intérêt de faire de futures implantations jusqu'à 6 mois afin d'étudier si ce plus long terme permettrait la formation d'un néotissu plus mature, avec une endothélialisation plus importante et la formation de fibres élastiques.

Le remodelage du greffon après des semaines d'implantation implique aussi un changement de ses propriétés mécaniques. Dans cette première étude *in vivo*, la décision a été prise de ne pas effectuer de caractérisation mécanique après 8 semaines dans le but de garder l'ensemble de l'échantillon pour les analyses histologiques. En effet, la longueur des substituts implantés (environ 4 cm) ne permettait pas d'avoir suffisamment d'échantillons pour faire l'ensemble des analyses mécaniques et histologiques. Dans les études futures, l'implantation de substituts plus longs permettra de caractériser leur évolution en termes de pression à l'éclatement et de compliance, notamment. Bien que cette dernière pourrait être mesurée par échographie, une caractérisation *in vitro* permettrait de la comparer précisément aux valeurs pré-implantation.

La calcification, caractérisée comme le dépôt pathologique de minéraux dans le système vasculaire, a été observée dans nos greffons, particulièrement après 8 semaines. Ces résultats étaient inattendus, car une calcification n'a pas été mise en évidence lors d'études sur l'implantation de notre matériau sous forme de feuillets roulés en tant que substitut vasculaire chez plusieurs espèces, dont l'espèce humaine^{18,32-34,191}. Cependant, ces résultats font suite à ceux de la première étude à long terme des substituts tissés à partir de fils de MAC

et implantés chez le rat (résultats en préparation à la publication). La calcification est un phénomène largement rapporté dans les applications cardiovasculaires^{323,498-501}. Dans les applications vasculaires, bien qu'encore peu clairs, les mécanismes de la calcification sont liés à une réponse immunitaire, qui peut notamment être causée par la présence de débris cellulaires⁵⁰²⁻⁵⁰⁶. Ainsi, une des pistes futures pourrait être d'implanter des greffons décellularisés afin d'éliminer les débris de fibroblastes présents lors de l'implantation. Également, la coloration des substituts au rouge alizarine a mis particulièrement en évidence la calcification du fil circonférentiel. Le fil circonférentiel est produit par torsion de rubans, et il est donc fait d'une matrice très compactée. Comme démontré précédemment, les cellules de l'hôte ont alors difficilement accès à l'intérieur de ce fil⁴⁵⁷. Ici, nous faisons l'hypothèse que l'élimination des débris cellulaires n'étant pas facilitée, cela promeut la calcification du fil. Une des solutions envisagées pour essayer d'éliminer ce phénomène est l'utilisation d'un ruban à peine torsionné, en tant que fil circonférentiel. La faible torsion, tout en permettant l'obtention d'un fil pour faciliter le tissage, n'entraînera qu'une très faible compaction de la MAC. Cependant, un tel changement impliquera des modifications de la compliance du vaisseau, une diminution de la torsion entraînant une perte d'élasticité du fil²⁰¹. Ainsi, une telle modification devra être faite en utilisant les outils et les résultats mis en avant dans ce travail de thèse, dans le but de produire un vaisseau aux propriétés optimisées.

Un accès vasculaire fonctionnel, c'est-à-dire avec un débit suffisamment élevé et qui peut être ponctionné trois fois par semaine, est essentiel pour les patients sous hémodialyse^{84,507}. Une de nos préoccupations quant à la structure tissée de nos vaisseaux était sa résistance suite à une ponction avec une aiguille de la taille de celles utilisées en clinique pour les patients hémodialysés (16G). En effet, le risque de casser un ou plusieurs fils en ponctionnant le substitut peut faire craindre un effilochage de ce dernier. Cependant, nous avons montré dans ce travail qu'après 4 semaines, temps communément laissé aux greffons avant la première ponction, celle-ci n'a pas endommagé les substituts, qui sont restés perméables jusqu'au terme des 8 semaines d'implantation. La dilatation d'un des greffons a été mesurée à partir de 2 semaines, et une évolution de son diamètre a été observée jusqu'au terme de l'implantation. L'augmentation du diamètre interne du greffon a été relevée avant la ponction, éliminant ainsi cette dernière comme étant la cause de la dilatation. L'hypothèse est que la réponse immunitaire contre ce greffon a été plus forte que contre les autres. Par

conséquent, le remodelage a été plus rapide dans ce substitut, provoquant une dilatation. Parmi le peu de groupes ayant testé la capacité de ponction de leurs substituts chez le mouton, notre groupe est un des rares à avoir ponctionné les greffons en cours d'implantation^{24,326}. En effet, d'autres groupes ont testé cet aspect juste avant le sacrifice de l'animal^{276,325}. Bien qu'un succès, il serait intéressant et nécessaire, dans le futur, d'évaluer la capacité du greffon à être ponctionné dans des conditions plus proches des conditions cliniques. Cela impliquerait, sur un temps d'étude plus long, de ponctionner le greffon 3 fois par semaine, idéalement. Seulement, quelques limites éthiques existent à cette expérience. En effet, dans notre étude, les moutons ont dû être placés sous anesthésie générale pour effectuer les échographies ainsi que la ponction. Or, 3 anesthésies générales par semaine pourraient ne pas être possibles, en termes de réglementation. Ainsi, il serait nécessaire d'effectuer les ponctions dans le cou d'animaux vigiles, ce qui, en l'état, n'a pas été envisagé à cause de la nervosité des animaux. Ces derniers pourraient peut-être être sédatés, mais là encore, il sera nécessaire de s'assurer que la réglementation le permette plusieurs fois par semaines. A notre connaissance, seul un groupe a effectué 3 ponctions par semaine pendant plusieurs mois chez le mouton, sans anesthésie ni sédation, uniquement en utilisant la contention³²⁶. Eventuellement, une ponction toutes les deux semaines, voire par semaine, lors des contrôles échographiques, pourrait probablement être mise en place avec l'accord du comité d'éthique.

IX. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1. PUBLICATIONS

Roudier, G. et al. Effects of weaving parameters on the properties of completely biological tissue-engineered vascular grafts. *Biofabrication* **16**, (2024).

2. COMMUNICATIONS ORALES

2023

G. Roudier. Development and first use of a completely biological thread-based vascular graft as an arteriovenous shunt in sheep. *Bio3Pharm - French-Portuguese Symposium*. Bordeaux, France (September 2023).

G. Roudier, M. Hourques, M. Gluais, C. Caradu, X. Bérard, N. L'Heureux. Development of a vascular graft woven from extracellular matrix yarn and first use as an arteriovenous shunt in sheep. *12th Symposium on Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine*. Napa, CA, USA (May, 2023).

G. Roudier, M. Hourques, C. Caradu, X. Bérard, N. L'Heureux. Development and first use of a biological woven vascular graft as an arteriovenous shunt in sheep. *TERMIS-European Chapter*. Manchester, UK (March, 2023).

2022

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Effects of weaving parameters on the properties of biological vascular grafts. *Scientific day of the STS department of the University of Bordeaux*. Bordeaux, France (November, 2022).

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Weaving a compliant tissue-engineered vascular graft from cell-assembled extracellular matrix yarn. *TERMIS-European Chapter*. Krakow, Poland (June, 2022).

3. COMMUNICATIONS AFFICHÉES

2023

G. Roudier, M. Hourques, C. Caradu, X. Bérard, N. L'Heureux. Development and first use of a biological woven vascular graft as an arteriovenous shunt in sheep. *Swiss-French Biomaterials Young Researcher's Summer School*. Zurich, Switzerland (June, 2023).

2022

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Influence of weaving parameters on the properties of biological yarn-based vascular grafts. *18th ISACB Biennial Meeting*. Memphis, TN, USA (September, 2022).

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Weaving from cell-assembled extracellular matrix yarn: towards better tissue-engineered vascular grafts. *32nd Annual conference of the European Society for Biomaterials*. Bordeaux, France (September, 2022).

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Improving the compliance of a completely biological woven TEVG. *Scientific Day of the Doctoral School of Life and Health Sciences of the University of Bordeaux*. Bordeaux, France (April, 2022).

2021

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. Towards a better Tissue-Engineered

Vascular Graft woven from Cell-Assembled Extracellular Matrix yarn. *Scientific day of the STS department of the University of Bordeaux*. Bordeaux, France (November, 2021).

G. Roudier, M. Hourques, N. Da Silva, M. Gluais, N. L'Heureux. How to build a better Tissue-Engineered Vascular Graft woven from Cell-Assembled Extracellular Matrix yarn? *Biomat 2021 Congress*. Bourg Saint Maurice, France (October, 2021).

X. BIBLIOGRAPHIE

1. Antoniou GA, Chalmers N, Georgiadis GS, et al. A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoropopliteal arterial disease. *J Vasc Surg.* 2013;57(1):242-253. doi:10.1016/j.jvs.2012.07.038
2. Kappetein AP, Feldman TE, Mack MJ, et al. Comparison of coronary bypass surgery with drug-eluting stenting for the treatment of left main and/or three-vessel disease: 3-year follow-up of the SYNTAX trial. *Eur Heart J.* 2011;32(17):2125-2134. doi:10.1093/eurheartj/ehr213
3. Conte MS. Critical appraisal of surgical revascularization for critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2013;57:8S-13S. doi:10.1016/j.jvs.2012.05.114
4. Haute Autorité de Santé. *Implants de Pontage - Rapport d'évaluation.*; 2013.
5. National Kidney Foundation. KDOQI clinical practice guideline for hemodialysis adequacy: 2015 update. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(5):884-930. doi:10.1053/j.ajkd.2015.07.015
6. Hadinata IE, Hayward PAR, Hare DL, et al. Choice of Conduit for the Right Coronary System: 8-Year Analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes Trial. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(5):1404-1409. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.06.010
7. Guidoin R, Chakfé N, Maurel S, et al. Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials.* 1993;14(9):678-693. doi:10.1016/0142-9612(93)90067-C
8. James NL, Schindhelm K, Slowiaczek P, et al. In vivo Patency of Endothelial Cell-Lined Expanded Polytetrafluoroethylene Prostheses in an Ovine Model. *Artif Organs.* 1992;16(4):346-353. doi:10.1111/j.1525-1594.1992.tb00530.x
9. Takagi H, Goto S nosuke, Matsui M, Manabe H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. *J Vasc Surg.* 2010;52(1):232-236. doi:10.1016/j.jvs.2010.02.010
10. Allon M. Vascular access for hemodialysis patients: New data should guide decision making. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(6):954-961. doi:10.2215/CJN.00490119
11. Holdsworth RJ, Naidu S, Gervaz P, McCollum PT. Glutaraldehyde-tanned bovine carotid artery graft for infrainguinal vascular reconstruction: 5-year follow-up. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;14(3):208-211. doi:10.1016/S1078-5884(97)80193-1
12. Matsuura JH, Rosenthal D, Wellons ED, Castronovo CS, Fronk D. Hemodialysis graft infections treated with cryopreserved femoral vein. *Cardiovasc Surg.* 2002;10(6):561-565. doi:10.1177/096721090201000608
13. Vogt PR, Von Segesser LK, Goffin Y, et al. Eradication of Aortic Infections With the Use of Cryopreserved Arterial Homografts. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(3):640-645. doi:10.1016/S0003-4975(96)0045-4
14. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27(4):357-362. doi:10.1016/j.ejvs.2003.12.027
15. Solaković E, Totić D, Solaković S. Femoro-popliteal bypass above knee with saphenous vein vs synthetic graft. *Bosn J Basic Med Sci.* 2008;8(4):367-372. doi:10.17305/bjbm.2008.2899
16. Twine CP, McLain AD. Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *Cochrane Database Syst*

Rev. 2010;(5). doi:10.1002/14651858.cd001487.pub2

17. Syedain ZH, Graham ML, Dunn TB, et al. A completely biological “ off-the-shelf ” arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Sci Transl Med*. 2017;9.
18. Wystrychowski W, Garrido SA, Marini A, Dusserre N, Todd M, L’Heureux N. Long-term results of autologous tissue-engineered vascular graft for haemodialysis access. *J Vasc Access*. Published online 2022;1-24. doi:10.1177/11297298221095994
19. Gutowski P, Guziewicz M, Ilzecki M, et al. Six-year outcomes of a phase II study of human-tissue engineered blood vessels for peripheral arterial bypass. *JVS-Vascular Sci*. 2022;4:100092. doi:10.1016/j.jvssci.2022.11.001
20. Geelhoed WJ, van der Bogt KEA, Rothuizen TC, et al. A novel method for engineering autologous non-thrombogenic in situ tissue-engineered blood vessels for arteriovenous grafting. *Biomaterials*. 2020;229. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119577
21. Nakayama Y, Higashita R, Shiraishi Y, et al. iBTA-Induced Biotube® Blood Vessels: 2020 Update. *Kidney Dial*. 2021;1(1):3-13. doi:10.3390/kidneydial1010002
22. Wang Z, Mithieux SM, Vindin H, et al. Rapid Regeneration of A Neoartery with Elastic Lamellae. *Adv Mater*. 2022;34. doi:10.1002/adma.202205614
23. Nasiri B, Row S, Smith RJ, Swartz DD, Andreadis ST. Cell-Free Vascular Grafts That Grow with the Host. *Adv Funct Mater*. 2020;30(48). doi:10.1002/adfm.202005769
24. Zhi D, Cheng Q, Midgley AC, et al. Mechanically reinforced biotubes for arterial replacement and arteriovenous grafting inspired by architectural engineering. *Sci Adv*. 2022;8(11):1-18.
25. Sarkar S, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts: Their Role in Influencing Patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31(6):627-636. doi:10.1016/j.ejvs.2006.01.006
26. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, et al. The mechanical behavior of vascular grafts: A review. *J Biomater Appl*. 2001;15(3):241-278. doi:10.1106/NA5T-J57A-JTDD-FD04
27. Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L’Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg*. 1987;5(2):376-382. doi:10.1016/0741-5214(87)90148-0
28. Walden R, L’italien GJ, Megerman J, Abbott WM. Matched Elastic Properties and Successful Arterial Grafting. *Arch Surg*. 1980;115(10):1166-1169. doi:10.1001/archsurg.1980.01380100018004
29. Kidson IG. The effect of wall mechanical properties on patency of arterial grafts. *Ann R Coll Surg Engl*. 1983;65(1):24-29.
30. Trubel W, Schima H, Moritz A, et al. Compliance mismatch and formation of distal anastomotic intimal hyperplasia in externally stiffened and lumen-adapted venous grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995;10(4):415-423. doi:10.1016/S1078-5884(05)80163-7
31. Ballyk PD, Walsh C, Butany J. Compliance mismatch may promote graft–artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech*. 1997;31:229-237.
32. 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*. 2014;60(5):1353-1357. doi:10.1016/j.jvs.2013.08.018
33. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*.

- 2009;373(9673):1440-1446. doi:10.1016/S0140-6736(09)60248-8
34. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, et al. Case study: First implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *J Vasc Access*. 2011;12(1):67-70. doi:10.5301/JVA.2011.6360
 35. Lacour B, Belon J. *Physiologie Humaine*. Elsevier Health Sciences (US); 2016.
 36. Hossler FE. Cardiovascular System. In: *Ultrastructure Atlas of Human Tissues*. John Wiley & Sons, Inc.; 2014:303-358.
 37. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44:333-340. doi:10.1007/978-3-642-55201-4
 38. Thiriet M. Cardiovascular Physiology. In: *Anatomy and Physiology of the Circulatory and Ventilatory Systems*. Springer New York, NY; 2014:585. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9469-0
 39. Mescher A. The Circulatory System. In: *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. 12th ed. McGraw-Hill Medical; 2010.
 40. Pocock G, Richards C, Richards D. Le système cardiovasculaire. In: *Physiologie Humaine et Physiopathologie*. Elsevier Health Sciences (US); 2019.
 41. Duparc F, Dupont S, Montaudon M. Appareil cardiovasculaire. In: Elsevier Health Sciences (US), ed. *Manuel d'anatomie Descriptive, Fonctionnelle et Clinique*. ; 2022.
 42. Eble J, Niland S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Curr Pharm Des*. 2009;15(12):1385-1400. doi:10.2174/138161209787846757
 43. Tennant M, McGeachie JK. Blood Vessel Structure and Function: a Brief Update on Recent Advances. *Aust N Z J Surg*. 1990;60(10):747-753. doi:10.1111/j.1445-2197.1990.tb07468.x
 44. Kliche K, Jeggle P, Pavenstädt H, Oberleithner H. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2011;462:209-217. doi:10.1007/s00424-011-0929-2
 45. Halper J. Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix. In: *Advances in Pharmacology*. Vol 81. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018:95-127. doi:10.1016/bs.apha.2017.08.012
 46. Stenmark K, Yeager M, El Kasmi K, et al. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:23-47. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183802.The
 47. Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: From innocent bystander to active participant. *Circ Res*. 2001;89(12):1111-1121. doi:10.1161/hh2401.100844
 48. Wolinsky H, Glagov S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res*. 1967;20(4):409-421. doi:10.1161/01.RES.20.4.409
 49. Phillippi JA. On vasa vasorum : A history of advances in understanding the vessels of vessels. *Sci Adv*. 2022;8(16):1-21.
 50. Silva C, Heitor Reis A. Structure and adaptation of arteries to pulsatile flow: The case of the ascending aorta. *Med Phys*. 2014;41(6). doi:10.1118/1.4876379
 51. Camasão DB, Mantovani D. The mechanical characterization of blood vessels and their

- substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Mater Today Bio*. 2021;10(March). doi:10.1016/j.mtbio.2021.100106
52. Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circ Res*. 2005;97(11):1093-1107. doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
 53. Burton A. Relation of Structure to Function of the Tissues of the Wall of Blood Vessels. *Physiol Rev*. 1954;34(4).
 54. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*. 2009;89(3):957-989. doi:10.1152/physrev.00041.2008
 55. Lee RT, Kamm RD. Vascular mechanics for the cardiologist. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23(6):1289-1295. doi:10.1016/0735-1097(94)90369-7
 56. Humphrey JD, Eberth JF, Dye WW, Gleason RL. Fundamental Role of Axial Stress in Compensatory Adaptations by Arteries. *J Biomech*. 2009;42(1):1-8. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.11.011.Fundamental
 57. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79(5):984-991. doi:10.1161/01.RES.79.5.984
 58. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):16-26. doi:10.1038/ncpcardio1397
 59. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *J Am Med Assoc*. 1999;282(21):2035-2042.
 60. Hathcock JJ. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1729-1737. doi:10.1161/01.ATV.0000229658.76797.30
 61. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983;53(4):502-514. doi:10.1161/01.RES.53.4.502
 62. Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, et al. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med*. 2009;15(6):665-673. doi:10.1038/nm.1955
 63. Samady H, Eshthardi P, McDaniel MC, et al. Coronary artery wall shear stress is associated with progression and transformation of atherosclerotic plaque and arterial remodeling in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2011;124(7):779-788. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021824
 64. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390:1151-1210. doi:10.1016/S0140-6736(17)32152-9
 65. OMS. Les 10 principales causes de mortalité. Published 2020. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 66. WHO Study Group on the Classification of Atherosclerotic Lesions & World Health Organization. *Classification Des Lésions d'athérosclérose : Rapport d'un Groupe d'étude [réuni À Washington Du 7 Au 11 Octobre 1957].*; 1958.
 67. Tedgui A. Physiopathologie de l'athérosclérose. *EMC - Angéiologie*. 2020;24(1):1-11.
 68. Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights

- to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(8):589-610. doi:10.1038/s41573-021-00198-1
69. Emmerich J, Bruneval P, Mallat Z. Athérosclérose. *EMC - Cardiol*. 2019;14(1):1-11.
 70. Coll B, Betriu A, Martínez-Alonso M, et al. Large Artery Calcification on Dialysis Patients Is Located in the Intima and Related to Atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(2):303-310. doi:10.2215/CJN.04290510
 71. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1453-1464. doi:10.1681/ASN.2008070692
 72. National Kidney Foundation. Vascular Dysfunction, Atherosclerosis, and Vascular Calcification. *Natl Kidney Found*. 2010;21:1-24.
 73. Boffa J-J, Cartery C. Insuffisance rénale chronique ou maladie rénale chronique. *EMC - Trait Médecine Akos*. 2015;10(2):1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/S1634-6939>
 74. Frimat L, Ayav C. Épidémiologie des maladies rénales chroniques. *EMC - Néphrologie*. 2018;15(2):1-15.
 75. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020;395:709-733. doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3
 76. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review. *Lancet*. 2015;385(9981):1975-1982. doi:10.1016/S0140-6736(14)61601-9
 77. USRDS. *US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*.; 2019. doi:10.1053/j.ajkd.2019.09.003
 78. Buzzi M, Couchoud C, Crémades A, Devictor B, Moranne O, Ayav C. Description of trajectories of patients with end-stage renal disease from the REIN registry. *Nephrol Ther*. 2021;17:415-421. doi:10.1016/j.nephro.2021.02.004
 79. Himmelfarb J, Vanholder R, Mehrotra R, Tonelli M. The current and future landscape of dialysis. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(10):573-585. doi:10.1038/s41581-020-0315-4
 80. Hole B, Hemmelgarn B, Brown E, et al. Supportive care for end-stage kidney disease: an integral part of kidney services across a range of income settings around the world. *Kidney Int Suppl*. 2020;10(1):e86-e94. doi:10.1016/j.kisu.2019.11.008
 81. Canaud B, Chenine L, Morena M, Cristol JP. Principes et modalités d'application de l'hémodialyse au traitement de l'insuffisance rénale chronique. *EMC - Néphrologie*. 2016;13(4):1-25.
 82. Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB. On removal of diffusible substances from circulating blood by means of dialysis. *Trans Assoc Am Physicians*. 1913;28:51-54.
 83. Paskalev DN. Georg Haas (1886-1971): The forgotten hemodialysis pioneer. *Dial Transplant*. 2001;30(12):828-832.
 84. Kolff WJ, Berk HTJ. The Artificial Kidney: a dialyser with a great area. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(12).
 85. Gottschalk C, Fellner S. History of the Science of Dialysis. *Am J Nephrol*. 1997;17:289-298.
 86. Merrill JP, Thorn GW, Walter CW, Callahan EJ, Hollingsworth Smith J. The use of an artificial

- kidney. *J Clin Invest*. 1949;29(4):412-424.
87. Shaw C. THE KOLFF-MERRILL ARTIFICIAL KIDNEY—Clinical Application in Acute Renal Insufficiency. *Calif Med*. 1955;82(4).
 88. Salisbury P. Indications for artificial kidney treatment. *Am Soc Artif Intern Organs J*. 1955;1:43-45.
 89. Scribner BH, Buri R, Caner JEZ, Hegstrom R, Burnell JM. The treatment of chronic uremia by means of intermittent hemodialysis: a preliminary report. *Am Soc Artif Intern Organs J*. 1998;9(1):114-122.
 90. Quinton, Wayne; Dillard, David; Scribner BH, Quinton W, Dillard D, Scribner BH. Cannulation of blood vessels for prolonged hemodialysis. *Am Soc Artif Intern Organs J*. 2004;6(1):104-113. doi:10.1111/j.1492-7535.2004.00080.x
 91. Chisholm GD. The Scribner Arteriovenous Fistula for Haemodialysis. *Br Med J*. 1961;2(5243):30-33. doi:10.1136/bmj.2.5243.30
 92. Scribner BH. Medical dilemmas: The old is new. *Nat Med*. 2002;8(10):1066-1067. doi:10.1038/nm772
 93. Brescia MJ, Cimino JE, Appel K, Hurwich BJ. Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula. *New Engl J Med*. 1966;275(20):1089-1966.
 94. Billault C, Ferhi K, Barrou B. Accès vasculaires pour hémodialyse : stratégie et techniques chirurgicales de création. *EMC - Tech Chir - Urol*. 2013;6(13):1-12.
 95. Sadaghianloo N, Declémy S. Création des abords vasculaires pour hémodialyse : stratégie et techniques opératoires. *EMC - Tech Chir - Chir Vasc*. 2020;36(3):1-15. doi:10.1016/S0246-0459(20)41941-0
 96. Akoh JA. Prosthetic arteriovenous grafts for hemodialysis. *J Vasc Access*. 2009;10(3):137-147. doi:10.1177/112972980901000301
 97. Monroy-Cuadros M, Yilmaz S, Salazar-Bañuelos A, Doig C. Independent prediction factors for primary patency loss in arteriovenous grafts within six months. *J Vasc Access*. 2013;13(1):29-35. doi:10.5301/JVA.2011.8425
 98. Lawson JH, Niklason LE, Roy-Chaudhury P. Challenges and novel therapies for vascular access in haemodialysis. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(10):586-602. doi:10.1038/s41581-020-0333-2.Challenges
 99. Leermakers JJPM, Bode AS, Vaidya A, Van Der Sande FM, Evers SMAA, Tordoir JHM. Cost-effectiveness of vascular access for haemodialysis: Arteriovenous fistulas versus arteriovenous grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;45(1):84-92. doi:10.1016/j.ejvs.2012.10.012
 100. Voorzaat BM, van der Bogt KEA, Janmaat CJ, van Schaik J, Dekker FW, Rotmans JI. Arteriovenous Fistula Maturation Failure in a Large Cohort of Hemodialysis Patients in the Netherlands. *World J Surg*. 2018;42(6):1895-1903. doi:10.1007/s00268-017-4382-z
 101. Choi J, Ban TH, Choi BS, et al. Comparison of vascular access patency and patient survival between native arteriovenous fistula and synthetic arteriovenous graft according to age group. *Hemodial Int*. 2020;24(3):309-316. doi:10.1111/hdi.12836
 102. Arhuidese IJ, Purohit A, Elemuo C, Parkerson GR, Shames ML, Malas MB. Outcomes of autogenous fistulas and prosthetic grafts for hemodialysis access in diabetic and nondiabetic patients. *J Vasc Surg*. 2020;72(6):2088-2096. doi:10.1016/j.jvs.2020.02.035

103. Thwaites SE, Holt SG, Yii MK. Inferiority of arteriovenous grafts, in comparison to autogenous fistulas, is underestimated by standard survival measures alone. *ANZ J Surg.* 2021;91(1-2):162-167. doi:10.1111/ans.16472
104. Shiu YT, Rotmans JI, Geelhoed WJ, Pike DB, Lee T. Arteriovenous conduits for hemodialysis: How to better modulate the pathophysiological vascular response to optimize vascular access durability. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2019;316(5):F794-F806. doi:10.1152/ajprenal.00440.2018
105. Beathard GA, Lok CE, Glickman MH, et al. Definitions and end points for interventional studies for arteriovenous dialysis access. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(3):501-512. doi:10.2215/CJN.11531116
106. Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection. *Lancet.* 2015;385:800-811. doi:10.1016/S0140-6736(14)61005-9
107. Lejay A, Girsowicz E, Georg Y, et al. Substituts vasculaires. *EMC - Tech Chir - Chir Vasc.* 2016;11(3):1-8. doi:10.1016/j.anchir.2004.05.002
108. Tyras DH, Barner HB, Kaiser GC, Codd JE, Pennington DG, Willman VL. Bypass grafts to the left anterior descending coronary artery - Saphenous vein versus internal mammary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980;80(3):327-333. doi:10.1016/s0022-5223(19)37757-8
109. Loop F, Lytle B, Cosgrove D, Stewart R, Sheldon W, Proudfit W. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *New Engl J Med.* 1986;314(1).
110. Caliskan E, de Souza DR, Böning A, et al. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(3):155-169. doi:10.1038/s41569-019-0249-3
111. Carrel A, Guthrie CC. Results of the Biterminal Transplantation of Veins. *Am J Med Sci.* 1906;132(3):415-422. doi:10.1097/00000441-190609000-00006
112. Arvela E, Venermo M, Söderström M, Albäck A, Lepäntalo M. Outcome of Infrainguinal Single-Segment Great Saphenous Vein Bypass for Critical Limb Ischemia is Superior to Alternative Autologous Vein Bypass, Especially in Patients With High Operative Risk. *Ann Vasc Surg.* 2012;26(3):396-403. doi:10.1016/j.avsg.2011.08.013
113. Dorigo W, Pulli R, Castelli P, et al. A multicenter comparison between autologous saphenous vein and heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft in the treatment of critical limb ischemia in diabetics. *J Vasc Surg.* 2011;54(5):1332-1338. doi:10.1016/j.jvs.2011.05.046
114. Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: A review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1995;9(1):7-18. doi:10.1016/S1078-5884(05)80218-7
115. Owens CD, Gasper WJ, Rahman AS, Conte MS. Vein graft failure. *J Vasc Surg.* 2015;61(1):203-216. doi:10.1016/j.jvs.2013.08.019
116. De Vries MR, Simons KH, Jukema JW, Braun J, Quax PHA. Vein graft failure: From pathophysiology to clinical outcomes. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(8):451-470. doi:10.1038/nrcardio.2016.76
117. Ziza V, Canaud L, Gandet T, et al. Outcomes of cold-stored venous allograft for below-knee bypasses in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2015;62(4):974-983. doi:10.1016/j.jvs.2015.04.437

118. Chang CK, Scali ST, Feezor RJ, et al. Defining utility and predicting outcome of cadaveric lower extremity bypass grafts in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2014;60(6):1554-1564. doi:10.1016/j.jvs.2014.06.009
119. Dubost C, Allary M, Oeconomos N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: Reestablishment of the Continuity by a Preserved Human Arterial Graft, with Result After Five Months. *AMA Arch Surg.* 1952;64(3):405-408. doi:10.1001/archsurg.1952.01260010419018
120. Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late Fate of Arterial Allografts. *AMA Arch Surg.* 1970;101:721-733.
121. Szilagyi DE, McDonald RT, Smith RF, Whitcomb JG. Biologic Fate of Human Arterial Homografts. *AMA Arch Surg.* 1957;75(4):506-529. doi:10.1001/archsurg.1957.01280160016003
122. Vogt PR, Stallmach T, Niederhäuser U, et al. Explanted cryopreserved allografts: A morphological and immunohistochemical comparison between arterial allografts and allograft heart valves from infants and adults. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 1999;15(5):639-645. doi:10.1016/S1010-7940(99)00053-6
123. Minga Lowampa E, Holemans C, Stiennon L, Van Damme H, Defraigne JO. Late Fate of Cryopreserved Arterial Allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016;52(5):696-702. doi:10.1016/j.ejvs.2016.08.005
124. Calafiore AM, Haverich A, Gaudino M, Mauro M Di, Fattouch K, Zilla P. Immunoreaction to xenogenic tissue in cardiac surgery : alpha-Gal and beyond. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2022;00:1-6. doi:10.1093/ejcts/ezac115.Immunoreaction
125. Caradu C, Brunet C, Spampinato B, et al. Contemporary Results with the Biosynthetic Glutaraldehyde Denatured Ovine Collagen Graft (Omniflow II) in Lower Extremity Arterial Revascularization in a Septic Context. *Ann Vasc Surg.* 2022;85:22-31. doi:10.1016/j.avsg.2022.04.011
126. Strobel R, Boontje AH, Van den Dungen JJAM. Aneurysm formation in modified human umbilical vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;11(4):417-420. doi:10.1016/S1078-5884(96)80173-0
127. Dardik H, Wengerter K, Qin 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.* 2002;35(1):64-71. doi:10.1067/mva.2002.121053
128. Neufang A, Dorweiler B, Espinola-Klein C, et al. Outcomes of complex femorodistal sequential autologous vein and biologic prosthesis composite bypass grafts. *J Vasc Surg.* 2014;60(6):1543-1553. doi:10.1016/j.jvs.2014.07.103
129. Hamedani BA, Navidbakhsh M, Tafti HA. Comparison between mechanical properties of human saphenous vein and umbilical vein. *Biomed Eng Online.* 2012;11:1-15. doi:10.1186/1475-925X-11-59
130. Haimov H, Giron F, Jacobson J. The Expanded Polytetrafluoroethylene Graft: Three Years' Experience With 362 Grafts. *Arch Surg.* 1979;114:673-677.
131. Florian A, Cohn LH, Dammin GJ, Collins JJ. Small Vessel Replacement With Gore-tex (Expanded Polytetrafluoroethylene). *Arch Surg.* 1976;111(3):267-270. doi:10.1001/archsurg.1976.01360210061011
132. Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, et al. Vascular graft prosthesis. *Ann Chir.* 2004;129(5):301-309.

doi:10.1016/j.anchir.2004.05.002

133. Heise M, Husmann I, Grüneberg A, Knobel A, Kirschner P, Heidenhain C. Comparison of straight and Venaflo-type cuffed arteriovenous ePTFE grafts in an animal study. *J Vasc Surg.* 2011;53(6):1661-1667. doi:10.1016/j.jvs.2011.01.061
134. Shemesh D, Goldin I, Hijazi J, et al. A prospective randomized study of heparin-bonded graft (Propaten) versus standard graft in prosthetic arteriovenous access. *J Vasc Surg.* 2015;62(1):115-122. doi:10.1016/j.jvs.2015.01.056
135. Lejay A, Vento V, Kuntz S, et al. Current status on vascular substitutes. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2020;61(5):538-543. doi:10.23736/S0021-9509.20.11592-1
136. Singh C, Wong CS, Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J Funct Biomater.* 2015;6(3):500-525. doi:10.3390/jfb6030500
137. Quiñones-Baldrich WJ, Moore WS, Ziomek S, Chvapil M. Development of a "leak-proof," knitted Dacron vascular prosthesis. *J Vasc Surg.* 1986;3(6):895-903. doi:10.1016/0741-5214(86)90157-6
138. Guidoin R, Marceau D, Rao TJ, et al. In vitro and in vivo characterization of an impervious polyester arterial prosthesis: the Gelseal Triaxial® graft. *Biomaterials.* 1987;8(6):433-441. doi:10.1016/0142-9612(87)90079-2
139. Marois Y, Chakfé N, Guidoin R, et al. An albumin-coated polyester arterial graft: In vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics. *Biomaterials.* 1996;17(1):3-14. doi:10.1016/0142-9612(96)80749-6
140. Brewster DC. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease. *J Vasc Surg.* 1997;25(2):365-379. doi:10.1016/S0741-5214(97)70359-8
141. van Det RJ, Vriens BHR, van der Palen J, Geelkerken RH. Dacron or ePTFE for Femoro-popliteal Above-Knee Bypass Grafting: Short- and Long-term Results of a Multicentre Randomised Trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;37(4):457-463. doi:10.1016/j.ejvs.2008.11.041
142. Almasri J, Adusumalli J, Asi N, et al. A systematic review and meta-analysis of revascularization outcomes of infrainguinal chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg.* 2018;68(2):624-633. doi:10.1016/j.jvs.2018.01.066
143. Albers M, Battistella VM, Romiti M, Eyer Rodrigues AA, Bragança Pereira CA. Meta-analysis of polytetrafluoroethylene bypass grafts to infrapopliteal arteries. *J Vasc Surg.* 2003;37(6):1263-1269. doi:10.1016/S0741-5214(02)75332-9
144. Albers M, Romiti M, Brochado-Neto FC, Pereira CAB. Meta-analysis of alternate autologous vein bypass grafts to infrapopliteal arteries. *J Vasc Surg.* 2005;42(3):449.e1-449.e8. doi:10.1016/j.jvs.2005.05.031
145. Roll S, Müller-Nordhorn J, Keil T, et al. Dacron® vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery - Systematic review and meta-analysis. *BMC Surg.* 2008;8:1-8. doi:10.1186/1471-2482-8-22
146. Lok CE, Huber TS, Lee T, et al. KDOQI clinical practice guideline for vascular access: 2019 update. *Am J Kidney Dis.* 2020;75(4):S1-S164. doi:10.1053/j.ajkd.2019.12.001
147. Morosetti M, Cipriani S, Dominijanni S, Pisani G, Frattarelli D, Bruno F. Basilic vein transposition versus biosynthetic prosthesis as vascular access for hemodialysis. *J Vasc Surg.* 2011;54(6):1713-1719. doi:10.1016/j.jvs.2011.06.030

148. Keuter XHA, De Smet AAEA, Kessels AGH, van der Sande FM, Welten RJTJ, Tordoir JHM. A randomized multicenter study of the outcome of brachial-basilic arteriovenous fistula and prosthetic brachial-antecubital forearm loop as vascular access for hemodialysis. *J Vasc Surg.* 2008;47(2):395-401. doi:10.1016/j.jvs.2007.09.063
149. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003;196(3):430-443. doi:10.1002/jcp.10333
150. Tan W, Boodagh P, Selvakumar PP, Keyser S. Strategies to counteract adverse remodeling of vascular graft : A 3D view of current graft innovations. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;10(January):1-19. doi:10.3389/fbioe.2022.1097334
151. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials.* 2007;28(34):5009-5027. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.017
152. Pennel T, Zilla P, Bezuidenhout D. Differentiating transmural from transanastomotic prosthetic graft endothelialization through an isolation loop-graft model. *J Vasc Surg.* 2013;58(4):1053-1061. doi:10.1016/j.jvs.2012.11.093
153. Pennel T, Bezuidenhout D, Koehne J, Davies NH, Zilla P. Transmural capillary ingrowth is essential for confluent vascular graft healing. *Acta Biomater.* 2018;65:237-247. doi:10.1016/j.actbio.2017.10.038
154. Rotmans JI, Heyligers JMM, Verhagen HJM, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation.* 2005;112(1):12-18. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504407
155. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood.* 2000;95(2):581-585. doi:10.1182/blood.v95.2.581
156. Li C, Hill A, Imran M. In vitro and in vivo studies of ePTFE vascular grafts treated with P15 peptide. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2005;16(7):875-891. doi:10.1163/1568562054255754
157. Fields C, Cassano A, Makhoul RG, et al. Evaluation of electrostatically endothelial cell seeded expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine femoral artery model. *J Biomater Appl.* 2002;17(2):135-152. doi:10.1106/088532802030556
158. Clagett GP, Burkel WE, Sharefkin JB, et al. Platelet reactivity in vivo in dogs with arterial prostheses seeded with endothelial cells. *Circulation.* 1984;69(3):632-639. doi:10.1161/01.CIR.69.3.632
159. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: A 9-year experience. *Surgery.* 1999;126(5):847-855. doi:10.1016/S0039-6060(99)70025-5
160. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Fröschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(5):S327-S331. doi:10.1016/S0003-4975(01)02555-3
161. Crombez M, Chevallier P, Gaudreault RC, Petitclerc E, Mantovani D, Laroche G. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials.* 2005;26(35):7402-7409. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.051
162. Gao A, Hang R, Li W, et al. Linker-free covalent immobilization of heparin, SDF-1 α , and CD47 on PTFE surface for antithrombogenicity, endothelialization and anti-inflammation.

- Biomaterials*. 2017;140:201-211. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.023
163. Yu C, Yang H, Wang L, Thomson JA, Turng LS, Guan G. Surface Modification of Polytetrafluoroethylene (PTFE) with a Heparin-immobilized Extracellular Matrix (ECM) Coating for Small-diameter Vascular Grafts Applications. *Mater Sci Eng C*. 2021;128:1-36. doi:10.1016/j.msec.2021.112301
 164. De Visscher G, Mesure L, Meuris B, Ivanova A, Flameng W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 α . *Acta Biomater*. 2012;8(3):1330-1338. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.016
 165. Samson RH, Morales R, Showalter DP, Lepore MR, Nair DG. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison. *J Vasc Surg*. 2016;64(3):638-647. doi:10.1016/j.jvs.2016.03.414
 166. Villemoes MK, Lindholt JS, Houliand KC, et al. Cost-Effectiveness Evaluation of Heparin Coated Versus Standard Graft for Bypass Surgery in Peripheral Artery Disease Alongside a Randomised Controlled Trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018;56(1):87-93. doi:10.1016/j.ejvs.2018.03.012
 167. Gupta BS, Kasyanov VA. Biomechanics of human common carotid artery and design of novel hybrid textile compliant vascular grafts. *J Biomed Mater Res*. 1997;34(3):341-349. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19970305)34:3<341::AID-JBM9>3.0.CO;2-K
 168. Bachleda P, Kalinova L, Utikal P, Kolar M, Hricova K, Stosova T. Infected prosthetic dialysis arteriovenous grafts: A single dialysis center study. *Surg Infect (Larchmt)*. 2012;13(6):366-370. doi:10.1089/sur.2011.041
 169. Minga TE, Flanagan KH, Allon M. Clinical consequences of infected arteriovenous grafts in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2001;38(5):975-978. doi:10.1053/ajkd.2001.28583
 170. Oliver MJ, McCann RL, Indridason OS, Butterly DW, Schwab SJ. Comparison of transposed brachiobasilic fistulas to upper arm grafts and brachiocephalic fistulas. *Kidney Int*. 2001;60(4):1532-1539. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00956.x
 171. Wang J, Blalock SKF, Levitan GS, Prichard HL, Niklason LE, Kirkton RD. Biological mechanisms of infection resistance in tissue engineered blood vessels compared to synthetic expanded polytetrafluoroethylene grafts. *JVS-Vascular Sci*. 2023;4. doi:10.1016/j.jvssci.2023.100120
 172. Molacek J, Treska V, Houdek K, Opatrný V, Certik B, Baxa J. Use of a Silver-Impregnated Vascular Graft: Single-Center Experience. *Antibiotics*. 2022;11(3):1-9. doi:10.3390/antibiotics11030386
 173. Mufty H, Van den Eynde J, Steenackers HP, Metsemakers WJ, Meuris B, Fourneau I. A systematic review of preclinical data regarding commercial silver-coated vascular grafts. *J Vasc Surg*. 2021;74(4):1386-1393.e1. doi:10.1016/j.jvs.2021.04.055
 174. Murugan D, Rangasamy L. The use of antimicrobial biomaterials as a savior from post-operative vascular graft-related infections: A review. *Results Eng*. 2022;16(September):100662. doi:10.1016/j.rineng.2022.100662
 175. Lazic I, Obermeier A, Dietmair B, et al. Treatment of vascular graft infections: gentamicin-coated ePTFE grafts reveals strong antibacterial properties in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2022;33(3). doi:10.1007/s10856-022-06650-x
 176. Haverich A, Hirt S, Karck M, Siclari F, Wahlig H. Prevention of graft infection by bonding of

- gentamycin to Dacron prostheses. *J Vasc Surg.* 1992;15(1):187-193. doi:10.1016/0741-5214(92)70027-I
177. Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, Seifalian AM. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg.* 2000;87:1516-1524.
 178. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004;40(1):146-153. doi:10.1016/j.jvs.2004.03.033
 179. Konig G, McAllister TN, Dusserre N, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials.* 2009;30(8):1542-1550. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.011.Mechanical
 180. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1137-1142. doi:10.1089/ten.2006.12.1137
 181. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, et al. Engineering complex tissues. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3307-3339. doi:10.1089/ten.2006.12.3307
 182. Weinberg CB, Bell E. A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. *Science (80-).* 1986;231:397-400.
 183. Li S, Sengupta D, Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *WIREs Syst Biol Med.* 2014;6(1):61-76. doi:10.1002/wsbm.1246
 184. Geelhoed WJ, Moroni L, Rotmans JI. Utilizing the Foreign Body Response to Grow Tissue Engineered Blood Vessels in Vivo. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;(10):167-179. doi:10.1007/s12265-017-9731-7
 185. L'Heureux N, Germain L, Labbé R, Auger FA. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study. *J Vasc Surg.* 1993;17(3):499-509. doi:10.1016/0741-5214(93)90150-K
 186. Hirai J, Matsuda T. Self-organized, tubular hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen for low-pressure-loaded venous system. *Cell Transplant.* 1995;4(6):597-608. doi:10.1016/0963-6897(95)00029-W
 187. Hirai J, Matsuda T. Venous Reconstruction Using Hybrid Vascular Tissue Composed of Vascular Cells and Collagen: Tissue Regeneration Process. *Cell Transplant.* 1996;5(1):93-105.
 188. Berglund JD, Nerem RM, Sambanis A. Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1526-1535. doi:10.1089/ten.2004.10.1526
 189. 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. doi:10.1096/fsb2fasebj.12.1.47
 190. L'HEUREUX N, STOCLET J, AUGER FA, LAGAUD GJ, GERMAIN L, ANDRIANTSLOHAINA R. A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB J.* 2001;15(2):515-524. doi:10.1096/fj.00-0283com
 191. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med.* 2006;12(3):361-365. doi:10.1038/nm1364
 192. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-Engineered Blood Vessel for Adult Arterial Revascularization. *N Engl J Med.* 2007;357(14):1451-1453. doi:10.1056/nejmc071536
 193. Garrido SA, McAllister T, Dusserre N, Marini A, L'Heureux N. Haemodialysis access via tissue-

- engineered vascular graft - Authors' reply. *Lancet*. 2009;374(9685):201. doi:10.1016/S0140-6736(09)61330-1
194. Magnan L, Labrunie G, Marais S, et al. Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process. *Acta Biomater*. 2018;82:56-67. doi:10.1016/j.actbio.2018.10.006
195. L'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. Technology Insight: The evolution of tissue-engineered vascular grafts - From research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(7):389-395. doi:10.1038/ncpcardio0930
196. McAllister TN, Audley D, L'Heureux N. Autologous cell therapies: Challenges in US FDA regulation. *Regen Med*. 2012;7(6 SUPPL.):94-97. doi:10.2217/rme.12.83
197. L'Heureux N, McAllister T. The Future of Cell-Based Vascular Grafts for Hemodialysis Access. *Endovascular Today*. 2013:76-78.
198. Branchet MC, Boisnic S, Blétry O, Robert L, Charron D, Francès D. Expression of HLA class II antigens on skin fibroblasts in scleroderma. *Br J Dermatol*. 1992;126(5):431-435. doi:10.1111/j.1365-2133.1992.tb11814.x
199. Kern A, Liu K, Mansbridge J. Modification of fibroblast γ -interferon responses by extracellular matrix. *J Invest Dermatol*. 2001;117(1):112-118. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01386.x
200. Grémare A, Thibes L, Gluais M, et al. Development of a vascular substitute produced by weaving yarn made from human amniotic membrane. *Biofabrication*. 2022;14(4). doi:10.1088/1758-5090/ac84ae
201. Magnan L, Labrunie G, Fénelon M, et al. Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly "bio" material for tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2020;105:111-120. doi:10.1016/j.actbio.2020.01.037
202. Torres Y, Gluais M, Silva N Da, et al. Cell-assembled extracellular matrix (CAM) sheet production : Translation from using human to large animal cells. *J Tissue Eng*. 2021;12:1-14. doi:10.1177/2041731420978327
203. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;288:1451-1460. doi:10.1152/ajpheart.00479.2004
204. Wozniak G. Fibrin sealants in supporting surgical techniques: The importance of individual components. *Cardiovasc Surg*. 2003;11(SUPPL. 1):17-21. doi:10.1016/S0967-2109(03)00067-X
205. Helms F, Lau S, Aper T, et al. A 3-Layered Bioartificial Blood Vessel with Physiological Wall Architecture Generated by Mechanical Stimulation. *Ann Biomed Eng*. 2021;49(9):2066-2079. doi:10.1007/s10439-021-02728-9
206. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW, Lee A, Tranquillo RT. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials*. 2011;32(3):714-722. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.019
207. 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*. 2014;20(11-12):1726-1734. doi:10.1089/ten.tea.2013.0550
208. Meier LA, Syedain ZH, Lahti MT, et al. Blood Outgrowth Endothelial Cells Alter Remodeling of Completely Biological Engineered Grafts Implanted into the Sheep Femoral Artery. *J*

Cardiovasc Transl Res. 2014;7(2):242-249. doi:10.1007/s12265-013-9539-z.Blood

209. 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.* 2016;7:1-9. doi:10.1038/ncomms12951
210. Ebner A, Gallo S, Castellano J, et al. First-in-human evaluation of a biological regenerative vascular conduit for hemodialysis access. *J Vasc Access.* Published online 2023. doi:10.1177/11297298221147709
211. Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, et al. Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials.* 2010;31(17):4731-4739. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.051
212. Mohapatra SR, Rama E, Melcher C, et al. From In Vitro to Perioperative Vascular Tissue Engineering: Shortening Production Time by Traceable Textile-Reinforcement. *Tissue Eng Regen Med.* 2022;19(6):1169-1184. doi:10.1007/s13770-022-00482-0
213. Rama E, Mohapatra SR, Melcher C, et al. Monitoring the Remodeling of Biohybrid Tissue-Engineered Vascular Grafts by Multimodal Molecular Imaging. *Adv Sci.* 2022;9(10):1-15. doi:10.1002/adv.202105783
214. Woods I, Black A, Molloy EJ, Jockenhoevel S, Flanagan TC. Fabrication of blood-derived elastogenic vascular grafts using electrospun fibrinogen and polycaprolactone composite scaffolds for paediatric applications. *J Tissue Eng Regen Med.* 2020;14(9):1281-1295. doi:10.1002/term.3100
215. Hoerstrup SP, Cummings I, Lachat M, et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: Follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation.* 2006;114:159-166. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001172
216. Cummings I, George S, Kelm J, et al. Tissue-engineered vascular graft remodeling in a growing lamb model : expression of matrix metalloproteinases. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2012;41(1):167-172. doi:10.1016/j.ejcts.2011.02.077
217. Generali M, Casanova EA, Kehl D, et al. Autologous endothelialized small-caliber vascular grafts engineered from blood-derived induced pluripotent stem cells. *Acta Biomater.* 2019;97:333-343. doi:10.1016/j.actbio.2019.07.032
218. Silva M, Daheron L, Hurley H, et al. Generating iPSCs: Translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies. *Cell Stem Cell.* 2015;16(1):13-17. doi:10.1016/j.stem.2014.12.013
219. Soletti L, Hong Y, Guan J, et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomater.* 2010;6(1):110-122. doi:10.1016/j.actbio.2009.06.026
220. Soletti L, Nieponice A, Hong Y, et al. In vivo performance of a phospholipid-coated bioerodable elastomeric graft for small-diameter vascular applications. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2011;96 A(2):436-448. doi:10.1002/jbm.a.32997
221. Nieponice A, Soletti L, Guan J, 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.* 2010;16(4):1215-1223. doi:10.1089/ten.tea.2009.0427
222. He W, Nieponice A, Soletti L, et al. Pericyte-based human tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2010;31(32):8235-8244. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.034
223. Haskett DG, Saleh KS, Lorentz KL, et al. An exploratory study on the preparation and

- evaluation of a “ same-day ” adipose stem cell – based tissue-engineered vascular graft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;156(5):1814-1822.e3. doi:10.1016/j.jtcvs.2018.05.120
224. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional Arteries Grown in Vitro. *Science (80-)*. 1999;284(April):489-493.
225. McKee JA, Banik SSR, Boyer MJ, et al. Human arteries engineered in vitro. *EMBO Rep.* 2003;4(6):633-638. doi:10.1038/sj.embor.embor847
226. Poh M, Boyer M, Solan A, et al. Blood Vessels Engineered from Human Cells. *Lancet.* 2005;365(9477):2122-2124. doi:10.1016/j.tcm.2006.02.006
227. Dahl SLM, Blum JL, Niklason LE. Bioengineered Vascular Grafts: Can We Make Them Off-the-Shelf? *Trends Cardiovasc Med.* 2011;21(3):83-89. doi:10.1016/j.tcm.2012.03.004
228. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(22):9214-9219. doi:10.1073/pnas.1019506108
229. Dahl SLM, Kypson AP, Lawson JH, et al. Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Sci Transl Med.* 2011;3(68). doi:10.1126/scitranslmed.3001426
230. Prichard HL, Manson RJ, DiBernardo L, Niklason LE, Lawson JH, Dahl SLM. An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(5):674-682. doi:10.1007/s12265-011-9306-y
231. Dimitrievska S, Wang J, Lin T, et al. Glycocalyx-Like Hydrogel Coatings for Small Diameter Vascular Grafts. *Adv Funct Mater.* 2020;30(23):1-14. doi:10.1002/adfm.201908963
232. Lawson JH, Glickman MH, Ilzecki M, et al. Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: Two phase 2 single-arm trials. *Lancet.* 2016;387(10032):2026-2034. doi:10.1016/S0140-6736(16)00557-2
233. Kirkton RD, Santiago-Maysonet M, Lawson JH, et al. Bioengineered human acellular vessels recellularize and evolve into living blood vessels after human implantation. *Sci Transl Med.* 2019;11:1-11.
234. Jakimowicz T, Przywara S, Turek J, et al. Five Year Outcomes in Patients with End Stage Renal Disease Who Received a Bioengineered Human Acellular Vessel for Dialysis Access. *EJVES Vasc Forum.* 2022;54:58-63. doi:10.1016/j.ejvsf.2022.01.003
235. Gutowski P, Gage SM, Guziewicz M, Ilzecki M. Arterial reconstruction with human bioengineered acellular blood vessels in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2020;72(4):1247-1258. doi:10.1016/j.jvs.2019.11.056
236. Gui L, Dash B, Luo J, et al. Implantable Tissue-Engineered Blood Vessels from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomaterials.* 2016;102:120-129. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.06.010.Implantable
237. Luo J, Qin L, Zhao L, Dardik A, Niklason LE, Qyang Y. Tissue-Engineered Vascular Grafts with Advanced Mechanical Strength from Human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2020;26(2):251-261. doi:10.1016/j.stem.2019.12.012
238. Niklason LE, Lawson JH. Bioengineered human blood vessels. *Science (80-)*. 2020;370(6513). doi:10.1126/science.aaw8682
239. Rothuizen TC, Damanik FFR, Anderson JM, et al. Tailoring the foreign body response for in situ vascular tissue engineering. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2014;21(5):1-33.

240. Sparks CH. Autogenous Grafts Made to Order. *Ann Thorac Surg*. 1969;8(2):104-113. doi:10.1016/S0003-4975(10)66217-0
241. Sparks CH. Die-Grown Reinforced Arterial Grafts: Observations on Long-term Animal Grafts and Clinical Experience. *Ann Surg*. 1970;172(5).
242. Guidoin R, Noël HP, Marois M, et al. Another look at the Sparks-mandrill arterial graft precursor for vascular repair. *Biomater Med Devices Artif Organs*. 1980;8(2):145-167.
243. Hallin RW, Sweetman WR. The Sparks' Mandril Graft - A Seven Year Follow-Up of Mandril Grafts Placed by Charles H. Sparks and His Associates. *Am J Surg*. 1976;132(2):221-223.
244. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity. *Circ Res*. 1999;85(12):1173-1178. doi:10.1161/01.RES.85.12.1173
245. Chue WL, Campbell GR, Caplice N, et al. Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *J Vasc Surg*. 2004;39(4):859-867. doi:10.1016/j.jvs.2003.03.003
246. Nakayama Y, Furukoshi M, Terazawa T, Iwai R. Development of long in vivo tissue-engineered "Biotube" vascular grafts. *Biomaterials*. 2018;185:232-239. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.032
247. Furukoshi M, Tatsumi E, Nakayama Y. Application of in-body tissue architecture–induced Biotube vascular grafts for vascular access: Proof of concept in a beagle dog model. *J Vasc Access*. 2020;21(3):314-321. doi:10.1177/1129729819874318
248. Nakayama Y, Furukoshi M. Feasibility of In-body Tissue Architecture (IBTA) in Pediatric Cardiovascular Surgery: Development of Regenerative Autologous Tissues with Growth Potential. *Pediatr Cardiol Card Surg*. 2016;32(3):199-207. doi:10.9794/jspccs.32.199
249. Nakayama Y, Kaneko Y, Takewa Y, Okumura N. Mechanical properties of human autologous tubular connective tissues (human biotubes) obtained from patients undergoing peritoneal dialysis. *J Biomed Mater Res - Part B*. Published online 2016:1431-1437. doi:10.1002/jbm.b.33495
250. Nakayama Y, Kaneko Y, Okumura N, Terazawa T. Initial 3-year results of first human use of an in-body tissue-engineered autologous "Biotube" vascular graft for hemodialysis. *J Vasc Access*. 2020;21(1):110-115. doi:10.1177/1129729819852550
251. Rothuizen TC, Damanik FFR, Lavrijsen T, et al. Development and evaluation of in vivo tissue engineered blood vessels in a porcine model. *Biomaterials*. 2016;75:82-90. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.023
252. Damanik FFR, Rothuizen TC, Blitterswijk C Van, 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*. 2014;4:1-11. doi:10.1038/srep06325
253. Qiu X, Lee BLP, Wong SY, et al. Cellular remodeling of fibrotic conduit as vascular graft. *Biomaterials*. 2021;268:120565. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120565
254. Aussel A, Montembault A, Malaise S, et al. In Vitro Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017;10(5-6):480-488. doi:10.1007/s12265-017-9763-z
255. Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, et al. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: In vitro and in vivo evaluation. *Biomed Mater*. 2017;12(6). doi:10.1088/1748-605X/aa78d0

256. Aussel A, Boiziau C, L'Azou B, et al. Cell and tissue responses at the interface with a chitosan hydrogel intended for vascular applications: in vitro and in vivo exploration. *Biomed Mater.* 2019;14(2). doi:10.1088/1748-605X/aafbf0
257. Gupta P, Mandal BB. Silk biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2021;134:79-106. doi:10.1016/j.actbio.2021.08.004
258. Kiritani S, Kaneko J, Ito D, et al. Silk fibroin vascular graft: a promising tissue-engineered scaffold material for abdominal venous system replacement. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-78020-y
259. Koens MJW, Hendriks T, Praster R, Daamen WF. Vascular replacement using a layered elastin-collagen vascular graft in a porcine model: One week patency versus one month occlusion. *Organogenesis.* 2015;11(3):105-121. doi:10.1080/15476278.2015.1038448
260. Daamen WF, Hafmans T, Veerkamp JH, Van Kuppevelt TH. Isolation of intact elastin fibers devoid of microfibrils. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1168-1176. doi:10.1089/ten.2005.11.1168
261. Goldstein JD, Tria AJ, Zawadsky JP, Kato YP, Christiansen D, Silver FH. Development of a reconstituted collagen tendon prosthesis. A preliminary implantation study. *J Bone Jt Surg.* 1989;71(8):1183-1191.
262. Law JK, Parsons JR, Silver FH, Weiss AB. An evaluation of purified reconstituted type I collagen fibers. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(9):961-977. doi:10.1002/jbm.820230902
263. Generali M, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Bioresorbable Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering. *EMJ Interv Cardiol.* 2014;1(July):91-99. <http://emjreviews.com/wp-content/uploads/Bioresorbable-Scaffolds-For-Cardiovascular-Tissue-Engineering.pdf>
264. Hasan A, Memic A, Annabi N, et al. Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering of Vascular Grafts. *Acta Biomater.* 2014;10(1). doi:10.1016/j.actbio.2013.08.022.Electrospun
265. Wang Z, Mithieux SM, Weiss AS. Fabrication Techniques for Vascular and Vascularized Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(19):1-26. doi:10.1002/adhm.201900742
266. Ong CS, Zhou X, Huang CY, Fukunishi T, Zhang H, Hibino N. Tissue engineered vascular grafts: current state of the field. *Expert Rev Med Devices.* 2017;14(5):383-392. doi:10.1080/17434440.2017.1324293
267. Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, et al. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115(3):536-546. doi:10.1016/S0022-5223(98)70315-0
268. Shinoka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery. *New Engl J Med.* 2001;344(7):532-533. doi:10.1007/s003800200026
269. Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, et al. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129(6). doi:10.1016/j.jtcvs.2004.12.047
270. Yokota T, Ichikawa H, Matsumiya G, et al. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;136(4):900-907. doi:10.1016/j.jtcvs.2008.02.058
271. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, et al. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(2):431-436. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.09.057

272. Roh JD, Sawh-Martinez R, Brennan MP, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(10):4669-4674. doi:10.1073/pnas.0911465107
273. Naito Y, Lee YU, Yi T, et al. Beyond burst pressure: Initial evaluation of the natural history of the biaxial mechanical properties of tissue-engineered vascular grafts in the venous circulation using a murine model. *Tissue Eng - Part A*. 2014;20(1-2):346-355. doi:10.1089/ten.tea.2012.0613
274. Mirhaidari GJM, Barker JC, Breuer CK, Reinhardt JW, Surgery R. Implanted tissue engineered vascular graft cell isolation with single-cell RNA sequencing analysis. *Tissue Eng - Part C Methods*. Published online 2023:1-34. doi:10.1089/ten.TEC.2022.0189
275. Fukunishi T, A. Best C, Sugiura T, et al. Preclinical study of patient-specific cell-free nanofiber tissue-engineered vascular grafts using 3-dimensional printing in a sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;153(4):924-932. doi:10.1016/j.jtcvs.2016.10.066.Preclinical
276. Ong CS, Fukunishi T, Liu RH, et al. Bilateral Arteriovenous Shunts as a Method for Evaluating Tissue-Engineered Vascular Grafts in Large Animal Models. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2017;23(11):728-735. doi:10.1089/ten.tec.2017.0217
277. Sugiura T, Agarwal R, Tara S, et al. Tropoelastin inhibits intimal hyperplasia of mouse bioresorbable arterial vascular grafts. *Acta Biomater*. 2017;52:74-80. doi:10.1016/j.actbio.2016.12.044
278. Sugiura T, Matsumura G, Miyamoto S, Miyachi H, Breuer CK, Shinoka T. Tissue-engineered Vascular Grafts in Children With Congenital Heart Disease: Intermediate Term Follow-up. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;30(2):175-179. doi:10.1053/j.semtcvs.2018.02.002
279. Fukunishi T, Ong CS, Yesantharao P, et al. Different degradation rates of nanofiber vascular grafts in small and large animal models. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(2):203-214. doi:10.1002/term.2977
280. Drews JD, Pepper VK, Best CA, et al. Spontaneous reversal of stenosis in tissue-engineered vascular grafts. *Sci Transl Med*. 2020;12(537):1-14. doi:10.1126/scitranslmed.aax6919
281. Schwarz EL, Kelly JM, Blum KM, et al. Hemodynamic performance of tissue-engineered vascular grafts in Fontan patients. *npj Regen Med*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41536-021-00148-w
282. Blum KM, Zbinden JC, Ramachandra AB, et al. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth. *Commun Med*. 2022;2(1):1-21. doi:10.1038/s43856-021-00063-7
283. Best CA, Szafron JM, Rocco KA, et al. Differential outcomes of venous and arterial tissue engineered vascular grafts highlight the importance of coupling long-term implantation studies with computational modeling. *Acta Biomater*. 2019;94:183-194. doi:10.1016/j.actbio.2019.05.063
284. Matsuzaki Y, Iwaki R, Reinhardt JW, et al. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model. *Acta Biomater*. 2020;115:176-184. doi:10.1016/j.actbio.2020.08.011
285. Matsushita H, Inoue T, Abdollahi S, et al. Corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent kinking for arteriovenous shunts in an ovine model. *J Vasc Surg*. 2020;1:100-108. doi:10.1016/j.jvssci.2020.03.003

286. Fukunishi T, Best CA, Sugiura T, et al. Tissue-engineered small diameter arterial vascular grafts from cell-free nanofiber PCL/chitosan scaffolds in a sheep model. *PLoS One*. 2016;11(7):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0158555
287. Elliott MB, Ginn B, Fukunishi T, et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *PNAS*. 2019;116(26):12710-12719. doi:10.1073/pnas.1905966116
288. Elliott MB, Matsushita H, Shen J, et al. Off-the-shelf, heparinized small diameter vascular graft limits acute thrombogenicity in a porcine model. *Acta Biomater*. Published online 2022. doi:10.1016/j.actbio.2022.07.061
289. Antonova L V., Krivkina EO, Sevostianova V V., et al. Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model. *Polymers (Basel)*. 2021;13(16). doi:10.3390/polym13162637
290. Oliveira S, Felizardo T, Amorim S, et al. Tubular Fibrous Scaffolds Functionalized with Tropoelastin as a Small-Diameter Vascular Graft. *Biomacromolecules*. 2020;21(9):3582-3595. doi:10.1021/acs.biomac.0c00599
291. Fu J, Wang M, De Vlaminck I, Wang Y. Thick PCL Fibers Improving Host Remodeling of PGS-PCL Composite Grafts Implanted in Rat Common Carotid Arteries. *Small*. 2020;16(52):1-15. doi:10.1002/sml.202004133
292. Bellani CFF, Yue K, Flaig F, et al. Suturable elastomeric tubular grafts with patterned porosity for rapid vascularization of 3D constructs. *Biofabrication*. 2021;13(3). doi:10.1088/1758-5090/abdf1d
293. Zbinden JC, Blum KM, Berman AG, et al. Effects of Braiding Parameters on Tissue Engineered Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(24). doi:10.1002/adhm.202001093
294. Fukunishi T, Ong CS, Lui C, et al. Formation of Neoarteries with Optimal Remodeling Using Rapidly Degrading Textile Vascular Grafts. *Tissue Eng - Part A*. 2019;25(7-8):632-641. doi:10.1089/ten.tea.2018.0167
295. Matsushita H, Hayashi H, Nurminsky K, et al. Novel reinforcement of corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent aneurysm formation for arteriovenous shunts in an ovine model. *J Vasc Surg*. 2022;3:182-191. doi:10.1016/j.jvssci.2022.01.002
296. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 2007;28(25):3587-3593. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.043
297. Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(9):2665-2676. doi:10.1089/ten.tea.2008.0526
298. Narita Y, Kagami H, Matsunuma H, Murase Y, Ueda M, Ueda Y. Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *J Artif Organs*. 2008;11(2):91-99. doi:10.1007/s10047-008-0407-6
299. Lopera Higuera M, Griffiths LG. Small Diameter Xenogeneic Extracellular Matrix Scaffolds for Vascular Applications. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2020;26(1):26-45. doi:10.1089/ten.teb.2019.0229
300. Kimicata M, Swamykumar P, Fisher JP. Extracellular matrix for small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng - Part A*. 2020;26(23-24):1388-1401. doi:10.1089/ten.tea.2020.0201
301. Badylak SF, Coffey AC, Lantz GC, Tacker WA, Geddes LA. Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial

- prostheses in a dog model. *J Vasc Surg*. 1994;19(3):465-472. doi:10.1016/S0741-5214(94)70073-7
302. Shell DH, Croce MA, Cagiannos C, et al. Comparison of small-intestinal submucosa and expanded polytetrafluoroethylene as a vascular conduit in the presence of gram-positive contamination. *Ann Surg*. 2005;241(6):995-1004. doi:10.1097/01.sla.0000165186.79097.6c
303. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*. 1989;47(1):74-80. doi:10.1016/0022-4804(89)90050-4
304. Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Sandusky GE. Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. *J Surg Res*. 1992;53(2):175-181. doi:10.1016/0022-4804(92)90031-T
305. Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Blevins WE. Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog. *J Investig Surg*. 1990;3(3):217-227. doi:10.3109/08941939009140351
306. Sandusky GE, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G. Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am J Pathol*. 1992;140(2):317-324.
307. Row S, Peng H, Schlaich E, Andreadis S, Swartz D. Arterial grafts exhibiting unprecedented cellular infiltration and remodeling in vivo: the role of cells in the vascular wall. *Biomaterials*. 2015;50. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.045.Arterial
308. 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*. 2011;195(1-2):108-121. doi:10.1159/000331415
309. Smith RJ, Yi T, Nasiri B, Breuer CK, Andreadis ST. Implantation of VEGF-functionalized cell-free vascular grafts: regenerative and immunological response. *FASEB J*. 2019;33(4):5089-5100. doi:10.1096/fj.201801856R
310. Smith RJ, Nasiri B, Kann J, et al. Endothelialization of arterial vascular grafts by circulating monocytes. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-15361-2
311. Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J Vasc Surg*. 2012;56(4):1098-1104. doi:10.1016/j.jvs.2012.02.036
312. Amensag S, Goldberg L, O'Malley K, Rush D, Berceli S, McFetridge P. Pilot assessment of a human extracellular matrix based vascular graft in a rabbit model. *J Vasc Surg*. 2017;65(3):839-847. doi:10.1016/j.jvs.2016.02.046.PILOT
313. Lopera Higueta M, Griffiths LG. Antigen removal process preserves function of small diameter venous valved conduits, whereas SDS-decellularization results in significant valvular insufficiency. *Acta Biomater*. 2020;107:115-128. doi:10.1016/j.actbio.2020.03.003
314. Lopera Higueta M, Lopera Giraldo JF, Sarrafian TL, Griffiths LG. Tissue engineered bovine saphenous vein extracellular matrix scaffolds produced via antigen removal achieve high in vivo patency rates. *Acta Biomater*. 2021;134:144-159. doi:10.1016/j.actbio.2021.06.034
315. Lopera Higueta M, Shortreed NA, Dasari S, Griffiths LG. Basement Membrane of Tissue Engineered Extracellular Matrix Scaffolds Modulates Rapid Human Endothelial Cell Recellularization and Promote Quiescent Behavior After Monolayer Formation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10(August):1-15. doi:10.3389/fbioe.2022.903907

316. Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez J V., et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1241-1248. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.017
317. Byrom MJ, Bannon PG, White GH, Ng MKC. Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *J Vasc Surg.* 2010;52(1):176-195. doi:10.1016/j.jvs.2009.10.080
318. Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(5):916-925. doi:10.1016/j.copbio.2013.05.005
319. Koch SE, de Kort BJ, Holshuijsen N, et al. Animal studies for the evaluation of in situ tissue-engineered vascular grafts — a systematic review, evidence map, and meta-analysis. *npj Regen Med.* 2022;7(1). doi:10.1038/s41536-022-00211-0
320. Liu RH, Ong CS, Fukunishi T, Ong K, Hibino N. Review of Vascular Graft Studies in Large Animal Models. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2018;24(2):133-143. doi:10.1089/ten.teb.2017.0350
321. Rotmans JI. Animal Models for Studying Pathophysiology of Hemodialysis Access. *Open Urol Nephrol J.* 2014;7(1):14-21. doi:10.2174/1874303x01407010014
322. Kokozidou M, Katsargyris A, Verhoeven ELG, Schulze-Tanzil G. Vascular access animal models used in research. *Ann Anat.* 2019;225:65-75. doi:10.1016/j.aanat.2019.06.002
323. Kohler TR, Kirkman TR. Dialysis access failure: A sheep model of rapid stenosis. *J Vasc Surg.* 1999;30(4):744-751. doi:10.1016/S0741-5214(99)70114-X
324. Rotmans JI, Velema E, Verhagen HJM, et al. Rapid, arteriovenous graft failure due to intimal hyperplasia: A porcine, bilateral, carotid arteriovenous graft model. *J Surg Res.* 2003;113(1):161-171. doi:10.1016/S0022-4804(03)00228-2
325. Koenneker S, Teebken OE, Bonehie M, et al. A Biological Alternative to Alloplastic Grafts in Dialysis Therapy : Evaluation of an Autologised Bioartificial Haemodialysis Shunt Vessel in a Sheep Model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;40(6):810-816. doi:10.1016/j.ejvs.2010.04.023
326. Tillman BW, Yazdani SK, Neff LP, et al. Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. *J Vasc Surg.* 2012;56(3):783-793. doi:10.1016/j.jvs.2012.02.030
327. Riboldi SA, Tozzi M, Bagardi M, et al. A Novel Hybrid Silk Fibroin/Polyurethane Arteriovenous Graft for Hemodialysis: Proof-of-Concept Animal Study in an Ovine Model. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(20):1-11. doi:10.1002/adhm.202000794
328. Badero O, Salifu M, Wasse H, Work J. Frequency of Swing-Segment Stenosis in Referred Dialysis Patients With Angiographically Documented Lesions. *Am J Kidney Dis.* 2008;51(1):93-98. doi:10.1053/j.ajkd.2007.09.012.Frequency
329. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
330. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2014;5. doi:10.1177/2041731414557112
331. Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* 2019;286(15):2830-2869. doi:10.1111/febs.14818
332. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(24):4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820

333. Kostourou V, Papalazarou V. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2403-2413. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.018
334. Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*. 1993;7(9):737-743. doi:10.1096/fasebj.7.9.8330681
335. Engel J, Chiquet M. An Overview of Extracellular Matrix Structure and Function. In: Mecham RP, ed. *The Extracellular Matrix: An Overview*. Springer; 2011. www.springer.com/series/8422
336. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: From structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):237-246. doi:10.1007/s00441-009-0821-y
337. De Jaeger C, Cherin P. Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. *Med Longevite*. 2012;4(1):41-53. doi:10.1016/j.mlong.2012.02.002
338. Culav EM, Clark CH, Merrilees M. Connective Tissues : Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. *Phys Ther*. 1999;79(3):308-319.
339. Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican Degradation and Vascular Disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16(6):209-215. doi:10.1016/j.tcm.2006.03.011
340. Wight TN, Lara S, Riessen R, Le Baron R, Isner J. Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol*. 1997;151(4):963-973.
341. Keire PA, L'Heureux N, Vernon RB, et al. Expression of versican isoform V3 in the absence of ascorbate improves elastogenesis in engineered vascular constructs. *Tissue Eng - Part A*. 2010;16(2):501-512. doi:10.1089/ten.tea.2009.0129
342. Wess TJ. Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies. In: Fratzl P, ed. *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer; 2008.
343. Exposito JY, Valcourt U, Cluzel C, Lethias C. The Fibrillar Collagen Family. *Int J Mol Sci*. 2010;11(2):407-426. doi:10.3390/ijms11020407
344. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531-1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002
345. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater*. 2019;31(1). doi:10.1002/adma.201801651
346. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:403-434. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002155
347. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2016;14(3):438-448. doi:10.1111/jth.13249
348. Xu J, Shi GP. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(11):2106-2119. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.008
349. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):247-257. doi:10.1007/s00441-009-0844-4.Collagens
350. Vindin H, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin architecture. *Matrix Biol*. 2019;84:4-16. doi:10.1016/j.matbio.2019.07.005
351. Muiznieks LD, Weiss AS, Keeley FW. Structural disorder and dynamics of elastin. *Biochem Cell Biol*. 2010;88(2):239-250. doi:10.1139/O09-161

352. Wang R, Ozsvar J, Yeo GC, Weiss AS. Hierarchical assembly of elastin materials. *Curr Opin Chem Eng*. 2019;24:54-60. doi:10.1016/j.coche.2019.01.004
353. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2007;81(4):229-240. doi:10.1002/bdrc.20111
354. Halabi CM, Mecham RP. Elastin purification and solubilization. In: *Methods in Cell Biology*. Vol 143. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018:207-222. doi:10.1016/bs.mcb.2017.08.012
355. Starcher BC, Galione MJ. Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal Biochem*. 1976;74(2):441-447. doi:10.1016/0003-2697(76)90224-4
356. Mecham RP. Methods in Elastic Tissue Biology: Elastin Isolation and Purification. *Methods*. 2008;45(1):32-41.
357. Kozel BA, Ciliberto CH, Mecham RP. Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells. *Matrix Biol*. 2004;23(1):23-34. doi:10.1016/j.matbio.2004.02.004
358. Yeo GC, Mithieux SM, Weiss AS. The elastin matrix in tissue engineering and regeneration. *Curr Opin Biomed Eng*. 2018;6:27-32. doi:10.1016/j.cobme.2018.02.007
359. Miranda-Nieves D, Chaikof EL. Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(5):694-711. doi:10.1021/acsbomaterials.6b00250
360. Nivison-Smith L, Weiss A. Elastin Based Constructs. In: Eberli D, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. ; 2011. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
361. Al Halawani A, Abdulkhalek L, Mithieux SM, Weiss AS. Tropoelastin promotes the formation of dense, interconnected endothelial networks. *Biomolecules*. 2021;11(9):1-12. doi:10.3390/biom11091318
362. Almeida-González FR, González-Vázquez A, Mithieux SM, O'Brien FJ, Weiss AS, Brougham CM. A step closer to elastogenesis on demand; Inducing mature elastic fibre deposition in a natural biomaterial scaffold. *Mater Sci Eng C*. 2021;120(December 2020). doi:10.1016/j.msec.2020.111788
363. Mithieux SM, Weiss AS. Design of an elastin-layered dermal regeneration template. *Acta Biomater*. 2017;52:33-40. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.054
364. Nettles DL, Kitaoka K, Hanson NA, et al. In situ crosslinking elastin-like polypeptide gels for application to articular cartilage repair in a goat osteochondral defect model. *Tissue Eng - Part A*. 2008;14(7):1133-1140. doi:10.1089/ten.tea.2007.0245
365. Annabi N, Mithieux S, Camci-Unal G, Dokmeci M, Weiss AS, Khademhosseini A. Elastomeric Recombinant Protein-based Biomaterials. *Biochem Eng J*. 2013;77:110-118. doi:10.1016/j.bej.2013.05.006.Elastomeric
366. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1):1-13. doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013
367. Hussey GS, Dziki JL, Badylak SF. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat Rev Mater*. 2018;3(7):159-173. doi:10.1038/s41578-018-0023-x
368. García-García A, Martín I. Extracellular Matrices to Modulate the Innate Immune Response

- and Enhance Bone Healing. *Front Immunol.* 2019;10:1-8. doi:10.3389/fimmu.2019.02256
369. Khanna A, Zamani M, Huang NF. Extracellular matrix-based biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(11). doi:10.3390/jcdd8110137
370. Swinehart I, Badylak SF. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Dev Dyn.* 2016;245(3):351-360. doi:10.1002/dvdy.24379.Extracellular
371. Dardik H. Past and present ECM-based vascular biomaterials. In: Mooradian DL, ed. *Extracellular Matrix-Derived Implants in Clinical Medicine.* ; 2016:1-186. doi:10.1016/C2014-0-01736-4
372. Heath DE. A Review of Decellularized Extracellular Matrix Biomaterials for Regenerative Engineering Applications. *Regen Eng Transl Med.* 2019;5(2):155-166. doi:10.1007/s40883-018-0080-0
373. Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2014;32(2):462-484. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.012
374. Chakraborty J, Roy S, Ghosh S. Regulation of decellularized matrix mediated immune response. *Biomater Sci.* 2020;8(5):1194-1215. doi:10.1039/c9bm01780a
375. Reing J, Brown BN, Daly K, et al. The Effects of Processing Methods upon Mechanical and Biologic Properties of Porcine Dermal Extracellular Matrix Scaffolds. *Biomaterials.* 2010;31(33):8626-8633. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.083.The
376. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 2012;33(6):1771-1781. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.054
377. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 2015;84:25-34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.005
378. White LJ, Taylor AJ, Faulk DM, et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomater.* 2017;50:207-219. doi:10.1016/j.actbio.2016.12.033
379. Uhl FE, Zhang F, Pouliot RA, et al. Functional role of glycosaminoglycans in decellularized lung extracellular matrix. *Acta Biomater.* 2020;102:231-246. doi:10.1016/j.actbio.2019.11.029
380. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine : From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int.* Published online 2017. doi:10.1155/2017/9831534
381. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
382. Simsa R, Padma AM, Heher P, et al. Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels. *PLoS One.* 2018;13(12):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0209269
383. Schneider KH, Enayati M, Grasl C, et al. Acellular vascular matrix grafts from human placenta chorion: Impact of ECM preservation on graft characteristics, protein composition and in vivo performance. *Biomaterials.* 2018;177:14-26. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.05.045
384. Capella-Monsonís H, Zeugolis DI. Decellularized xenografts in regenerative medicine: From processing to clinical application. *Xenotransplantation.* 2021;28(4):1-27.

doi:10.1111/xen.12683

385. Assunção M, Dehghan-Baniani D, Yiu CHK, Später T, Beyer S, Blocki A. Cell-Derived Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(December):1-10. doi:10.3389/fbioe.2020.602009
386. Fitzpatrick LE, McDevitt TC. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomater Sci.* 2015;3(1):12-24. doi:10.1039/c4bm00246f
387. Hoshiba T. Cultured cell-derived decellularized matrices: a review towards the next decade. *J Mater Chem B.* 2017;5(23):4322-4331. doi:10.1039/c7tb00074j
388. Hoshiba T. Cultured cell-derived decellularized extracellular matrix (cultured cell-derived dECM): Future applications and problems — a mini review. *Curr Opin Biomed Eng.* 2021;17. doi:10.1016/j.cobme.2020.100256
389. Morris AH, Stamer DK, Kyriakides TR. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials. *Semin Immunol.* 2017;29:72-91. doi:10.1016/j.smim.2017.01.002
390. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials.* 2016;86:68-82. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.003
391. Sadtler K, Singh A, Wolf MT, Wang X, Pardoll DM, Elisseeff JH. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. *Nat Rev Mater.* 2016;1(7). doi:10.1038/natrevmats.2016.40
392. Badylak SF, Gilbert TW. Immune Response to Biologic Scaffold Materials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):109-116. doi:10.1016/j.smim.2007.11.003.Immune
393. Hibino N, Mejias D, Pietris N, et al. The innate immune system contributes to tissue-engineered vascular graft performance. *FASEB J.* 2015;29(6):2431-2438. doi:10.1096/fj.14-268334
394. Anderson JM. *Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials.* Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-809880-6.00039-4
395. Brown BN, Badylak SF. Biocompatibility and Immune Response to Biomaterials. In: *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation.* ; 2014:151-162. doi:10.1016/B978-0-12-398523-1.00011-2
396. Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, Stewart-Akers AM. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng - Part A.* 2008;14(11):1835-1842. doi:10.1089/ten.tea.2007.0264
397. Cramer M, Chang J, Li H, et al. Tissue response, macrophage phenotype, and intrinsic calcification induced by cardiovascular biomaterials: Can clinical regenerative potential be predicted in a rat subcutaneous implant model? *J Biomed Mater Res - Part A.* 2022;110(2):245-256. doi:10.1002/jbm.a.37280
398. Valentin JE, Stewart-Akers AM, Gilbert TW, Badylak SF. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng - Part A.* 2009;15(7):1687-1694. doi:10.1089/ten.tea.2008.0419
399. Martin KE, García AJ. Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: Implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies. *Acta Biomater.* 2021;133:4-16. doi:10.1016/j.actbio.2021.03.038
400. Huleihel L, Dziki J, Bartolacci J, Rausch T, Badylak SF. Macrophage phenotype in response to

- ECM bioscaffolds. *Semin Immunol.* 2017;29:2-13.
doi:10.1016/j.smim.2017.04.004.Macrophage
401. Witherel CE, Sao K, Brisson BK, et al. Regulation of extracellular matrix assembly and structure by hybrid M1/M2 macrophages. *Biomaterials.* 2021;269(August 2020):120667.
doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120667
402. Kyriakides TR, Kim HJ, Zheng C, Harkins L, Tao W, Deschenes E. Foreign body response to synthetic polymer biomaterials and the role of adaptive immunity. *Biomed Mater.* 2022;17(2).
doi:10.1088/1748-605X/ac5574
403. Adusei KM, Ngo TB, Sadtler K. T lymphocytes as critical mediators in tissue regeneration, fibrosis, and the foreign body response. *Acta Biomater.* 2021;133:17-33.
doi:10.1016/j.actbio.2021.04.023
404. Rolfe B, Mooney J, Zhang B, et al. The Fibrotic Response to Implanted Biomaterials: Implications for Tissue Engineering. In: Eberli D, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials.* ; 2011. doi:10.5772/21790
405. Anderson J, Cramer S. Perspectives on the Inflammatory, Healing, and Foreign Body Responses to Biomaterials and Medical Devices. In: Badylak SF, ed. *Host Response to Biomaterials: The Impact of Host Response on Biomaterial Selection.* Academic Press; 2015:460.
406. Poulis N, Martin M, Hoerstrup SP, Emmert MY, Fioretta ES. Macrophage-extracellular matrix interactions: Perspectives for tissue engineered heart valve remodeling. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9(September):1-18. doi:10.3389/fcvm.2022.952178
407. Dziki JL, Huleihel L, Scarritt ME, Badylak SF. Extracellular Matrix Bioscaffolds as Immunomodulatory Biomaterials. *Tissue Eng - Part A.* 2017;23(19-20):1152-1159.
doi:10.1089/ten.tea.2016.0538
408. Sadtler K, Estrellas K, Allen BW, Wolf M, Elisseeff JH. Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells. *Science (80-).* 2016;352(6283):366-370. doi:10.1126/science.aad9272.Developing
409. Moore EM, Maestas DR, Cherry CC, et al. Biomaterials direct functional B cell response in a material specific manner. *Sci Adv.* 2021;7(49).
<http://biorxiv.org/content/early/2021/01/13/2021.01.12.426347.abstract>
410. Badylak SF. Extracellular matrix and the immune system: friends or foes. *Nat Rev Urol.* 2019;16(7):389-390. doi:10.1038/s41585-019-0196-0
411. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol.* 2004;12:367-377. doi:10.1016/j.trim.2003.12.016
412. Wong ML, Griffiths LG. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1806-1816. doi:10.1016/j.actbio.2014.01.028
413. Hwang J, San BH, Turner NJ, et al. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater.* 2017;53:268-278.
doi:10.1016/j.actbio.2017.01.079
414. Cramer M, Badylak SFF. Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior. *Ann Biomed Eng.* 2020;48(7):2132-2153. doi:10.1007/s10439-019-02408-9.Extracellular
415. Courtman DW, Errett BF, Wilson GJ. The role of crosslinking in modification of the immune

- response elicited against xenogenic vascular acellular matrices. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(4):576-586. doi:10.1002/1097-4636(20010615)55:4<576::AID-JBM1051>3.0.CO;2-9
416. Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, et al. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation.* 2006;114(4):318-327. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.549311
 417. Tam H, Zhang W, Infante D, Parchment N, Sacks M, Vyavahare N. Fixation of Bovine Pericardium-Based Tissue Biomaterial with Irreversible Chemistry Improves Biochemical and Biomechanical Properties. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018;10(2):194-205. doi:10.1007/s12265-017-9733-5
 418. Simionescu DT, Lu Q, Song Y, et al. Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds. *Biomaterials.* 2006;27(5):702-713. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.013
 419. Tedder ME, Liao J, Weed B, et al. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng - Part A.* 2009;15(6):1257-1268. doi:10.1089/ten.tea.2008.0263
 420. Chuang TH, Stabler C, Simionescu A, Simionescu DT. Polyphenol-stabilized tubular elastin scaffolds for tissue engineered vascular grafts. *Tissue Eng - Part A.* 2009;15(10):2837-2851. doi:10.1089/ten.tea.2008.0394
 421. Tedder ME, Simionescu A, Chen J, Liao J, Simionescu DT. Assembly and testing of stem cell-seeded layered collagen constructs for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng - Part A.* 2011;17(1-2):25-36. doi:10.1089/ten.tea.2010.0138
 422. Pennel T, Fercana G, Bezuidenhout D, et al. The performance of cross-linked acellular arterial scaffolds as vascular grafts; pre-clinical testing in direct and isolation loop circulatory models. *Biomaterials.* 2014;35(24):6311-6322. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.062
 423. Harpa MM, Movileanu I, Sierad LN, et al. Pulmonary heart valve replacement using stabilized acellular xenogeneic scaffolds; effects of seeding with autologous stem cells. *Rev Rom Med Lab.* 2015;23(4):415-430. doi:10.1515/rrlm-2015-0046
 424. Young DA, McGilvray KC, Ehrhart N, Gilbert TW. Comparison of in vivo remodeling of urinary bladder matrix and acellular dermal matrix in an ovine model. *Regen Med.* 2018;13(7):759-773. doi:10.2217/rme-2018-0091
 425. van Rijswijk JW, Talacua H, Mulder K, et al. Failure of decellularized porcine small intestinal submucosa as a heart valved conduit. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2020;160(4):e201-e215. doi:10.1016/j.jtcvs.2019.09.164
 426. Wong ML, Wong JL, Athanasiou KA, Griffiths LG. Stepwise solubilization-based antigen removal for xenogeneic scaffold generation in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2013;9(5):6492-6501. doi:10.1016/j.actbio.2012.12.034
 427. Papalamprou A, Griffiths LG. Cardiac Extracellular Matrix Scaffold Generated Using Sarcomeric Disassembly and Antigen Removal. *Ann Biomed Eng.* 2015;44(4):1047-1060. doi:10.1007/s10439-015-1404-6
 428. Gates K V., Griffiths LG. Chronic graft-specific cell-mediated immune response toward candidate xenogeneic biomaterial. *Immunol Res.* 2018;66(2):288-298. doi:10.1007/s12026-018-8985-8
 429. Dalgliesh AJ, Parvizi M, Lopera-Higueta M, Shklover J, Griffiths LG. Graft-specific immune tolerance is determined by residual antigenicity of xenogeneic extracellular matrix scaffolds.

- Acta Biomater.* 2018;79(August):253-264. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.016
430. Wong ML, Wong JL, Vapniarsky N, Griffiths LG. In vivo xenogeneic scaffold fate is determined by residual antigenicity and extracellular matrix preservation. *Biomaterials.* 2016;92:1-12. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.024
 431. Rahmani B, McGregor C, Byrne G, Burriesci G. A Durable Porcine Pericardial Surgical Bioprosthetic Heart Valve: a Proof of Concept. *J Cardiovasc Transl Res.* 2019;12(4):331-337. doi:10.1007/s12265-019-09868-3
 432. Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJMF, et al. A1,3-Galactosyltransferase Gene-Knockout Pig Heart Transplantation in Baboons With Survival Approaching 6 Months. *Transplantation.* 2005;80(10):1493-1500. doi:10.1097/01.tp.0000181397.41143.fa
 433. Dahl SLM, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.* 2003;12(6):659-666. doi:10.3727/000000003108747136
 434. Lauria A, Sen I, Rasmussen T. The Human Acellular Vessel for Vascular Reconstruction or Bypass: A Novel Biologic Conduit for Vascular Bypass and Repair. *JAMA Surg.* 2022;157(8). doi:10.1067/mva.2001.111747
 435. Weber B, Dijkman PE, Scherman J, et al. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials.* 2013;34(30):7269-7280. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.059
 436. Driessen-Mol A, Emmert MY, Dijkman PE, et al. Transcatheter implantation of homologous “off-the-shelf” tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: Long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(13):1320-1329. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.082
 437. Emmert MY, Schmitt BA, Loerakker S, et al. Computational modeling guides tissue-engineered heart valve design for long-term in vivo performance in a translational sheep model. *Sci Transl Med.* 2018;10(440). doi:10.1126/scitranslmed.aan4587
 438. Motta SE, Fioretta ES, Lintas V, et al. Geometry influences inflammatory host cell response and remodeling in tissue-engineered heart valves in-vivo. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-15. doi:10.1038/s41598-020-76322-9
 439. Morris H, Murray R. Medical textiles. *Text Prog.* 2020;52(1-2):1-127. doi:10.1080/00405167.2020.1824468
 440. Akbari M, Tamayol A, Bagherifard S, et al. Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(7):751-766. doi:10.1002/adhm.201500517
 441. Sumanasingh R, King MW. The Applications of Biotextiles in Tissue Engineering. *Res J Text Appar.* 2005;9(3):80-90. doi:10.1108/RJTA-09-03-2005-B012
 442. Bueno M. Tribologie des textiles - Frottement , usure et propriétés mécaniques. *Tech l'ingénieur.* Published online 2015.
 443. Nemoz G. Textures textiles tridimensionnelles. *Tech l'ingénieur.* Published online 2003.
 444. Tomkova B, Sejnoha M, Zeman J. Weaving. In: Nicolais L, Borzacchiello A, eds. *Wiley Encyclopedia of Composites.* ; 2012.
 445. Marks R, Robinson ATC. *Principles of Weaving.* The Textile Institute; 1976.

446. Adanur S. *Handbook of Weaving*. CRC Press; 2001.
447. Canonico P. Woven composite structures. In: Nicolais L, Borzacchiello A, eds. *Wiley Encyclopedia of Composites*. John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
448. Cox BN, Flanagan G. *Handbook of Analytical Methods for Textile Composites*. (Administration NA and S, ed.); 1997.
449. Ben Abdesslem S, Mokhtar S, Durand B, Chakfe N. A new concept of three dimensional weaving of bifurcated vascular prostheses. *Indian J Fibre Text Res*. 2006;31(4):573-576.
450. Cavallaro JF, Kemp PD, Kraus KH. Collagen Fabrics as Biomaterials. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43:781-791. doi:10.1002/bit.260440121
451. Younesi M, Islam A, Kishore V, Anderson JM, Akkus O. Tenogenic Induction of Human MSCs by Anisotropically Aligned Collagen Biotextiles. *Adv Funct Mater*. 2014;24(36):5762-5770. doi:10.1002/adfm.201400828
452. Kishore V, Bullock W, Sun X, Van Dyke WS, Akkus O. Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials*. 2012;33(7):2137-2144. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.066.TENOGENIC
453. Zhang F, Xie Y, Celik H, Akkus O, Bernacki SH, King MW. Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with comparable mechanical properties to native vessels. *Biofabrication*. 2019;11(3):1173-1178. doi:10.1126/science.1249098.Sleep
454. Cornwell KG, Lei P, Andreadis ST, Pins GD. Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions. *J Biomed Mater Res Part A*. 2007;80(2):362-371. doi:10.1002/jbm.a
455. Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G. Cross-linking of extruded collagen fibers-A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;89(4):895-908. doi:10.1002/jbm.a.32031
456. Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Mithieux SM, Hiob MA, Wang Y, Chong A, Weiss AS. Fabricated tropoelastin-silk yarns and woven textiles for diverse tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2019;91:112-122. doi:10.1016/j.actbio.2019.04.029
457. Magnan L, Kawecki F, Labrunie G, et al. In vivo remodeling of human cell-assembled extracellular matrix yarns. *Biomaterials*. 2021;273. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120815
458. B. Pourdeyhimi, Text C. Vascular Grafts : Textile structures and their performance. *Text Prog*. 1986;15(3):37-41.
459. Tian-Jian R, Chin P, Guidoin R, et al. Soft filamentous woven polyester arterial prosthesis from China. *Biomaterials*. 1991;12(3):335-344. doi:10.1016/0142-9612(91)90043-A
460. How T V., Guidoin R, Young SK. Engineering design of vascular prostheses. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 1992;206(2):61-71. doi:10.1243/PIME_PROC_1992_206_269_02
461. Zhu T, Gu H, Ma W, et al. A fabric reinforced small diameter tubular graft for rabbits' carotid artery defect. *Compos Part B Eng*. 2021;225(June). doi:10.1016/j.compositesb.2021.109274
462. Xie Y, Guan Y, Kim SH, King MW. The mechanical performance of weft-knitted/electrospun bilayer small diameter vascular prostheses. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;61:410-418. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.04.011
463. Zhang F, Bambharoliya T, Xie Y, et al. A hybrid vascular graft harnessing the superior mechanical properties of synthetic fibers and the biological performance of collagen

- filaments. *Mater Sci Eng C*. 2021;118. doi:10.1016/j.msec.2020.111418
464. Fernández-Colino A, Wolf F, Rütten S, et al. Small Caliber Compliant Vascular Grafts Based on Elastin-Like Recombinamers for in situ Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(November):1-13. doi:10.3389/fbioe.2019.00340
465. Guan Y, Yang X, Wang L, Guan G, King MW. A Novel Silk/Polyester Woven Small Diameter Arterial Prosthesis: Degumming and the Influence on Cytocompatibility. *Fibers Polym*. 2015;16(7):1533-1539. doi:10.1007/s12221-015-4934-5
466. Guidoin R, King M, Marceau D, Cardou M, Blais P. Textile arterial prostheses : Is water permeability equivalent to porosity ? *J Biomed Mater Res*. 1987;21:65-87.
467. Yang H, Zhu G, Zhang Z, Wang Z, Fang J, Xu W. Influence of weft-knitted tubular fabric on radial mechanical property of coaxial three-layer small-diameter vascular graft. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2012;100 B(2):342-349. doi:10.1002/jbm.b.31955
468. Houshyar S, Shanks RA, Hodzic A. Influence of Different Woven Geometry in Poly(propylene) Woven Composites. *Macromol Mater Eng*. Published online 2005:45-52. doi:10.1002/mame.200400158
469. Lou C, Lin C, Lei C, Chen H, Li Y, Lin J. Weaving technology and mechanical properties of extended-PTFE fabrics. *J Mater Process Technol*. 2007;193:319-322. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.04.064
470. Ali G, Nassif A. Effect of Weave Structure and Weft Density on the Physical and Mechanical Properties of Micro polyester Woven Fabrics. *J Am Sci*. 2012;8(8).
471. Girault E, Biguenet F, Eidenschenk A, Dupuis D, Barbet R, Heim F. Fibrous biomaterials: Effect of textile topography on foreign body reaction. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2021;109(10):1512-1524. doi:10.1002/jbm.b.34810
472. Mokhtar S, Ben Abdessalem S, Sakli F. Optimization of textile parameters of plain woven vascular prostheses. *J Text Inst*. 2010;101(12):1095-1105. doi:10.1080/00405000903363597
473. Heim F, Gupta BS. Textile Heart Valve Prosthesis: The Effect of Fabric Construction Parameters on Long-term Durability. *Text Res J*. 2009;79(11):1001-1013. doi:10.1177/0040517507101457
474. Rieber G, Jiang J, Deter C, Chen N, Mitschang P. Influence of textile parameters on the in-plane Permeability. *Compos Part A*. 2013;52:89-98. doi:10.1016/j.compositesa.2013.05.009
475. Ben Abdessalem S, Chakfe N, Le Magnen JF, et al. Influence of crimping textile polyester vascular prostheses on the fluid flow kinetics. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;18(5):375-380. doi:10.1053/ejvs.1999.0892
476. Ben Abdessalem S, Durand B, Akesbi S, Chakfe N, Kretz JG. Fluid-structure interaction in a free and textile vascular prosthesis. *Eur Phys J Appl Phys*. 2005;184(3):177-184. doi:10.1051/epjap
477. Hajjaji R, Abdessalem S Ben, Ganghoffer JF. The influence of textile vascular prosthesis crimping on graft longitudinal elasticity and flexibility. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;16(1):73-80. doi:10.1016/j.jmbbm.2012.06.017
478. Muiznieks LD, Jensen SA, Weiss AS. Structural changes and facilitated association of tropoelastin. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410(2):317-323. doi:10.1016/S0003-9861(02)00719-1
479. Hwang JY, Johnson PY, Braun KR, et al. Retrovirally mediated overexpression of glycosaminoglycan-deficient biglycan in arterial smooth muscle cells induces tropoelastin

- synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointimae after vascular injury. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1919-1928. doi:10.2353/ajpath.2008.070875
480. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: Key roles for versican. *Circ Res.* 2004;94(9):1158-1167. doi:10.1161/01.RES.0000126921.29919.51
481. Merrilees MJ, Falk BA, Zuo N, Dickinson ME, May BCH, Wight TN. Use of versican variant V3 and versican antisense expression to engineer cultured human skin containing increased content of insoluble elastin. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(1):295-305. doi:10.1002/term.1913
482. Tsiapalis D, De Pieri A, Spanoudes K, et al. The synergistic effect of low oxygen tension and macromolecular crowding in the development of extracellular matrix-rich tendon equivalents. *Biofabrication.* 2020;12(2). doi:10.1088/1758-5090/ab6412
483. Assunção M, Wong CW, Richardson JJ, et al. Macromolecular dextran sulfate facilitates extracellular matrix deposition by electrostatic interaction independent from a macromolecular crowding effect. *Mater Sci Eng C.* 2020;106. doi:10.1016/j.msec.2019.110280
484. Shendi D, Marzi J, Linthicum W, et al. Hyaluronic acid as a macromolecular crowding agent for production of cell-derived matrices. *Acta Biomater.* 2019;100:292-305. doi:10.1016/j.actbio.2019.09.042
485. Kumar P, Satyam A, Fan X, et al. Macromolecularly crowded in vitro microenvironments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. *Sci Rep.* 2015;5:1-10. doi:10.1038/srep08729
486. Gaspar D, Fuller KP, Zeugolis DI. Polydispersity and negative charge are key modulators of extracellular matrix deposition under macromolecular crowding conditions. *Acta Biomater.* 2019;88:197-210. doi:10.1016/j.actbio.2019.02.050
487. Wu DJ, van Dongen K, Szymczyk W, et al. Optimization of Anti-kinking Designs for Vascular Grafts Based on Supramolecular Materials. *Front Mater.* 2020;7(July):1-11. doi:10.3389/fmats.2020.00220
488. Baeyens N, Nicoli S, Coon BG, et al. Vascular remodeling is governed by a VEGFR3-dependent fluid shear stress set point. *Elife.* 2015;2015(4):1-35. doi:10.7554/eLife.04645
489. Dolan JM, Meng H, Singh S, Paluch R, Kolega J. High fluid shear stress and spatial shear stress gradients affect endothelial proliferation, survival, and alignment. *Ann Biomed Eng.* 2011;39(6):1620-1631. doi:10.1007/s10439-011-0267-8
490. Yuk H, Varela CE, Nabzdyk CS, et al. Dry double-sided tape for adhesion of wet tissues and devices. *Nature.* 2019;575(7781):169-174. doi:10.1038/s41586-019-1710-5
491. Wolff J, Grawe I, Wirth M, Karstedt A, Gorb SN. Spider's super-glue : thread anchors are composite adhesives with synergistic hierarchical organization. *Soft Matter.* 2015;11:2394-2403. doi:10.1038/Received
492. Liu C, Lu R, Jia M, et al. Biological Glue from Only Lipoic Acid for Scarless Wound Healing by Anti-inflammation and TGF- β Regulation. *Chem Mater.* 2023;35(6):2588-2599. doi:10.1021/acs.chemmater.3c00049
493. Ma C, Sun J, Li B, et al. Ultra-strong bio-glue from genetically engineered polypeptides. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-14. doi:10.1038/s41467-021-23117-9
494. Weigand A, Boos AM, Ringwald J, et al. New aspects on efficient anticoagulation and antiplatelet strategies in sheep. *BMC Vet Res.* 2013;9(192). doi:10.1186/1746-6148-9-192

495. Connell JM, Khalapyan T, Al-Mondhiry HA, Wilson RP, Rosenberg G, Weiss WJ. Anticoagulation of juvenile sheep and goats with heparin, warfarin, and clopidogrel. *ASAIO J.* 2007;53(2):229-237. doi:10.1097/MAT.0b013e31802e192b
496. Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1999;45(3):240-250. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990605)45:3<240::AID-JBM12>3.0.CO;2-C
497. Zaytseva P, Visser VL, Ehterami A, Hoerstrup SP, Motta SE, Emmert MY. Xenogeneic Serum-Free Human Cell-Derived Tissue Engineered Matrices for the Development of Clinical-Grade Biomimetic Cardiovascular Devices. *Adv Ther.* 2023;2300041:1-14. doi:10.1002/adtp.202300041
498. Sugiura T, Tara S, Nakayama H, et al. Fast-degrading bioresorbable arterial vascular graft with high cellular infiltration inhibits calcification of the graft. *J Vasc Surg.* 2017;66(1):243-250. doi:10.1016/j.jvs.2016.05.096
499. Fioretta ES, Lintas V, Mallone A, et al. Differential Leaflet Remodeling of Bone Marrow Cell Pre-Seeded Versus Nonseeded Bioresorbable Transcatheter Pulmonary Valve Replacements. *JACC Basic to Transl Sci.* 2020;5(1):15-31. doi:10.1016/j.jacbts.2019.09.008
500. van der Valk DC, Fomina A, Uiterwijk M, et al. Calcification in Pulmonary Heart Valve Tissue Engineering: A Systematic Review and Meta-Analysis of Large-Animal Studies. *JACC Basic to Transl Sci.* 2023;8(5):572-591. doi:10.1016/j.jacbts.2022.09.009
501. Valencia Rivero KT, Jaramillo Escobar J, Galvis Forero SD, et al. New Regenerative Vascular Grafts for Hemodialysis Access: Evaluation of a Preclinical Animal Model. *J Investig Surg.* 2018;31(3):192-200. doi:10.1080/08941939.2017.1303100
502. Coté N, Mahmut A, Bosse Y, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation.* 2013;36(3):573-581. doi:10.1007/s10753-012-9579-6
503. Aikawa E, Libby P. A rock and a hard place chiseling away at the multiple mechanisms of aortic stenosis. *Circulation.* 2017;135(20):1951-1955. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027776
504. Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, et al. Aortic valve calcification: Determinants and progression in the population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(3):642-648. doi:10.1161/01.ATV.0000255952.47980.c2
505. Schoen FJ, Hirsch D, Bianco RW, Levy RJ. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108(5):880-887. doi:10.1016/S0022-5223(94)70186-5
506. Valente M, Bortolotti U, Thiene G. Ultrastructural Substrates of Dystrophic Calcification in Porcine Bioprosthetic Valve Failure. *Am J Pathol.* 1984;119(1):12-21.
507. Scribner BH. A Personalized History of Chronic Hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 1990;16(6):511-519. doi:10.1016/S0272-6386(12)81034-1