

Conception et validation d'un substitut vasculaire naturel, fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes et cellularisé par un endothelium autologue orienté

Estelle Paternotte

▶ **To cite this version:**

Estelle Paternotte. Conception et validation d'un substitut vasculaire naturel, fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes et cellularisé par un endothelium autologue orienté. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10105 . tel-01748646

HAL Id: tel-01748646
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748646

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, Nancy-I

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

par **Estelle PATERNOTTE**

CONCEPTION ET VALIDATION D'UN SUBSTITUT VASCULAIRE NATUREL, FONCTIONNALISE PAR UN FILM MULTICOUCHE DE POLYELECTROLYTES ET CELLULARISE PAR UN ENDOTHELIUM AUTOLOGUE ORIENTE

Soutenue le 27 septembre 2010

Membres du jury :

Directeur de thèse :	**M. Patrick MENU**	**PU, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy**
Rapporteurs :	**M. Didier LETOURNEUR**	**DR, INSERM U698, Paris**
	M. Simon RINCKENBACH	**PU-PH, CHU, Besançon**
Examinateurs :	**M. Philippe FERNANDEZ**	**PU-PH, CHU, Bordeaux**
	M. Pierre LABRUDE	**PU, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy**
	M. Jean-François STOLTZ	**PU-PH, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy**
	M. Jean-Claude VOEGEL	**DR, INSERM U977, Strasbourg**
Membre invité :	**M. Bertrand LEHALLE**	**MD, PhD, Pôle Vaisseaux, Nancy**

Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires

UMR-CNRS 7561

Faculté de Médecine – Nancy-Université

Mes parents, ma sœur ainsi que la famille Paternotte-Honoré
m'ont toujours fait confiance. Ils m'ont aidée, soutenue et encouragée,
même dans les moments les plus délicats.
Je les remercie pour tout cela!
Puisse cette thèse être à la hauteur de tout ce qu'ils ont fait pour moi ! ...

Expression libre

Au cours de cette thèse, j'ai rencontré beaucoup de personnes différentes, qui, chacune à sa manière, a influencé le déroulement de mes travaux. Je leur dois beaucoup (énormément pour certaines même !), car c'est en partie grâce à elles que j'écris ces mots aujourd'hui.

Notre histoire a commencé en 2006, lorsque j'ai intégré le laboratoire d'Ingénierie cellulaire et tissulaire, UMR-CNRS 7563, dirigé par le Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz pour mon stage de M1. Il m'a soutenue dans les moments importants. Je lui témoigne ici toute ma vive reconnaissance.

J'ai été accueillie par Monsieur le Professeur Patrick Menu à la tête de l'équipe « Ingénierie vasculaire ». Depuis, bien du chemin a été parcouru. M. Menu est devenu mon directeur de thèse ; et moi, son étudiante en thèse ! Je le remercie très chaleureusement pour son soutien, ainsi que pour tous les conseils qu'il a su me prodiguer au cours de notre travail. Il a su m'apprendre l'autonomie. Qu'il trouve en ces mots l'expression de mon entière reconnaissance.

C'est avec M. Stoltz et M. Menu que ma thèse a commencé, elle va s'achever dans quelques semaines avec les membres de mon jury. Je tiens donc à les remercier d'avoir accepté de juger ce travail :

- Monsieur Didier Letourneur, directeur de recherche ;

- Monsieur Jean-Claude Voegel, directeur de recherche ;

- Monsieur le Professeur Philippe Fernandez ;

- Monsieur le Professeur Simon Rinckenbach.

La vie au laboratoire n'est pas toujours un long fleuve tranquille, mais j'avoue que j'ai beaucoup apprécié les personnes que j'ai côtoyées. « Le labo », c'est comme une grande famille. J'en remercie chacun de ses membres et je vais vous en présenter ici quelques-uns.

En premier lieu : le chef de famille. Ici LES chefs de familles : M. Menu « le directeur de thèse » et M. Labrude « le grand–directeur de thèse ». Ils managent en tandem leur équipe. Je les remercie profondément tous les deux ; et particulièrement M. le Professeur Pierre Labrude pour le temps qu'il m'a consacré et pour toutes les réflexions que nous avons eues ensemble. Son incroyable culture et sa grande ouverture d'esprit ont largement contribué à faire avancer ces travaux. Qu'il en soit remercié et qu'il trouve ici l'expression de toute mon admiration la plus sincère.

Mmes Gentils, Cauchois et Guerber. Ce sont les « mamans du labo ». Elles nous écoutent, nous conseillent, nous guident. Elles assurent le soutien logistique… et psychologique ! Je les remercie infiniment pour leur aide. En particulier Mme Monique

Gentils pour son soutien sans faille au cours de nos séances de « couture ».

Ma grande sœur : Caroline Gaucher-Di Stasio. Je la remercie d'avoir initié mes premiers pas dans la recherche !

Nicolas Salmon : mon frère (jumeau !) de thèse. Il s'agit de mon collègue de bureau et voisin de paillasse. Non !... en fait il s'agit à présent d'un très bon ami ! J'ai beaucoup apprécié ces 3 années de dur labeur passées avec toi. Heureusement que tu étais là ! Ta bonne humeur perpétuelle et ta gentillesse ont égaillé mes manip ! Ton humour va me manquer ! … ainsi que nos réflexions sur LE sens de la vie ! Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite !

J'ai également eu la chance d'avoir des petits frères et sœurs : des stagiaires. Tunay, tu as été « mes petites mains ». J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Après deux stages à mes cotés, j'ai finalement réussi à te convertir à la thèse ! Aude, Emilie et Camille : je vous remercie pour votre bonne humeur et les bons moments passés dans notre bureau. Je vous souhaite à tous les quatre un avenir plein de réussite.

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations. J'ai été accueillie par chacun de mes collaborateurs à bras ouverts. Qu'ils trouvent l'expression de ma gratitude en les quelques lignes ci-dessous :

- Mme Anne-Laure Leblanc et M. Jérome Béyrend, gérants de l'animalerie centrale. Merci de vous être occupés de mes petits patients ;

- les membres du laboratoire de Physiologie : Monsieur le Professeur François Marchal, Mme Noëlle Bertin et M. Bruno Demoulin, pour m'avoir « prêté » leurs lapins ;

- Monsieur le Docteur Bertrand Lehalle, merci de m'avoir enseigné l'art du pontage !

- l'équipe de Monsieur le Docteur Patrick Lacolley pour m'avoir accueillie dans ses locaux pour les manipulations de biologie moléculaire et l'expérimentation animale. Tout particulièrement, merci à Madame le Docteur Anna Kearney-Schwartz pour l'auscultation hebdomadaire de mes lapins.

- l'équipe de Monsieur le Professeur François Plénat ; et plus spécifiquement Mmes Bonnet et Thiébaut, respectivement technicienne en chef et technicienne, pour leur incroyable travail d'histologie ;

- Monsieur le Docteur Dominique Dumas et M. Sébastien Hupont, responsables du plateau d'imagerie, pour leur aide au confocal ;

- un grand merci à nos secrétaires : Mmes Reppel, Lorcin et Vanzo pour avoir su déchiffrer nos commandes.

Enfin (je garde le meilleur pour la fin !), Nicolas, tu es toujours là pour moi. Merci pour ton soutien, tes encouragements et surtout pour tous tes petits mots… d'amour !!

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **10**

LISTE DES FIGURES **12**

LISTE DES TABLEAUX **17**

INTRODUCTION GENERALE **18**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **22**

I. Anatomie du système vasculaire: structure et composition **23**

I.1. Mise en place du système vasculaire 24

I.1.1. Développement chez l'embryon : vasculogenèse 24

I.1.2. Développement chez l'adulte : angiogenèse 24

I.2. Les différents types de vaisseaux 25

I.2.1. Les veines 25

I.2.2. Les artères 25

I.2.3. Cas particulier du cordon ombilical 26

I.3. Composition de la paroi des vaisseaux 27

I.3.1. L'adventice 27

I.3.2. La média 28

I.3.3. L'intima 29

II. Fonctionnalité du système vasculaire : les cellules vasculaires **29**

II.1. Les cellules musculaires lisses *30*

II.1.1. Description 30
II.1.2. Caractérisation phénotypique 30
II.1.3. Fonctions 31
II.2. Les cellules endothéliales *33*
II.2.1. Description 33
II.2.2. Caractérisation phénotypique 34
II.2.2.1 Marqueurs extracellulaires 34
II.2.2.2 Marqueurs intracellulaires 35
II.2.3. Fonctions 36
II.2.4. Contraintes mécaniques 37

III. Pathologies vasculaires et chirurgie du pontage associé 38
III.1. L'artériopathie oblitérante *39*
III.1.1. Définition 39
III.1.2. Epidémiologie 40
III.1.3. Physiopathologie 40
III.1.4. Conséquences et complications 41
III.1.5. Prise en charge 42

III.2. Les substituts vasculaires *42*
III.2. 1. Substituts biologiques 44
III.2.1.1. Les substituts traités : les bioprothèses 44
III.2.1.2. Les substituts non traités : les greffes vasculaires 45
III.2.1.2.1. Les autogreffes 45
III.2.1.2.2. Les allogreffes 45
III.2.2. Substituts synthétiques 46
III.2.2.1. Le polyéthylène téréphtalate (PET) 46
III.2.2.2. Le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) 47

III.2.2.3. Le polyuréthane....48

III.3. Le cahier des charges du substitut vasculaire idéal de petit calibre 50

IV. Ingénierie vasculaire....51

IV.1. Matrices synthétiques composites....53

IV.1.1. Matrices synthétiques composites biodégradables....54

IV.1.2. Matrices synthétiques composites permanentes....54

IV.2. Reconstitution vasculaire : prothèses à plusieurs épaisseurs 55

IV.3. Matrices naturelles....58

IV.3.1. Matrice à base d'intestin grêle....58

IV.3.2. Matrice vasculaire décellularisée et acellularisée....59

IV.4. Substituts vasculaires endothélialisés....60

IV.4.1. Les matrices utilisées pour l'endothélialisation 60

IV.4.2. Les cellules....61

IV.4.2.1. Les cellules matures....62

IV.4.2.1.1. Les cellules endothéliales....62

IV.4.2.1.2. Les cellules endothéliales circulantes 62

IV.4.2.2. Les cellules souches (CS)....63

IV.4.2.2.1. Les CS embryonnaires 64

IV.4.2.2.2. Les CS pluripotentes induites 66

IV.4.2.2.3. Les CS fœtales 67

IV.4.2.2.4. Les cellules souches adultes (CSA) 67

IV.4.2.2.4.1. Les CSA mésenchymateuses...68

IV.4.2.2.4.2. Les CSA hématopoïétiques 70

IV.4.2.2.4.3. Les CSA endothéliales 72

a. Rôle des EPC....72
b. Isolement et caractérisation des EPC...73
c. Mobilisation des EPC....75
d. Facteurs intervenant dans la mobilisation

et le recrutement des EPC 78
e. Utilisation des EPC en ingénierie tissulaire vasculaire 80

IV.4.3. Les revêtements de surfaces 80

V. Film multicouche de polyélectrolytes.....82

V.1. Dépôt des films : technique du couche par couche (« layer by layer »).....83

V.2. Mode de croissance.....84

V.3. Biocompatibilité des films multicouche de polyélectrolytes 85

V.4. Interactions mises en jeu lors de la construction du film 85

V.4.1. Interactions électrostatiques.....86

V.4.2. Liaisons hydrophobes 86

V.4.3. Liaisons Hydrogène 86

V.5. Expertise du laboratoire 87

V.6. Ambition et projet de développement.....89

OBJECTIFS DE L'ETUDE 90

MATERIEL ET METHODES.....92

I. Culture cellulaire et tissulaire.....93

I.1. Culture cellulaire 93

I.1.1. Réactifs et milieux de culture.....93

I.1.2. Isolement des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine 95

I.1.2.1. Dons de cordon ombilical.....95

I.1.2.2. Constitution de la primo-culture.....96

I.1.3. Isolement des cellules progénitrices endothéliales.....98

I.1.3.1. Cadre éthique de l'expérimentation animale.....98

I.1.3.2. Anesthésie de l'animal 98

I.1.3.3. Prélèvement du sang.....98

I.1.3.4. Euthanasie et devenir des cadavres 98

I.1.3.5. Isolement des EPC.....99

I.1.4. Passage en subculture 100

I.2. Préparation des matrices vasculaires *100*

I.2.1. Milieux de conservation des vaisseaux 100

I.2.1.1. Milieux de conservation des artères ombilicales 100

I.2.1.2. Milieu de conservation des veines saphènes 101

I.2.2. Isolement et conservation des vaisseaux 101

I.2.2.1. Isolement et conservation des artères ombilicales..... 101

I.2.2.2. Isolement et conservation des veines saphènes 101

I.2.3. Décongélation et traitement des artères ombilicales 102

I.2.3.1. Décongélation des artères ombilicales 102

I.2.3.2. Traitement des artères ombilicales 102

I.2.4. Modification de la surface luminale par un film multicouche de polyélectrolytes ..... .103

I.2.4.1. Solutions de polyélectrolytes 103

I.2.4.2. Dépôt des polyélectrolytes dans les vaisseaux 103

I.2.4.3. Ensemencement des cellules sur la surface luminale des matrices artérielles 105

a. Ensemencement des CE et ensemencement des CE et cellules endothéliales-*like* 105

b. Ensemencement des EPC 105

I.2.5. Stimulations mécaniques : contraintes de cisaillement 106

II. Méthodes de caractérisation et d'investigation 108

II.1. Caractérisation histologique et immunohistochimique *108*

II.1.1. Histologie 108

II.1.1.1. Réactifs 108

II.1.1.2. Fixation 108
II.1.1.3. Déshydratation et inclusion dans la paraffine 108
II.1.1.4. Coupe et étalement 109
II.1.1.5. Colorations histologiques 109
II.1.1.5.1. Réactifs 110
II.1.1.5.2. Déparaffinage 110
II.1.1.5.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine-safran 110
II.1.1.5.4. Coloration selon la méthode de Weighert 111
II.1.1.5.5. Réaction de Von Kossa 111
II.1.1.5.6. Montage et observation des lames 112
II.1.2. Immunohistochimie 112
II.1.2.1. Réactifs 112
II.1.2.2. Anticorps 112
II.1.2.3. Déparaffinage et démasquage des sites antigéniques 113
II.1.2.4. Marquage et révélation 113
II.2. Caractérisation par microscopie confocale à balayage laser 114
II.2.1. Description de l'appareillage 114
II.2.2. Visualisation du film multicouche de polyélectrolytes 115
II.2.2.1. Réactifs 116
II.2.2.2. Protocole 116
II.2.3. Visualisation du noyau 116
II.2.3.1. Réactifs 116
II.2.3.2. Protocole 116
II.2.4. Visualisation du phénototype cellulaire par immunocytologie 116
II.2.4.1. Principe 116
II.2.4.2. Réactifs 117
II.2.4.3. Anticorps 117

II.2.4.4. Immunomarquage des récepteurs membranaires 118
II.2.4.5. Immunomarquage intracellulaire 119
II.2.5. Suivi des cellules à long terme 119
II.2.5.1. Réactifs 119
II.2.5.2. Marquage à la PKH-26 120
II.3. Caractérisation par biologie moléculaire : qPCR 121
II.3.1. Extraction des ARN totaux 121
II.3.1.1. Réactifs 121
II.3.1.2. Protocole d'extraction 121
II.3.2. Quantification des ARN totaux extraits 123
II.3.3. Intégrité des ARN 123
II.3.4. Rétrotranscription des ARN 123
II.3.5. qPCR 124
II.3.5.1. Principe 124
II.3.5.2. Choix des amorces 125
II.3.5.3. Réactifs 126
II.3.5.4. Protocole de qPCR 126

III. Evaluation *in vivo* du substitut : suivi post-implantation 128
III.1. Cadre éthique de l'expérimentation animale 128
III.2. Choix du modèle animal 128
III.3. Anesthésie de l'animal 128
III.4. Réactifs 128
III.5. Technique du pontage termino-latéral 129
III.6. Echotracking vasculaire 133
III.7. Prélèvement des substituts 134
III.8. Euthanasie des lapins 134

IV. Analyses statistiques **134**

RESULTATS ET DISCUSSION **136**

I. Fonctionnalité cellulaire et impact du cisaillement sur une matrice vasculaire naturelle fonctionnalisée et endothélialisée **138**

I.1. Résultats expérimentaux *138*

I.1.1. Elaboration d'une matrice acellulaire 138

I.1.2. Vérification du dépôt du film multicouche de polyélectrolytes 142

I.1.3. Endothélialisation des artères 144

I.1.4. Impact du film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH sur le comportement des cellules endothéliales 146

I.1.5. Impact du film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH sur la rétention des CE après cisaillement 148

I.2. Discussion *152*

I.3. Conclusion *156*

II. Transfert et validation de la technique de recouvrement par des films multicouches de polyélectrolytes sur un vaisseau de référence : la veine saphène humaine **157**

II.1. Résultats expérimentaux *157*

II.1.1. Caractérisation *in vitro* de la veine saphène fonctionnalisée 157

II.1.2. Evaluation *in vivo* de la perméabilité de la veine saphène fonctionnalisée par un film MPE 159

II.2. Discussion *161*

II.3. Conclusion *162*

III. Evaluation *in vivo* d'un substitut endothélialisé **163**

III.1. Résultats expérimentaux *163*

III.1.1. Evaluation *in vivo* du substitut 163

III.1.2. Evaluation post-explantation 167

III.2. Discussion *174*

III.3. Conclusion *180*

IV. Endothélialisation de la matrice artérielle par des cellules progénitrices endothéliales : évaluation *in vitro* et *in vivo* ***181***

IV.1. Résultats expérimentaux *181*

IV.1.1. Caractérisation *in vitro* *181*

IV.1.1.1. Cellularisation à l'aide de cellules endothéliales-*like*..... 181

a. Evaluation du recouvrement cellulaire..... 181

b. Evaluation de la rétention des cellules endothéliales-*like* en condition dynamique 183

IV.1.1.2. Cellularisation à l'aide de cellules endothéliales-*like*..... 185

IV.1.2. Caractérisation *in vivo* *186*

IV.1.3. Caractérisation post-explantation 187

IV.2. Discussion *189*

IV.3. Conclusion *192*

CONCLUSION GENERALE **193**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **196**

ANNEXE **215**

LISTE DES TRAVAUX **220**

Liste des abréviations

° : degré

°C : degré Celcius

% : pourcentage

τ : contrainte de cisaillement

μ : viscosité

μL : microlitre

acétyl-LDL : *dil-acetyled low density lipoprotein* / lipoprotéine dil-acétylée de faible densité

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADMA : diméthylarginine asymétrique

AMM : autorisation de mise sur le marché

AOD : artère ombilicale désendothélialisée

ARN : acide ribonucléique

α-SM-actine : *α- smooth muscle actin* / α-actine de muscle lisse

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BSA : sérumalbumine bovine

C : cellule

CD : cluster de différenciation

CE : cellule endothéliale

CE-*like* : cellule endothéliale-*like*

CEC : cellule endothéliale circulante

Ci : cisaillement

CLSM : *confocal laser scanning microscopy* / microscopie confocale

cm^2 : centimètre carré

CML : cellule musculaire lisse

CS : cellule souche

CSA : cellule souche adulte

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSM : cellule souche mésenchymateuse

DMSO : diméthylsulfoxyde

EBM-2: *endothelial basal medium-2*

EDTA: *ethylene diamine tetraacetic acid*

EGF : *epidermal growth factor*

eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*

EPC : cellule progénitrice endothéliale

EPO : érythropoïétine

F : film

FGF : *fibroblast growth factor*

g : gramme

g : gravité

G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*

GHz : gigahertz

h : heure

HBSS : *Hank's balanced salt solution*

HCl : acide chlorhydrique

HDL : *high density lipoprotein* / lipoprotéine de haute densité

HES : hématoxyline-éosine-safran

HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine

IDM : infarctus aigu du myocarde

IGF : *insuline growth factor*

iPS : *induced pluripotent stem cells* / cellule souche pluripotente induite

kDa : kilodalton

KDR : *kinase domain receptor*

kg : kilogramme

L : litre

LBL : *layer-by-layer* / couche par couche

m : mitochondrie

M : molaire

MB : membrane basale

MEC : matrice extracellulaire

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

mm Hg : millimètre de mercure

MMP : métalloprotéinase

mol : mole

MPE : multicouche de polyélectrolytes

n : noyau

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nm: nanomètre

NO : monoxyde d'azote

O_2 : dioxygène

OMS : organisation mondiale de la santé

P : passage

Pa : pascal

PAF : paraformaldéhyde

PAH : poly chlorohydrate d'allylamine

pb : paire de base

PBS : *phosphate buffer saline*

PECAM-1 = *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* / molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales-1

PET : polytéréphtalate d'éthylène ou Dacron®

PGA : acide polyglycolique

PHA : polyhydroxyalkanoate

pH : potentiel hydrogène

PHA : polyhydroxyalkanoate

PSS : polystyrène-4-sulfonate

PTFEe : polytétrafluoroéthylène expansé ou Téflon®

PU : polyuréthane

p/v : poids / volume

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction* / réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RE : réticulum endoplasmique

s : seconde

SDF-1 : *chemokine stromal derived factor- 1*

SDS : dodécylsulfate de sodium

SM22α : *smooth muscle 22α* / protéine du muscle lisse 22α

SM-MHC : *smooth muscle-myosin heavy chain* / chaîne lourde de la myosine

SNP : *single nucleotide polymorphisme*

SVF: sérum de veau foetal

TA : température ambiante

TNF-α : *tumor necrosis factor α*

U : unité

UI : unité internationale

UV : ultraviolet

V : volt

VE-cadherine : *vascular endothelial cadherin* / cadherine vasculaire endothéliale

VEGF : *vascular endothelial growth factor* / facteur de croissance vasculaire endothélial

VEGF-R2 : récepteur 2 au VEGF

v/v : volume à volume

vWF : facteur Von Willebrand

WP : corps de Weibel Palade

Liste des figures

Figure 1 : Disposition des différents types de vaisseaux dans le système vasculaire 23

Figure 2 : Les différentes étapes du développement vasculaire embryonnaire..... 24

Figure 3 : Coupe histologique d'une artère élastique..... 25

Figure 4 : Coupe histologique d'une artère musculaire 26

Figure 5 : Agencement des différentes tuniques d'un vaisseau sanguin..... 27

Figure 6 : Photographie d'une culture de cellules musculaires lisses de lapin 29

Figure 7 : Photographie d'une culture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine... 29

Figure 8 : Schéma d'une cellule endothéliale vue en coupe transversale 33

Figure 9 : Schéma des forces de contraintes appliquées sur la paroi des vaisseaux 37

Figure 10 : Plaque d'athérome 39

Figure 11 : Les différents stades de développement de la plaque athéromateuse..... 41

Figure 12 : Substituts biologiques naturels 43

Figure 13 : Substituts vasculaires synthétiques : Téflon® et Dacron® 44

Figure 14 : Substitut vasculaire à base de PTFEe/Téflon® 47

Figure 15 : Schéma d'une construction à base de collagène..... 56

Figure 16 : Production de vaisseaux humains par auto assemblage 56

Figure 17 : Représentation schématique du principe de *bioprinting* 58

Figure 18 : Mécanisme supposé de détachement des cellules endothéliales de la membrane basale..... 62

Figure 19 : Différents types de cellules souches 64

Figure 20 : Blastocyste humain obtenu par fécondation *in vitro* 64

Figure 21 : Cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes dermiques humains 66

Figure 22 : Photographie de cellules souches mésenchymateuses..... 69

Figure 23 : Différenciation des cellules souches hématopoïétiques..... 71

Figure 24 : Photographie de cellules progénitrices endothéliales..... 72

Figure 25 : Rôle des EPC dans les phénomènes de régénération vasculaire..... 73

Figure 26 : Evolution des marqueurs au cours de la différenciation phénotypique de l'hémangioblaste en EPC puis en CE..... 74

Figure 27 : Facteurs modulant le nombre d'EPC..... 76

Figure 28 : Principe de construction de films multicouches de polyélectrolytes..... 84

Figure 29 : Photographie montrant l'étalement des cellules endothéliales..... 87

Figure 30 : Photographie en microscopie à contraste de phase et en microscopie confocale (objectif 40) d'EPC cultivés sur un support de verre recouvert soit de fibronectine soit de film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH)..... 88

Figure 31: Coupes histologiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après une semaine d'implantation..... 89

Figure 32 : Formulaire de recueil du consentement des cordons ombilicaux..... 95

Figure 33 : Photographie d'une coupe transversale de cordon ombilical humain..... 96

Figure 34 : Schéma des différentes étapes du protocole d'isolement des HUVEC..... 97

Figure 35 : Schéma montrant les différentes étapes du protocole d'isolement des EPC..... 99

Figure 36 : Photographie en microscopie à contraste de phase d'HUVEC en passage 0 et de cellules endothéliales-*like* issues d'EPC en passage 0..... 100

Figure 37 : Photographie du dispositif permettant d'injecter les solutions les solutions de polyélectrolytes dans la lumière de l'artère afin d'y déposer les films MPE..... 104

Figure 38: Schéma de la chambre d'écoulement..... 106

Figure 39 : Photographie de l'ensemble des éléments constitutifs du circuit permettant de soumettre les artères au cisaillement..... 107

Figure 40: Principe d'un microscope confocal à balayage laser..... 115

Figure 41 : Principe de reconstitution d'images en 3 dimensions..... 115

Figure 42 : Principe de l'immunomarquage direct et indirect..... 117

Figure 43 : Protocole de marquage des HUVEC avec la PKH-26 120

Figure 44 : Schéma d'un microtube après séparation sur phénol-chloroforme 122

Figure 45 : Vérification de la présence et de l'intégrité des ARN 123

Figure 46 : Cinétique des différentes étapes du pontage vasculaire..... 130

Figure 47 : Photographie montrant une incision en vue de réaliser une artériotomie..... 131

Figure 48 : Photographie montrant une artériotomie et une palette anastomotique..... 131

Figure 49 : Photographies représentant quelques points de surjet 132

Figure 50 : Photographies montrant la purge et le lavage au sérum physiologique..... 132

Figure 51 : Photographie montrant la fin d'une anastomose distale 132

Figure 52 : Photographie de l'échographe-Doppler et du lapin prêt pour l'échographie..... 133

Figure 53 : Immunomarquages de la paroi vasculaire avant et après traitement 140

Figure 54 : Coupes histologiques transversales d'artères ombilicales fraîches et d'artères ayant subi le traitement d'acellularisation 141

Figure 55 : Photographie de 2 artères : l'une avant traitement au SDS et nucléases et l'autre après traitement..... 142

Figure 56 : Coupe transversale d'artère acellularisée montrant le recouvrement de leur lumière par le film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH dont la dernière couche de PAH a été marquée à la rhodamine..... 143

Figure 57 : Coupes transversales d'artères acellularisées montrant le recouvrement de leur lumière par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH..... 143

Figure 58 : Evaluation et caractérisation des cellules ensemencées à l'intérieur des artères acellularisées recouvertes de film multicouche de polyélectrolytes $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH 145

Figure 59 : Niveaux d'expression d'ARNm de la E-sélectine et de eNOS de cellules endothéliales cultivées sur une matrice acellulaire recouverte de film multicouche de polyélectrolytes 147

Figure 60: Evaluation de la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans des artères acellularisées recouvertes de film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH en conditions de culture statique et dynamique 149

Figure 61 : Evaluation quantitative de la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans des artères acellularisées recouvertes de film (PAH-PSS)$_3$-PAH en conditions de culture statique et dynamique 151

Figure 62 : Recouvrement de la lumière des veines saphènes par le film (PAH-PSS)$_3$ 157

Figure 63 : Coupes histologiques de veines saphènes fonctionnalisées par un film MPE (PAH-PSS)$_3$ 158

Figure 64 : Tracés obtenus par écho-Doppler après 5 semaines d'implantation de la veine saphène fonctionnalisée 159

Figure 65: Tracés obtenus par écho-Doppler après 2 semaines, 1 mois et 3 mois d'implantation de notre substitut cellularisé à partir de CE matures 165

Figure 66 : Aspect du substitut après 3 mois d'implantation (coupe transversale) 167

Figure 67 : Coupes histologiques des différentes constructions implantées sur le lapin après 3 mois d'implantation 168

Figure 68 : Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après 2 semaines et 3 mois d'implantation 169

Figure 69 : Morphologie des cellules endothéliales 170

Figure 70 : Evaluation de la persistance des cellules endothéliales ensemencées dans le substitut au cours de son implantation sur le lapin 171

Figure 71 : Coupes histologiques obtenues après explantation du substitut (AOD+F+C+Ci) implanté sur le lapin après 2 semaines et 3 mois d'implantation 172

Figure 72 : Coupes histologiques montrant la formation de *vasa vasorum* au niveau des structures périvasculaires du substitut 173

Figure 73 : Coupes histologiques des artères désendothélialisées recouvertes de film et ensemencées avec des CE-*like* 182

Figure 74 : Observation en microscopie confocale du phénotype cellulaire des *CE-like* ensemencées dans les artères fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes 183

Figure 75: Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après cisaillement 184

Figure 76 : Observation en microscopie confocale du phénotype des cellules ensemencées dans les artères désendothélialisées fonctionnalisées par un film MPE 185

Figure 77 : Tracés obtenus par écho-Doppler après 4 semaines d'implantation 186

Figure 78 : Aspect macroscopique du substitut cellularisé avec des CE-*like* après 4 semaines d'implantation 187

Figure 79 : Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après 4 semaines d'implantation 188

Liste des Tableaux

Tableau I : Composition de la média en fonction du type de vaisseau considéré 28

Tableau II : Propriétés du substitut vasculaire idéal conçu par la bioingénierie 51

Tableau III : Conduits vasculaires de petits calibres mis au point en ingénierie vasculaire 52

Tableau IV : Composition des tampons sans calcium ni magnésium 93

Tableau V : Caractéristiques des polyélectrolytes 103

Tableau VI : Liste des anticorps primaires 118

Tableau VII : Caractéristiques de l'anticorps secondaire 118

Tableau VIII : Réactifs et quantités utilisés pour la rétro-transcription 124

Tableau IX : Détails des températures utilisées pour rétro-transcrire l'ARNm en ADNc 124

Tableau X : Détails des séquences des amorces utilisées pour la qPCR 125

Tableau XI : Proportions des différents réactifs utilisés pour la qPCR 127

Tableau XII : Détails des températures employées pour amplifier l'ADNc 127

Tableau XIII : Axes de travail développés et méthodologies associées 137

Tableau XIV : Vitesse du flux sanguin relevée par écho-Doppler et évolution du diamètre interne de la veine saphène fonctionnalisée par un film MPE 160

Tableau XV : Perméabilité des différentes constructions 164

Tableau XVI : Moyennes des vitesses du flux sanguin relevées par échographie-Doppler et évolution du diamètre interne du substitut 166

Tableau XVII : Vitesse du flux sanguin et diamètre du substitut à 4 semaines d'implantation .. 187

Introduction Générale

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des principales causes mondiales de mortalité et de morbidité. Parmi ces pathologies, l'athérosclérose, conduisant à l'obstruction de la lumière des vaisseaux sanguins, est responsable d'environ 18 millions de décès chaque année dans le monde (Chlupac et al., 2009). Malgré d'importants progrès réalisés au cours de ces dernières décennies, les techniques curatives endoluminales (angioplastie endoluminale et stents) ne suffisent pas. Face à l'échec de telles procédures, les chirurgiens recourent au remplacement du vaisseau lésé.

La chirurgie vasculaire réparatrice nécessite l'utilisation d'un substitut pour assurer la dérivation de l'artère pathologique. Plusieurs types de substitut peuvent être utilisés pour rétablir la circulation sanguine : les vaisseaux autologues et les allogreffes artérielles ou veineuses. Même si les substituts naturels restent le « *gold standard* » des prothèses vasculaires, les prothèses synthétiques demeurent les substituts vasculaires les plus implantés en raison de leur grande disponibilité.

Le développement des prothèses synthétiques a pris son essor au cours des années 1950 et a abouti à la synthèse de prothèses, en particulier en polytétrafluoroéthylène expansé® (PTFEe®) et en Dacron®. Ces prothèses sont indiquées pour le remplacement des vaisseaux de moyens et gros calibres. Cependant, après plusieurs décennies d'utilisation, l'expérience atteste que les substituts en PTFEe® et Dacron® ne sont pas adaptés pour le remplacement des vaisseaux de petits calibres (< 6 mm). Bien que leurs performances à long terme soient plus que médiocres (seulement 12 % à 39 % de perméabilité à 5 ans (Conklin et al., 2002; Klinkert et al., 2004), ces prothèses sont toujours utilisées dans la substitution des vaisseaux pathologiques de petits calibres. En effet, aucune innovation dans le domaine vasculaire n'a supplanté ces matériaux développés il y a plusieurs décennies.

Dans les années 1980, les chercheurs ont combiné leurs savoir-faire dans les domaines de la médecine, de la biologie et des sciences des matériaux afin de développer des tissus implantables. C'est l'émergence de l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire vasculaire a pour objectif de développer des substituts de petits calibres non thrombogènes remplissant un cahier des charges strict, de façon à se rapprocher le plus possible des propriétés biologiques et mécaniques du vaisseau natif. L'association du savoir-faire de plusieurs domaines de recherche a conduit à l'essor des substituts vasculaires.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre des activités du groupe d'ingénierie tissulaire de l'UMR-CNRS 7561 dont l'un des objectifs est de développer des substituts vasculaires de petits calibres grâce à l'association 3 éléments :

- des artères d'origine biologique cryoconservées issues du cordon ombilical humain ;

- des films multicouches de polyélectrolytes permettant de modifier les propriétés physico-chimiques des surfaces endoluminales sur lesquelles ils sont déposés ;

- des cellules endothéliales ou progénitrices endothéliales adhérentes sur cette surface luminale.

Dans l'optique de cellulariser la surface endoluminale des substituts vasculaires, un film multicouche de polyélectrolytes a été déposé sur les parois de la lumière d'artères ombilicales de petits calibres. Ce concept repose sur des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (thèses C. Boura et V. Moby), qui ont montré qu'un film $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$ permettait d'obtenir une bonne adhésion cellulaire sur des supports de verre et de PTFEe® recouvert par ce film. Nous avons transféré cette technologie sur un support (ici une matrice) naturel.

Au cours de ce travail, nous avons évalué la rétention en conditions statique et dynamique de cellules endothéliales ensemencées sur la surface luminale d'artère ombilicale recouverte de film multicouche de polyélectrolytes. Nous avons ensuite évalué l'incidence du film sur la fonctionnalité endothéliale. L'absence de thrombogénicité ainsi que le comportement du substitut fonctionnalisé et endothélialisé ont été évalués *in vivo* à la suite de son implantation chez le lapin pendant 3 mois. Enfin, dans le but de mettre au point un substitut à base de cellules autologues, un substitut fonctionnalisé et endothélialisé par des cellules progénitrices endothéliales a été développé et évalué par les mêmes procédés.

Notre mémoire comporte quatre parties :

- une revue bibliographique des différents travaux menés sur ce sujet met en lumière les connaissances actuelles et les problématiques de recherche de l'ingénierie vasculaire des vaisseaux de faible diamètre.

- le matériel biologique est présenté. L'appareillage utilisé est décrit et les techniques et protocoles sont expliqués.

- les résultats expérimentaux obtenus sont exposés en respectant les quatre axes développés dans notre travail : la validation *in vitro* de notre substitut vasculaire, l'étude de faisabilité *in vivo* sur un substitut naturel de référence, la validation *in vivo* de notre modèle et enfin le développement d'un nouveau substitut composé d'EPC. Chacune de ces parties est séparément discutée.

- la dernière partie est consacrée à la conclusion générale. Elle proposera de définir les perspectives de cette thématique au sein de l'équipe.

Introduction Bibliographique

I. Anatomie du système vasculaire : structure et composition

Le système vasculaire est un système en boucle fermée qui assure le transport du sang dans l'organisme. La circulation du sang permet le transport et l'approvisionnement des cellules en dioxygène et en nutriments, ainsi que la collecte et l'élimination des déchets métaboliques provenant de l'activité cellulaire. La première description du système vasculaire fut établie par William Harvey (1578-1657), dans son ouvrage *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis* et *Sanguinis in animalibus* de 1628. Il y décrit notamment le sens de circulation et établit que la circulation est importante (plusieurs litres par minute) alors qu'on la croyait jusque là au goutte-à-goutte.

Le système cardiovasculaire comporte deux réseaux parallèles de vaisseaux (figure 1) : les veines et les artères.

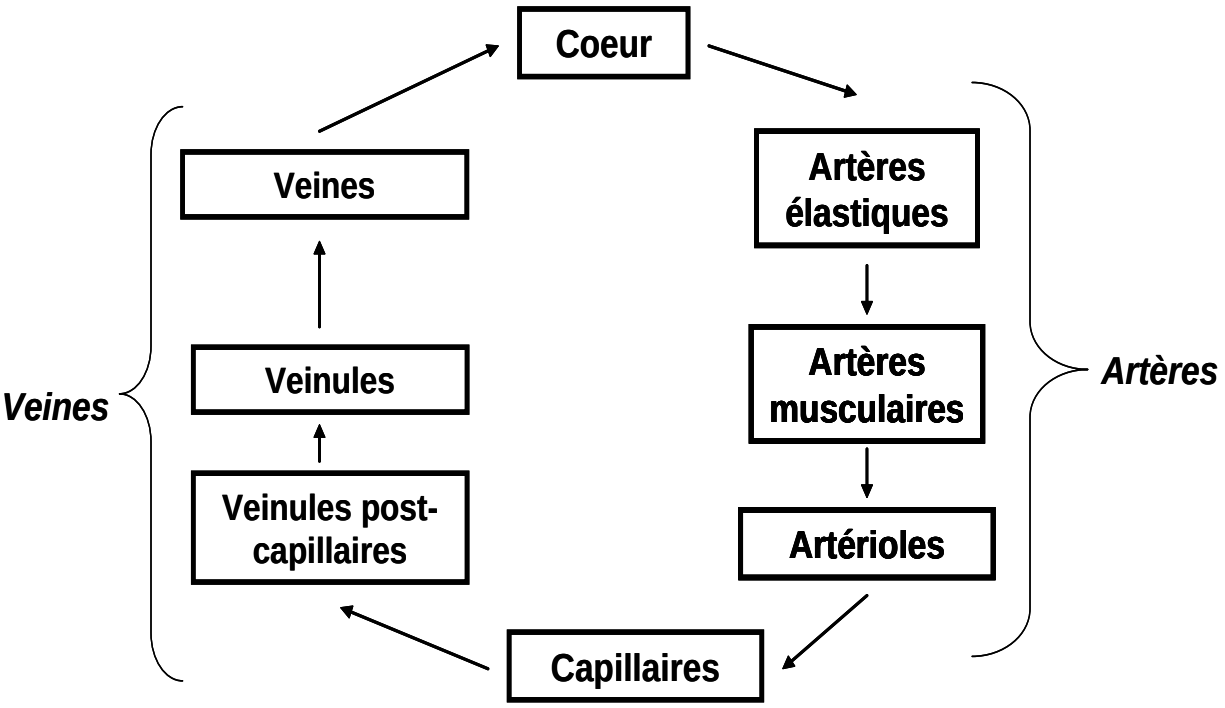


Figure 1 **: Schéma représentant la disposition des différents types de vaisseaux dans le système vasculaire.** *Le cœur gauche en se contractant (systole) envoie le sang oxygéné dans le réseau artériel. Après passage dans les capillaires, le sang appauvri en dioxygène est ramené au cœur droit par le réseau veineux.*

I.1. Mise en place du système vasculaire

I.1.1. Développement chez l'embryon : vasculogenèse

Décrite pour la première fois en 1900 par His, la vasculogenèse traduit l'émergence *de novo* de cellules progénitrices endothéliales (EPC) ou angioblastes à partir de tissu non vasculaire (figure 2). Un plexus primitif, qui sera réorganisé par des processus d'angiogénèse, se met en place pendant la vasculogenèse embryonnaire. Le développement physiologique des vaisseaux sanguins est essentiellement observé pendant l'embryogenèse, au cours de laquelle apparaît la majorité des structures vasculaires.

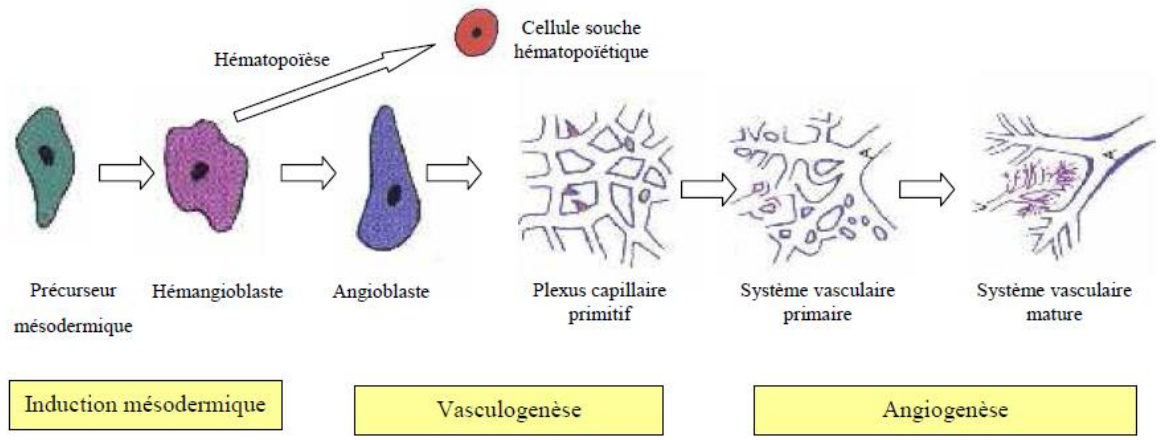


Figure 2 : **Les différentes étapes du développement vasculaire embryonnaire.**
(d'après (Risau, 1997))

I.1.2. Développement chez l'adulte : angiogénèse

L'angiogénèse est la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (figure 2). Elle est observée principalement chez l'adulte. Dans les conditions physiologiques, elle est limitée à des situations particulières comme l'adaptation du muscle squelettique à un exercice physique prolongé, à l'ovaire et l'utérus au cours du cycle de reproduction chez la femme ou à la cicatrisation. Deux grands mécanismes d'angiogénèse ont été décrits à l'heure actuelle et rendent compte de la grande majorité des phénomènes de développement vasculaire pendant la période embryonnaire ou chez l'adulte, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques : l'angiogénèse par bourgeonnement et l'intrussuception.

I.2. Les différents types de vaisseaux

I.2.1. Les veines

Les veines amènent le sang des capillaires au cœur. Plus les veines sont proches du cœur, plus leur diamètre s'accroît. Les veines font partie du système à basse pression, mais cette pression est suffisante pour draîner le sang vers le cœur. Grâce à des parois minces et extensibles ainsi qu'à une lumière large, les veines peuvent recevoir un volume important de sang. Pour aider le retour du sang, des valvules empêchent le reflux.

I.2.2. Les artères

Les artères conduisent le sang du cœur jusqu'aux capillaires. Elles stockent une partie du sang éjecté au cours de chaque systole cardiaque pour assurer un flux continu à travers les capillaires lors de la diastole. Dotées d'une musculature, elles peuvent faire varier l'état de tension de leur paroi et ainsi réguler la pression artérielle.

Les artères sont classées suivant leur taille et leurs fonctions :

- les artères élastiques (figure 3) : riches en fibres élastiques et situées près du cœur (aorte et ses ramifications), elles sont de gros calibres.



Figure 3 : **Coupe histologique d'une artère élastique.**

L'orcéine colore les fibres élastiques en rouge foncé. Grossissement X 40.

www.histol.chuvashia.com

- les artères musculaires (figure 4) : intermédiaires entre les artères élastiques et les artérioles, elles apportent le sang aux organes. Leur média contient beaucoup de cellules musculaires lisses (CML) (4 à 6 fois plus de CML) et peu de fibres élastiques.



Figure 4 : **Coupe histologique d'une artère musculaire.**

La média contenant les cellules musculaires lisses est très épaisse. Grossissement X 10. (Histology Tutorial, T. George, W. Pawlina, University of Florida College of Medicine)

- les artérioles : ce sont les plus petites artères (diamètre inférieur à 0,3 mm) qui débouchent dans les capillaires. Leur média ne contient que quelques CML et quelques fibres élastiques.

I.2.3. Cas particulier du cordon ombilical

Le cordon ombilical possède une grande particularité quant à l'attribution du rôle de ses vaisseaux. Dans la mesure où, dans notre travail, nous utiliserons à la fois des cellules et des artères issues des cordons ombilicaux, il convient d'attirer l'attention sur cette singularité.

Le système sanguin du cordon ombilical est constitué de deux artères et d'une veine. Il relie le placenta au fœtus. La veine ombilicale transporte le sang riche en nutriments et en dioxygène, des villosités placentaires vers l'embryon. Normalement, il n'existe qu'une veine dans le cordon ombilical. Les deux artères ombilicales naissent des artères iliaques communes et véhiculent du sang appauvri en dioxygène et chargé en dioxyde de carbone.

I.3. Composition de la paroi des vaisseaux

La paroi de tous les vaisseaux sanguins est constituée des mêmes éléments, dont l'importance varie d'une paroi à une autre, conférant à chacun des secteurs vasculaires des propriétés propres. Une paroi vasculaire est composée de trois couches appelées tuniques et disposées de façon concentrique. De l'extérieur vers l'intérieur, nous observons ainsi : l'adventice, la média et l'intima (figure 5).

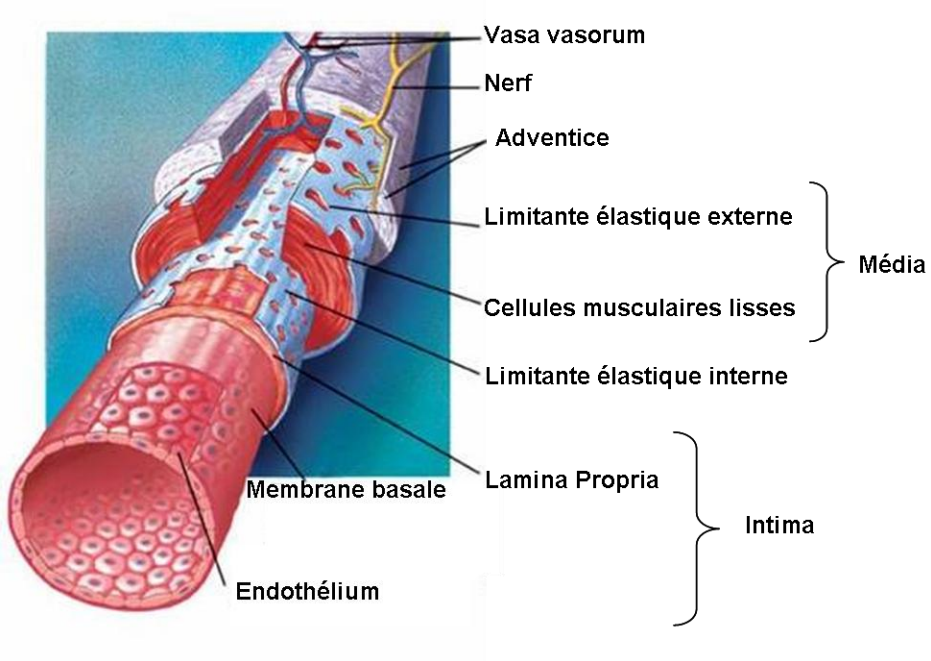


Figure 5 : **Agencement des différentes tuniques d'un vaisseau sanguin.**

I.3.1. L'Adventice

L'adventice permet l'ancrage du vaisseau aux tissus environnants. Interface avec les tissus avoisinants, elle est constituée principalement de :

- un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques et contenant des fibroblastes et des adipocytes ;

- des *vasa vasorum* : petits vaisseaux sanguins qui irriguent l'adventice ;

- un réseau de nerfs vasomoteurs : qui innervent les fibres musculaires lisses de la média.

I.3.2. La média

Il s'agit de la tunique moyenne. Elle est séparée des 2 autres tuniques par des lamelles élastiques dites limitante interne (pour la limite avec l'intima) et limitante externe (pour la séparation avec l'adventice). La média contient principalement des CML, ainsi que des constituants extracellulaires tels que des fibres élastiques, des fibrilles d'élastine et de collagène, et des protéoglycanes. Leurs quantités varient en fonction du type d'artères (tableau I).

Tableau I : **Composition de la média en fonction du type de vaisseau considéré.**

Chez l'homme, divers paramètres varient d'un type de vaisseau à l'autre. Outre le diamètre de la lumière, l'épaisseur et la proportion relative de chacun des constituants de la paroi vasculaire varient du simple au triple d'un vaisseau à l'autre.

	Diamètre de la lumière	Epaisseur de la paroi	CML	Composition de la media		Innervation
				Elastine	Collagène	
Artères élastiques	1 à 2 cm	2 mm	+++	+++	I,III	+
Artères musculaires	1 mm à 1 cm	1 mm	+/-	+/-	I,III	++
Artérioles	30 µm	20 µm	+/-	+/-	I,III	++++
Capillaires	5 à 8 µm	1 µm	+/-	+/-	IV,V	+/-
Veinules post-capillaires	20 µm	2 µm	+/-	+/-		+/-
Veinules	0,5 cm	0,5 mm	+/-	+/-		+/-
Veines	1 à 3 cm	1,5 mm	+	+/-		+/-

Les CML (figure 6) vasculaires matures expriment une variété de protéines contractiles afin d'accomplir leur fonction première : la contraction.

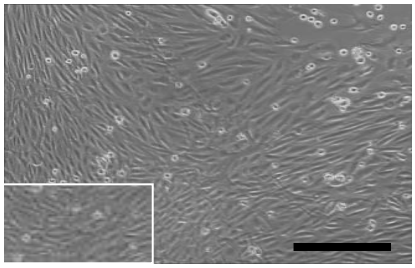


Figure 6 : **Photographie d'une culture de cellules musculaires lisses de lapin, passage 0 ; Objectif X 20**. *Les CML de lapin sont des cellules allongées.*

I.3.3. L'intima

L'intima est la tunique la plus interne. Elle est formée d'un endothélium constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) (figure 7). Le poids total de l'endothélium est estimé à 1,5 kg et sa surface recouvre plus de 5000 m^2 (Boneu, 1997; Pries and Kuebler, 2006).

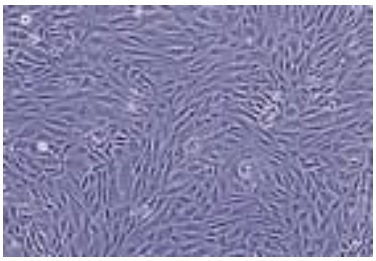


Figure 7 : **Photographie d'une culture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), passage 2 ; Objectif X 20.** *Les HUVEC sont des cellules de type endothélial recouvrant l'intégralité de la surface luminale de l'artère ombilicale. Les HUVEC constituent une source cellulaire endothéliale très utilisé,e notamment pour la reconstruction vasculaire.*

II. Fonctionnalité du système vasculaire : les cellules vasculaires

Deux types cellulaires confèrent aux vaisseaux toutes leurs capacités : les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales.

II.1. Les cellules musculaires lisses

II.1.1. Description des cellules musculaires lisses vasculaires

Les CML matures sont incapables de migrer. Elles sont caractérisées par un taux de prolifération extrêmement faible, ne sécrètent que de faibles quantité de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et expriment un répertoire unique de protéines contractiles et du cytosquelette, de canaux ioniques, et de molécules de signalisation indispensables à leur propriétés contractiles.

Ce sont des cellules allongées (20-50 µm de long et 5 µm de diamètre) mononucléées (noyau central et allongé) et entourées d'une lame basale. Elles interagissent avec la MEC par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant la jonction cellules/matrice. Des *gaps jonctions* permettent des échanges intercellulaires. La structure de l'organe contractile de la paroi vasculaire est différente de celle du muscle strié par l'absence de stries (d'où le terme lisse). Les CML possèdent un équipement contractile avec des fibres actine-myosine et des mitochondries. Les fibres d'actine-myosine sont fixées aux corps denses.

II.1.2. Caractérisation phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires

Les CML expriment certaines protéines permettant de les caractériser :

- ***L'α-actine*** de muscle lisse (α-SM-actine) : il s'agit d'une protéine de 42 kDa (Vandekerckhove and Weber, 1978) dont il existe 6 isoformes présentant un grand niveau d'homologie entre elles. L'α-actine est exprimée de façon prédominante dans les CML matures situées au niveau de la paroi artérielle (Clowes et al., 1988). Elle représente 40 % des protéines totales de la CML et plus de 70 % de l'actine totale. Une haute teneur en α-actine est requise pour générer une grande capacité de contraction.

- ***La caldesmone*** existe sous deux isoformes : la h-caldesmone (120-150 kDa) et la l-caldesmone (70-80 kDa). Seule la h-caldesmone est exprimée dans les CML (Sobue and Sellers, 1991; Ueki et al., 1987). Dans les CML, la caldesmone se lie à l'actine et à la calmoduline.

- ***La calponine*** : c'est une protéine de 28 à 34 kDa qui interagit avec les filaments d'actine et la tropomyosine de manière Ca^{2+}-dépendante. Il a été montré qu'elle pouvait

inhiber l'activité des filaments d'actine et de myosine (Winder et al., 1992). Le mécanisme de régulation lié à l'actine *via* la calponine n'est pas clair, même si son implication dans la phosphorylation est démontrée.

- ***La smootheline*** est une protéine de 100 kDa. C'est un marqueur des stades très tardifs de différenciation des CML (van der Loop et al., 1996). C'est une protéine structurale associée aux filaments d'actine et exprimée dans les muscles lisses viscéraux et vasculaires (Christen et al., 1999). Cependant, son expression est rapidement réprimée par la mise en culture des cellules ainsi que par les lésions dues à l'angioplastie transluminale, indiquant donc qu'elle est modulée *in vitro* et *in vivo* (Bar et al., 2002).

- ***La protéine du « muscle lisse 22α*** » (SM22α), est une protéine de 22 kDa, qui contient des séquences de motifs identiques à la calponine. Dans la chronologie du développement, son expression est contrôlée parallèlement à celle de la calponine (Li et al., 1996). Elle est presque exclusivement exprimée dans les CML (Chiavegato et al., 1999; Roelofs et al., 1998) mais elle reste peu connue et mal identifiée.

- ***La chaîne légère de la myosine*** (SM-MLC) existe sous deux isoformes de 17 kDa (Erdodi et al., 1987; Hasegawa et al., 1992; Helper et al., 1988; Kamm and Stull, 1985). La phosphorylation des chaînes légères régulatrices (MLC20) provoque un changement de conformation de la myosine qui passe alors dans une conformation plus allongée et capable de se lier avec l'actine (myosine activée).

- ***La chaîne lourde de la myosine*** (SM-MHC) est exprimée sous différentes variantes dans les CML vasculaires : SM-1 (204 kDa) et SM-2 (200 kDa) (Babij et al 1992). La SM-2 est un marqueur de différenciation très avancé des CML. Elle est constituée d'une tête globulaire et d'une queue en hélice α. La MHC a une activité ATP-asique qui permet la contraction musculaire. *In vitro*, les cellules confluentes quiescentes présentent une forte proportion d'isoforme spécifique du muscle lisse (SMHC) tandis que les cellules non confluentes, mitotiques, expriment davantage les isoformes non musculaires (NMHC).

II.1.3. Fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires

Les CML ont un rôle essentiel dans le système vasculaire. Grâce au jeu de la

contraction et de la relaxation, elles régulent le débit sanguin local et la pression artérielle moyenne :

- ***Adaptation du débit sanguin*** : le stress ou l'exercice va provoquer une redistribution des débits sanguins, l'apport de sang devenant plus important au niveau du cœur et des muscles au détriment des organes digestifs et de la peau. Cette redistribution est la conséquence d'une demande accrue en dioxygène (O_2) du cœur et des muscles. En effet, la consommation en O_2 des muscles dans le cas d'un exercice intense peut être multipliée par cent. Cette redistribution permet une réponse adaptée de l'organisme à une augmentation locale des besoins. De même, au moment de la digestion, le flux sanguin augmente dans les organes digestifs.

- ***Thermorégulation*** : la température influence directement la vasoconstriction. En effet, le sang se refroidit en surface, au niveau de la peau où les échanges thermiques sont possibles. La distribution du sang au niveau de la peau favorise la déperdition de température. Au contraire, pour diminuer les échanges thermiques avec l'extérieur, la distribution du sang se fait au profit d'une circulation plus profonde.

- ***Brèche vasculaire :*** en cas de brèche vasculaire, sous l'action de différents médiateurs libérés localement, une vasoconstriction va avoir lieu, limitant ainsi la perte de sang. En cas de perte importante de sang, l'hypovolémie va entraîner une hypotension par retour insuffisant du sang jusqu'au coeur. Afin de maintenir un apport en O_2 constant dans les organes vitaux, c'est-à-dire le cerveau et le cœur, une redistribution des flux s'effectue au détriment des autres organes.

La contraction et la relaxation des CML aboutissent à la constriction ou à la dilatation de la lumière des vaisseaux. Ce phénomène de vasoconstriction est principalement régulé par les cellules endothéliales, situées à proximité des CML, en réponse à des stimuli biochimiques ou mécaniques. Les CE régulent ainsi le flux sanguin et donc l'approvisionnement adéquat des différents organes.

II.2. Les cellules endothéliales

II.2.1. Description des cellules endothéliales

Les CE sont des cellules pavimenteuses, de 25 à 50 µm de long sur 10 à 15 µm de large (figure 8) (Legrand et al., 1987).

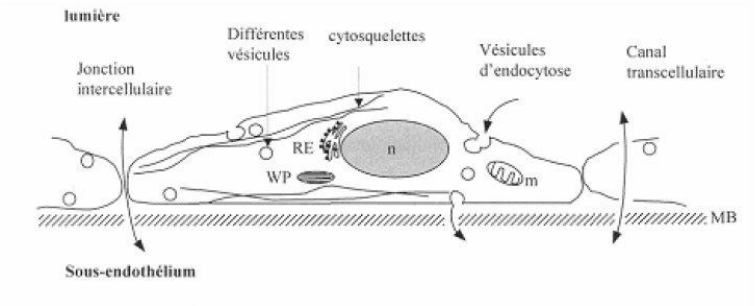


Figure 8 : **Schéma d'une cellule endothéliale vue en coupe transversale.**

(D'après Withfield 1996). m : mitochondrie, RE : reticulum endoplasmique, MB : membrane basale, n : noyau, WP : corps de Weibel-Palade.

Les CE sont allongées dans le sens du flux sanguin par déformation de leur cytosquelette riche en filaments d'actine. Ce sont des cellules polarisées :

- par leur base, elles s'implantent dans une MEC sous-endothéliale complexe faite de macromolécules de nature collagénique et de protéines adhésives ;

- par leur face apicale vasculaire, elles sont en contact avec le sang. Les CE sont reliées entre elles par des jonctions cellulaires serrées permettant la formation d'une barrière étanche. Leur membrane plasmique est pourvue de nombreuses molécules d'adhésion qui sont le siège d'interactions avec les cellules sanguines. Une des principales caractéristiques des CE, permettant d'ailleurs leur phénotypage, est la sécrétion du facteur von Willebrand (vWF) qui joue un rôle important dans le recrutement des plaquettes (Groot et al., 2007; Wall et al., 1980).

Les CE se renouvellent et se multiplient lentement, à l'exception de certaines régions vasculaires telles que les orifices et les bifurcations, où les forces hémodynamiques le long de

la paroi sont plus complexes et favorisent leur prolifération. C'est d'ailleurs aux niveaux des bifurcations des gros vaisseaux artériels et de l'abouchement des vaisseaux collatéraux, que les lésions précoces d'athérosclérose se localisent préférentiellement (Boneu, 1997).

Selon leur emplacement au niveau de l'arbre vasculaire, il existe une grande hétérogénéité de CE (taille, forme, emplacement du noyau) (Aird, 2003). C'est ainsi que le noyau de la plupart des CE aortiques est placé sous l'axe longitudinal de la cellule, alors que dans la majorité des CE de veine cave inférieure, il est placé au dessus (Silkworth et al., 1975). De plus, les noyaux des CE d'aortes sont orientés parallèlement au flux sanguin et se réalignent si celui-ci change de direction (quand les vaisseaux sont remplacés chirurgicalement) (Flaherty et al., 1972).

II.2.2. Caractérisations phénotypiques des cellules endothéliales

Plusieurs marqueurs spécifiques des CE existent. Ils peuvent être classés en 2 catégories : les marqueurs membranaires et les marqueurs intracellulaires.

II.2.2.1 Marqueurs extracellulaires

Les marqueurs exprimés à la surface de la membrane plasmique sont les suivants :

- ***Le CD31*** (ou PECAM-1 = molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales) est une protéine transmembranaire d'une masse moléculaire d'environ 135 kDa, affiliée à la superfamille des immunoglobulines. Les ligands hétérophiles comprennent les glycosaminoglycanes de sulfate d'héparane, l'héparine et l'intégrine αvβ3. CD31 joue un rôle dans les interactions adhésives entre cellules endothéliales adjacentes et également entre leucocytes, monocytes et cellules endothéliales (diapédèse/migration).

- ***La VE-cadherine*** (*vascular endothelial cadherin* ou CD144) est une protéine de 120 kDa appartenant à la famille des cadhérines et comportant 5 domaines extracellulaires. Dans le cytoplasme, elle est reliée à l'actine du cytosquelette. La VE-cadhérine joue un rôle dans les liaisons homophiliques entre les cellules endothéliales et se trouve localisée principalement au niveau des jonctions cellulaires. Elle est exprimée de façon constitutive et

joue un rôle dans de nombreuses fonctions endothéliales telles que la migration, la survie cellulaire ou l'inhibition de contact.

- ***Le récepteur 2 au VEGF*** (VEGF-R2) est de type tyrosine-kinase et est impliqué dans le développement de l'endothélium vasculaire. Il est exprimé au niveau des CE chez l'adulte, mais également au cours du développement embryonnaire. Sa masse moléculaire est comprise entre 210 et 230 kDa. La fixation du VEGF provoque la dimérisation de son récepteur. Une autophosphorylation du récepteur s'en suit, qui stimule alors les voies de transmission du signal. L'interaction du VEGF avec son récepteur nécessite la présence de protéoglycanes et notamment d'héparine. Le VEGR-2 est inducteur de la réponse proliférative des CE (Colavitti et al., 2002; Shalaby et al., 1995; Waltenberger et al., 1994).

- ***La E-sélec*tine** (ou CD62E) est une protéine de 97 à 115 kDa appartenant à la superfamille des sélectines. La E-sélectine est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des CE préalablement stimulées par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor α*) ou l'interleukine 1α. Elle joue un rôle dans la diapédèse leucocytaire et dans l'interaction des neutrophiles avec les CE.

II.2.2.2 Marqueurs intracellulaires

Les marqueurs intracellulaires sont les suivants :

- ***e-NOS*** (*endothelial nitric oxide synthase*) est une enzyme exprimée de façon constitutive, responsable de la synthèse de NO par les CE. D'une masse moléculaire de 140 kDa, cette enzyme contient un domaine oxygénase en position N-terminale et un domaine réductase en position C-terminale. NO synthétisé a une action vasodilatatrice au niveau de la paroi artérielle.

- ***Le facteur von Willebrand*** (vWF) est une glycoprotéine multimérique dont la masse moléculaire est comprise entre 500 kDa et 10 000 kDa. La proteine vWF est exprimée à la fois dans les CE et les mégacaryocytes (Denis, 2002; Werner et al., 1992). Le vWF est présent dans le plasma, les corps denses de Weibel-Pallade des CE, les granules alpha des mégacaryocytes et des plaquettes qui en dérivent, ainsi que dans la matrice subendothéliale de

la paroi des vaisseaux. Il joue un rôle de médiateur dans l'adhésion plaquettaire et la formation du caillot sur les sites des lésions vasculaires, et sert de transporteur pour le facteur VIII dans le plasma.

- ***L'incorporation d'acétyl-LDL*** couplé avec une sonde fluorescente (*Dil-acetyled Low Density Lipoprotein*) permet d'identifier les CE des autres types de cellules vasculaires (CML et fibroblastes) (Gaffney et al., 1985).

II.2.3. Fonctions des cellules endothéliales

Véritable interface entre le sang et la paroi vasculaire, l'endothélium exerce un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques fondamentales :

- une barrière de perméabilité sélective qui permet et régule les échanges de molécules de tailles variables, principalement glucose et acides aminés. La perméabilité sélective de cette interface est essentielle, notamment lors de la réponse inflammatoire.

- le tonus vasculaire *via* la sécrétion de substances vasoconstrictrices (endothéline) et vasorelaxantes (NO).

- l'hémostase et la coagulation : anti-coagulation et pro-coagulation, de façon à maintenir la perméabilité vasculaire (Sahni, 2007; Stehbens, 1965) ; la surface luminale de la CE est physiologiquement thromborésistante, alors que la surface abluminale adhère fortement aux macromolecules thrombogènes du sous-endothélium.

- la réponse immunitaire : mobilisation des globules blancs (Sahni, 2007). La CE exprime à la surface vasculaire, de façon constitutive ou après induction biochimique ou mécanique, des récepteurs d'adhésion pour les leucocytes ; parmi eux, l'expression de la E-sélectine reflète l'inflammation des CE.

La E-sélectine est restreinte aux CE activées par les cytokines telles que l'interleukine-1 ou TNF-α. Elle est impliquée dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium activé, et son expression abondante sur les CE présentes au niveau des lésions inflammatoires est corrélée avec l'afflux de neutrophiles (Lawson et al., 1999; Wagener et al., 1997).

II.2.4. Contraintes mécaniques imposées aux cellules endothéliales

A cause de leur contact direct avec le sang, les CE sont perpétuellement soumises à des contraintes mécaniques. Selon le type de contrainte, celle-ci engendre diverses réponses des CE afin de les adapter aux conditions environnementales (Davies et al., 1997).

Le flux pulsatile du sang génère 3 types de forces hémodynamiques interdépendantes : la pression hydrostatique générée par le liquide, l'étirement cyclique ou *cyclic stretching* et les contraintes de cisaillement ou *shear stress*.

• ***La contrainte de cisaillement*** (figure 9) correspond aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elle est déterminée par le débit sanguin, la viscosité du sang et le diamètre du vaisseau (Masuda et al., 1982; Ray and Davids, 1970). La valeur moyenne de cette contrainte, dans une portion droite de vaisseau, est comprise entre 1 et 2 Pa, selon le type de vaisseaux et varie à chaque bifurcation. La contrainte de cisaillement agit sur des mécanosenseurs qui activent la CE (White and Frangos, 2007). Un cisaillement laminaire et stable est essentiel à la protection engendrée par les CE contre l'athérosclérose. A l'inverse, quand il est faible ou oscillatoire avec recirculation du sang, il peut conduire à des dysfonctionnements endothéliaux.

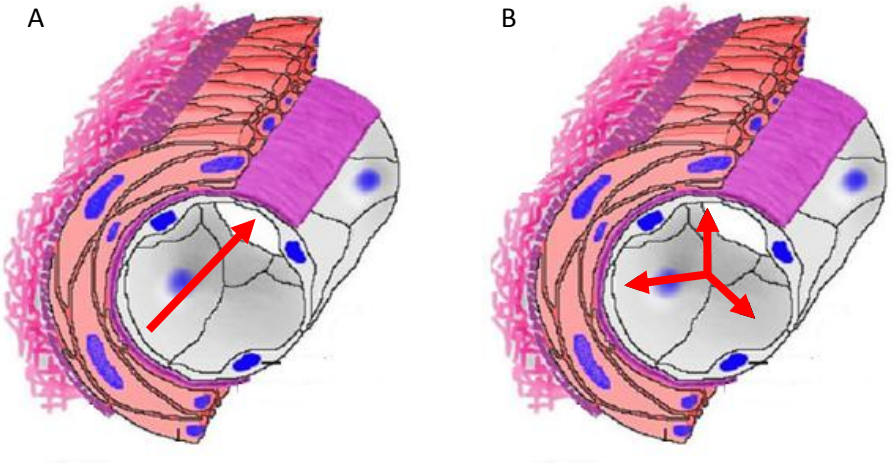


Figure 9 : **Schéma des forces de contraintes appliquées sur la paroi des vaisseaux.**

A. Cisaillement. B. Etirement cyclique.

• ***L'étirement cyclique*** (figure 9) correspond à une distension de la paroi induite par un gradient de pression transmurale (Wang et al., 2000). Il est fonction de l'épaisseur du vaisseau, de sa composition et de la capacité de contraction des cellules musculaires lisses. Le principal effet de l'étirement cyclique est l'induction d'un stress oxydatif au niveau des CE.

• ***La déformation périodique*** de la paroi correspond aux déformations engendrées par les pulsions cardiaques.

Sous l'action des forces mécaniques appliquées par le flux sanguin à l'endothélium, les CE de veines et d'artères présentent des caractéristiques différentes. Au niveau morphologique, les CE de veines sont courtes et larges puisque la pression est peu élevée, alors que les CE d'artères sont longues et étroites et alignées dans le sens du flux sanguin (Dela Paz and D'Amore, 2009). Les jonctions intercellulaires entre les CE dans les artères sont plus serrées que dans les veines. De plus, l'expression de certains gènes codant des facteurs de croissance (VEGF), de certains ligands ou des facteurs de transcription tels que « notch » semble modifiée selon la localisation systémique.

Lorsque le fonctionement de cellules vasculaires (CE et CML) est altéré, cela aboutit au développement de pathologies vasculaires ayant des répercussions importantes sur l'état général du patient.

III. Pathologies vasculaires et chirurgie du pontage associé

Chaque année, 18 millions de personnes dans le monde meurent de maladies cardiovasculaires, ce qui représente la moitié des décès totaux en Europe (Chlupac et al., 2009). En 2005, le coût direct et indirect des maladies cardiovasculaires était estimé à 393 milliards de dollars aux Etats-Unis (Couet et al., 2007).

Les pathologies vasculaires regroupent l'ensemble des atteintes de la paroi artérielle et veineuse. Les étiologies de ces atteintes sont multiples et la plupart ne sont que partiellement élucidées : pathologies inflammatoires et atteintes immunologiques. Plusieurs d'entre elles, touchent l'arbre vasculaire : l'athérosclérose, la thrombose, les anévrismes et la dissection.

L'objet de ce chapitre est d'évoquer les 2 principales atteintes artérielles responsables de l'essentiel des prises en charge médicochirurgicales actuelles pour une pathologie vasculaire : l'artériopathie oblitérante et la maladie anévrismale.

III.1. L'artériopathie oblitérante

III.1.1. Définition

La définition de l'artériopathie oblitérante date de 1958. Encore d'actualité, elle se définit comme « une association variable de remaniement de l'intima des grosses et des moyennes artères » (WorldHealthOrganisationTechnicalReportSeries, 1958) consistant en un accumulation segmentaires de lipides, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts de calcaires, dont l'ensemble (figure 10) est accompagné de modifications de la média.

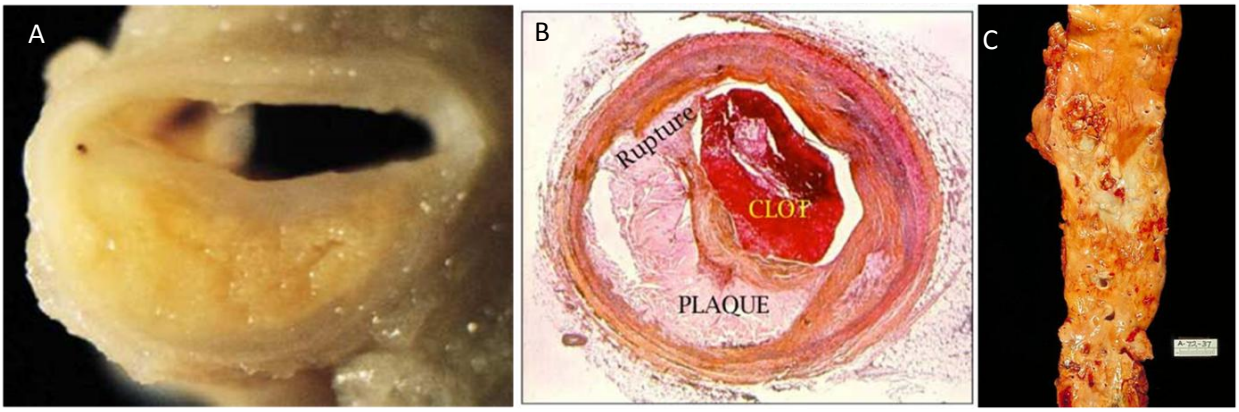


Figure 10 : **Plaque d'athérome.**

A : Photographie d'une coupe transversale de carotide dont la lumière est obstruée par une plaque d'athérome. Un riche noyau lipidique peut être observé au centre de la lésion. B. Photographie d'une coupe histologique transversale d'un vaisseau complétement bouché par une plaque d'athérome. C : Carotide ouverte longitudinalement et laissant entrevoir un fort dépôt de lipides sur les parois de la lumière. *www.medicalmyths.files.wordpress.com*

III.1.2. Epidémiologie

L'artériopathie oblitérante ou athérosclérose est l'une des premières causes de mortalité dans les pays occidentaux, et chaque année en France, 120 000 infarctus du myocarde et 130 000 accidents vasculaires cérébraux sont dénombrés (Bonnet, 2005). Le vieillissement de la population et l'absence de résultats probants dans la lutte contre les facteurs de risques (sédentarité, tabagisme) annonçent une augmentation de la fréquence de cette maladie dans les années à venir. Il en résulte une prise en charge et un coût majeur pour notre système de santé, ce qui constitue un enjeu considérable en terme de santé publique.

III.1.3. Physiopathologie

L'athérosclérose résulte d'un trouble du métabolisme des lipides qui aboutit à leur accumulation sous formes d'une plaque d'athérome au niveau de l'intima (figure 11). Les mécanismes intimes de ces dépôts ne sont pas encore élucidés. Cependant un trouble du métabolisme des lipides aboutit à une présence de LDL dans la circulation sanguine. Ces LDL franchissent la barrière endothéliale et subissent un phénomène d'oxydation. Des phénomènes d'adhésion se produisent alors entre les LDL, les CE activées, et des cellules circulantes telles que des monocytes et des lymphocytes. Une réaction inflammatoire s'instaure, provoquant la transformation des monocytes en macrophages. Ces derniers vont stocker les LDL puis les transformer en cellules spumeuses (figure 11 : phase 1 à 4). Dans une seconde phase (figure 11 : phase 5 à 6), les CML de la média migrent vers l'intima, où elles se mettent à produire de la MEC, qui va alors former une chape fibreuse autour des cellules spumeuses regroupées en core lipidique : la chape et le core constituent alors la plaque athéromateuse (figure 11 : phase 7).

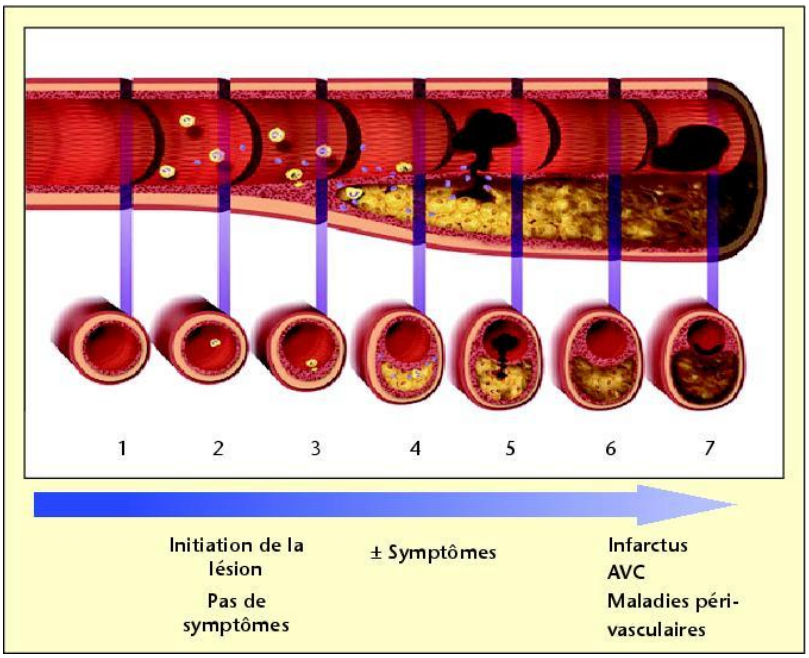


Figure 11 : **Les différents stades de développement de la plaque athéromateuse.**

www.john-libbey-eurotext.fr

La taille de la plaque d'athérome évolue lentement, devenant de plus en plus importante. Au début, la lumière du vaisseau est maintenue constante par augmentation du calibre global de l'artère qui compense la présence de la plaque athéromateuse. Ce phénomène permet de limiter les conséquences hémodynamiques pendant la phase de croissance asymptomatique de la plaque (Glagov et al., 1987). Cependant, avec la progression de la plaque, la compensation vasculaire n'est plus possible et une réduction de la lumière du vaisseau est observée, diminuant localement le débit sanguin. Lorsque la plaque oblitère totalement l'artère, on parle de sténose.

III.1.4. Conséquences et complications

Les complications peuvent se localiser au niveau de la plaque d'athérome elle-même, où peut survenir une thrombose locale. Par ailleurs, des fragments de la plaque peuvent migrer consécutivement à la rupture ou à la fragmentation de la plaque et conduire à de nouvelles thromboses.

Les symptômes de l'artériopathie oblitérante sont variables en fonction de la localisation de la plaque. La maladie athéromateuse est une maladie ubiquitaire. Cependant

les bifurcations artérielles constituent des sites privilégiés pour le développement de la maladie, principalement en raison d'une plus grande susceptibilité aux perturbations hémodynamiques.

L'oblitération chronique des artères aboutit généralement à une ischémie des tissus en aval par baisse de la perfusion sanguine distale.

III.1.5. Prise en charge

L'importance de la mortalité et de la morbidité induites par cette pathologie explique les efforts et les moyens considérables déployés pour lutter contre l'artériopathie oblitérante.

La sténose des carotides a des conséquences particulièrement importantes puisque 10 % des infarctus cérébraux annuels en France (soit 13 000 sur un nombre total de 130 000), sont dus à une sténose de la bifurcation carotidienne. D'ailleurs, une sténose oblitérante de la carotide interne conduit secondairement à un accident vasculaire cérébral (AVC). Les AVC, qui représentent la troisième cause de mortalité, sont responsables d'un nombre très important d'invalidité définitive.

Le traitement associé à cette pathologie consiste à rétablir la perfusion distale physiologique soit par des techniques endovasculaires telles que la pose de stents, soit par des méthodes chirurgicales conventionelles comme les pontages qui représentent la méthode de référence. Cependant, la chirurgie n'est envisagée que lorsque le rétrécissement de l'artère est supérieur à 70 %. Ces pontages nécessitent des substituts prothétiques de petits calibres, qui font l'objet de notre travail et dont nous préciserons plus loin le cahier des charges.

III.2. Les substituts vasculaires

Les substituts vasculaires utilisés actuellement sont le fruit de longues années de recherche et de perfectionnement. D'important progrès ont été apportés à ces substituts depuis la réalisation de la première greffe vasculaire. Quatre dates importantes marquent le début de l'ère chirurgicale vasculaire moderne.

La première : en 1906, Jose Goyannes réalise la première interposition d'une greffe veineuse à la place d'un segment anévrismal artériel chez l'homme.

La seconde : en 1949, le chirurgien français Jean Kunlin est le premier à utiliser une veine saphène pour le traitement chirurgical d'une carotide présentant des lésions athérosclérotiques.

La troisième : en 1951, première utilisation d'un substitut artériel en chirurgie vasculaire chez l'homme par Oudot. Il s'agissait alors de l'implantation d'une allogreffe artérielle (Chakfé, 2004).

La quatrième : en 1952, le premier pontage vasculaire synthétique fut effectué par Voohrees par implantation d'une prothèse textile poreuse (Chakfé, 2004; Voorhees AB Jr, 1952).

Le chirurgien dispose à l'heure actuelle de différents outils, en premier lieu les prothèses vasculaires proprement dites. Les prothèses vasculaires se classent comme suit :

- Les substituts biologiques (figure 12) : greffes (autogreffes veineuses et artérielles, homogreffes veineuses) et bioprothèses (matériaux qui ont été traités chimiquement ou tannés). Alors que les greffes constituent réellement un tissu vivant, les bioprothèses sont généralement inertes.



Figure 12 : **Substituts biologiques naturels** *(ici artère ombilicale humaine).*

- Les prothèses artérielles synthétiques (figure 13) : Téflon® ou polytétrafluoroéthylène, Dacron® ou polyéthylène téréphtalate, et polyuréthane. Ces prothèses s'incorporent dans les tissus et cicatrisent par une réorganisation de la matrice thrombotique. Ces différents types de prothèses sont l'objet de développements permanents visant à

augmenter leurs performances cliniques en optimisant leurs propriétés de thrombogénicité et de biostabilité.

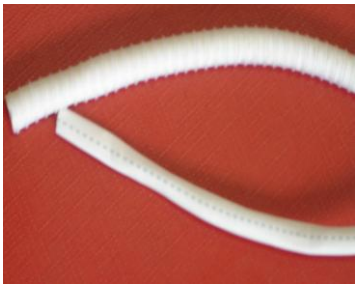


Figure 13 : **Substituts vasculaires synthétiques : Dacron® (tube supérieur) et Téflon® (tube inférieur).**

III.2. 1. Substituts biologiques

Il s'agit de matériels vivants et viables n'ayant subi aucun traitement susceptible de les rendre inertes. Parmi les substituts biologiques, il faut distinguer les substituts traités et les substituts vrais.

III.2.1.1. Les substituts traités : les bioprothèses

Les bioprothèses sont des substituts biologiques, c'est-à-dire des conduits sanguins non viables traités pour garantir leur inertie biologique. Peu convaincants pour les chirurgiens vasculaires, ces substituts ont été rapidement abandonnés, principalement à cause de leurs mauvais résultats cliniques.

L'hétérogreffe préparée à partir d'artères carotides de bœuf ou de veau traitées à la ficine puis réticulées, constitue un exemple de bioprothèse. Dès 1966, Rosenberg proposait un substitut artériel d'origine bovine. Cependant les études à long terme ont montré une forte incidence de thrombose, d'anévrysme et d'infection (Rosenberg D.M., 1970; Rosenberg et al., 1966; Teebken and Haverich, 2002).

La veine ombilicale humaine traitée au glutaraldéhyde a aussi été envisagée en tant que substitut à cause de sa bonne disponibilité. Cependant, ce substitut artériel a été

rapidement abandonné du fait d'une dégénérescence du greffon vers la dilatation ou l'anévrisme. Par ailleurs, depuis 1995, son utilisation est interdite en France pour des raisons de non-conformité aux normes sécuritaires en vigueur depuis le décret du 24 mars 1994.

III.2.1.2. Les substituts non traités : les greffes vasculaires

Il s'agit de matériels vivants et viables n'ayant subi aucun traitement destiné à les rendre inertes. Parmi ces substituts, on distingue les autogreffes des allogreffes.

Dans le cas d'une autogreffe, le greffon destiné à remplacer le vaisseau malade provient du patient lui-même.

III.2.1.2.1. L'autogreffe

L'autogreffe la plus fréquente est celle de la veine saphène. C'est une veine parcourant la jambe. Son diamètre et sa longueur font d'elle un substitut bien adapté aux pontages fémoraux, poplités et carotidiens. Sa supériorité est principalement attribuée à sa surface luminale endothélialisée. Elle constitue à ce jour le « *gold standard* » (Favaloro, 1968).

L'autogreffe artérielle constitue un substitut artériel idéal du fait de ses caractéristiques mécaniques et de sa grande capacité de cicatrisation. Sa faible disponibilité est sa principale limite.

Avec un taux de succès de 90 % à un an (Arnulf, 1987), l'autogreffe semble être la solution de substitution idéale (Vara et al., 2005). Ce succès est attribué à la présence d'une surface luminale endothélialisée (Lytle et al., 1985). Cependant, un tiers des patients ne dispose pas de vaisseaux utilisables pour un pontage, consécutivement à l'existence de pathologies vasculaires, suite à une chirurgie vasculaire précédente ou à une qualité insuffisante de leur vaisseaux (Edwards et al., 1966; Tiwari et al., 2001; Veith et al., 1979).

III.2.1.2.2. L'allogreffe

Dès 1977, les allogreffes ont été utilisées pour remplacer les conduits vasculaires malades. Cependant, la durée limitée de ces allogreffes, due principalement à la calcification et au développement et ruptures d'anévrysmes, a restreint leur utilisation en chirurgie vasculaire (Teebken and Haverich, 2002). Les allogreffes sont prélevées sur un donneur

décédé par mort clinique. Des banques de tissus ont été créées pour assurer la fourniture aux chirurgiens du substitut recherché. Les conditions de prélèvement et de conservation sont définies pour les articles L. 1243-2, L. 1123-7et R. 1243-3 du code civil, notamment en ce qui concerne l'asepsie et le suivi du devenir sérologique du patient.

La conservation en milieu nutritif à 4°C fournit des greffons vivants riches en cellules, donc doués d'une faible thrombogénicité et résistants à l'infection, mais dont le délai d'utilisation est limité à 45 jours. Pour conserver les greffons plus longtemps, la cryocongélation est utilisée et nécessite la mise en application de précautions indispensables : descente progressive en température et emploi de cryoprotecteur. La cryoconservation diminuerait l'antigénicité du greffon et conserverait un endothélium fonctionnel. Les dégradations pariétales des allogreffes procèdent en grande partie de l'agression immunologique de la paroi artérielle. La décellularisation du greffon avant son implantation, en éliminant les massifs protéiques antigéniques, supprimerait l'immunogénicité du greffon mais sensibiliserait ce dernier à l'infection (Conklin et al., 2002).

Les substituts biologiques restent à l'heure actuelle les meilleurs substituts vasculaires de gros et petits calibres, particulièrement en termes de propriétés mécaniques et de résistance à la suture et aux infections. Malheureusement, chez les patients (souvent âgés) nécessitant ce genre d'interventions, les vaisseaux disponibles pour la greffe sont rares, généralement en mauvais état, sujets à des pathologies vasculaires ou même manquants suite à une précédente opération. En l'absence de substituts naturels disponibles, la solution la plus simple est de se tourner vers les substituts synthétiques (Couet and Mantovani, 2008).

III.2.2. Substituts synthétiques

Dans le domaine cardiovasculaire, l'usage de matériaux polymères a induit des progrès considérables, notamment les substituts artériels à base de textiles synthétiques qui ouvrent une alternative thérapeutique au remplacement de segments artériels lésés.

III.3.2.1. Le polyéthylène téréphtalate (PET)

Le polyéthylène téréphtalate (PET) ou Dacron® occupe une position dominante parmi les matériaux utilisés pour cette application. Le Dacron® fut développé en 1941 par

2 chimistes britanniques, J.R. Dickinson et J.T. Dickinson. Mais c'est seulement en 1952 que DeBakey réalise le premier tube en Dacron destiné à la reconstitution aortique. C'est aujourd'hui le matériau le plus utilisé en routine chirurgicale. Il s'agit d'un polyester disponible sous forme de fibres ou de fils bien connus dans l'industrie textile (Tergal) et utilisé pour la confection de conduits tubulaires tissés ou tricotés (prothèses de Dacron). Ces conduits sont secondairement enduits par un revêtement de protéines réticulées ou directement immergés dans le propre sang du patient de façon à rendre la paroi étanche au sang circulant.

III.2.2.2. Le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) ou Téflon® fut développé par un chercheur de l'entreprise DuPont en 1938 (figure 14).



Figure 14 : **Substitut vasculaire à base de PTFEe / Téflon®.**

La première utilisation du PTFEe fut rapportée en 1976. Le téflon est connu pour son inertie chimique et sa grande stabilité thermique. Il possède beaucoup d'atouts par rapport au PET (biostabilité, stérilisation par la chaleur). Les parois des prothèses en PTFEe sont fines : de 5 à 7 mm. Le PTFEe a bénéficié d'une avancée technologique régulière.

Le PTFEe est le seul matériel synthétique dont l'infection peut être traitée localement. Le problème majeur de ce matériau est la forte incidence de thromboses précoces le plus souvent inexpliquées ; en l'absence de problème technique, la perméabilité est habituellement restaurée par une simple thrombectomie. La surface luminale des prothèses en PTFEe peut également être modifiée de façon à améliorer la perméabilité du greffon. C'est le cas des

prothèses de PTFEe recouvertes de carbone et d'agents anticoagulants tels que l'héparine (Walpoth et al., 1998). Le recouvrement des prothèses par du carbone est basé sur la charge des différents éléments sanguins et vasculaires. L'endothélium des vaisseaux sanguins est électronégatif (Avci-Adali et al., 2010). Une répulsion électrostatique entre les éléments sanguins (électronégatifs) et l'intima explique l'absence de thrombogénicité (Sawyer et al., 1980). Sur le matériel prothétique synthétique, l'enduction de carbone rend la surface interne électronégative, ce qui réduit l'adhésion plaquettaire et diminue la thrombogénicité de surface.

Dans le cas des prothèses en PTFEe extensible, la propriété recherchée est la souplesse, de manière à diminuer le risque de plicature au passage des plis de flexion et à améliorer l'ajustement de la longueur de la prothèse. La prothèse est extensible dans le sens longitudinal. Le PTFEe extensible, une fois étiré, est identique au PTFEe standard.

Les prothèses en PTFEe microporeux possèdent une structure dite « microporeuse » obtenue par chauffage du polymère extrudé à une température supérieure à sa température de fusion. Les résultats enregistrés chez le lapin avec ce type de substitut sont décevants car ils ne présentent qu'un perméabilité de l'ordre de 12 % à l'issue de sept mois (Watanabe, 1980). Par ailleurs, aucune étude ne montre la supériorité du PTFEe par rapport au Dacron® (Chlupac et al., 2009; Roll et al., 2008).

III.2.2.3. Le polyuréthane

Les prothèses de polyuréthane (PU) ont plusieurs avantages : elles sont microporeuses, présentent une compliance[1] meilleure que celles en Dacron® et en PTFE et sont biodégradables. Le tissu conjonctif peut ainsi pénétrer la prothèse pour assurer la cohésion mécanique ultérieure. Hydrolysables, les prothèses en PU sont peu utilisées malgré leurs bonnes propriétés mécaniques. De plus, souvent thrombosées, elles s'infectent et présentent des taux de perméabilité plus faible que le Dacron® et le PTFE. Par ailleurs, elles sont plus sujettes à la formation d'anévrisme. Quelques prothèses en PU sont disponibles. Le modèle le mieux évalué est celui de l'Ontario Foundation Research (Leidner et al., 1983). Le polyuréthane liquide est pulvérisé sur un mandrin rotatif. Au contact de l'air, il se solidifie en formant des microfibrilles constituant l'architecture de la prothèse. La porosité est fonction de la densité des fibres utilisées et de l'épaisseur pariétale. Les prothèses en PU chez l'animal

[1] Compliance : capacité du vaisseau à se déformer sous la contraint d'une pression, puis à retrouver son état initial.

avaient tendance à se dilater, probablement en raison du manque de stabilité et de la fragilité de la paroi. Pour diminuer le risque de dilatation à long terme, la prothèse implantée chez l'homme comporte un dérivé plus stable du polyuréthane, le coréthane, renforcé par un treillis externe en polyéthylène téréphtalate. Une imprégnation interne à la gélatine héparinée réduit le saignement transprothétique péri-opératoire et le risque de thrombose précoce.

Actuellement, seul le Dacron® et le PTFEe sont utilisés en chirurgie vasculaire. Malgré des atouts très convaincants (disponibilité, biocompatibilité), les substituts synthétiques ne sont pas adaptés au remplacement des vaisseaux de petits calibres. En effet, si elle est prolongée pour les artères de gros calibres, la perméabilité à long terme sur des substituts de faibles diamètres (inférieur à 6 mm) diminue brutalement. En effet, leur occlusion peut se produire durant différentes périodes post-implantation. On distingue :

- l'occlusion précoce (30 jours) due à des problèmes techniques liés à un faible flux sanguin et à une thrombose aïgue provoquée par l'activation de la cascade de la coagulation ;

- l'occlusion moyenne (3 mois à 2 ans), principalement au niveau distal de l'anastomose, due à un rétrécissement de la lumière du substitut consécutivement à une hyperplasie intimale. Cette dernière consiste en la prolifération de CML associée à un phénotype de synthèse de la MEC. Les causes de ce mécanisme ne sont pas clairement élucidées. Il semblerait cependant que certains facteurs de risques lui soient liés : perturbation du flux sanguin, endommagement de la paroi du vaisseau et différence de compliance entre vaisseau natif et substitut vasculaire implanté ;

- l'occlusion tardive (supérieure à 2 ans) est due à la dégénérescence de lésions athérosclérotiques sous-jacentes.

Par ailleurs, la compliance de ces substituts n'est pas satisfaisante (Abbott et al., 1987; Tiwari et al., 2002). Enfin, il est très important de souligner que la surface luminale des prothèses ne s'endothélialise que partiellement après implantation chez l'homme (Seifalian et al., 2002), favorisant de surcroît le développement de thrombose et une absence de cicatrisation.

Finalement, malgré les progrès réalisés dans la conception ou la modification des

matériaux prothétiques, les prothèses synthétiques de petits calibres représentent toujours une alternative médiocre face aux vaisseaux autologues.

III.3. Le cahier des charges du substitut vasculaire idéal de petit calibre

Les vaisseaux de petits calibres (3 à 5 mm) tels que les artères carotidiennes et fémorales sont particulièrement sujets aux lésions athérosclérotiques. Les substituts actuellement disponibles, qu'ils soient biologiques ou synthétiques, ne satisfont pas au remplacement des vaisseaux de petits calibres, principalement à cause de leur potentiel hautement thrombogène. Le développement de substituts vasculaires de petits calibres est un immense challenge. Le substitut vasculaire idéal de petit calibre doit remplir un cahier des charges très strict (tableau II) :

- absence de thrombogénicité ;
- absence d'immunogénicité et non inflammatoire par lui-même ou par ses produits de dégradation ;
- bonnes propriétés mécaniques : perméabilité et compliance. Le vaisseau doit être suffisamment résistant pour supporter de fortes pressions internes, mais aussi présenter une élasticité proche de celle du vaisseau adjacent ;
- grande disponibilité ;
- bonne résistance à la suture ;
- résistance aux infections ;
- faible coût.

Tableau II : **Propriétés du substitut vasculaire idéal conçu par l'ingénierie vasculaire.**

Propriétés biologiques	Propriétés mécaniques	Propriétés physiques	Avantage commercial
Vasoréactivité : dilatation et contraction en réponse aux stimuli nerveux et chimiques	**Résistance aux pressions physiologiques**	Modulabilité particulièrement du point de vue de la **longueur** et du **diamètre**	**Court délais de livraison e**ntre la demande et l'implantation
Non thrombogénicité	**Absence de plicature** même au niveau de la jointure	**Porosité**	**Faible coût**
Stablité dans le temps : ne pas favoriser l'apparition d'anévrysme	**Résistance à la suture**	-	-
Biocompatibilité : ni inflammatoire, ni toxique, ni carcinogène ou immunogène	**Compliance radiale et pulsatilité**	-	-
Résistant aux infections	-	-	-

L'obtention de ce substitut artificiel idéal semble possible grâce à une discipline en plein essor appelée ingénierie tissulaire des vaisseaux.

IV. Ingénierie vasculaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine de recherche multidisciplinaire à l'interface entre la biologie, la science des matériaux et la clinique, destiné à fournir des tissus vivants en vue de rétablir, maintenir ou améliorer les fonctions d'un organe. Pour concevoir ce nouveau type de biomatériaux, une connaissance approfondie des relations structure-fonction du tissu dans son environnement est nécessaire. Pour palier aux besoins massifs et à la faible disponibilité des substituts vasculaires de petits calibres efficaces, l'ingénierie tissulaire constitue donc une source précieuse d'espoir dans le domaine des greffes vasculaires.

Deux composantes majeures du cahier des charges du substitut vasculaire idéal focalisent toute l'attention en ingénierie tissulaire vasculaire : la compliance et la

thrombogénicité. Ces composantes font l'objet d'intenses investigations (tableau III) à travers le développement de matrices vasculaires et de conduits vasculaires innovants.

Tableau III : **Conduits vasculaires de petits calibres mis au point en ingénierie vasculaire.**

Matrice	Cellules	Coating	Perméabilité	Référence
Sous-muqeuse d'intestin grêle de porc et collagène	Aucune	Héparine	100% ≤ 90 j	(Huynh et al., 1999)
Sous-muqueuse d'intestin grêle de porc et de chien	Aucune	Aucun	≥ 75% à 5 ans	(Lantz et al., 1993)
Aorte de porc décellularisée	CE et fibroblates	Aucun	Pas de résultats	(Bader et al., 2000)
Artère iliaque décellularisée de porc	EPC	Aucun	100% ≤ 130 j	(Kaushal et al., 2001)
Uretère bovin décellularisé	Aucun	Aucun	100% ≤ 10 ms	(Clarke et al., 2001)
Carotide de porc décellularisée	Aucun	Héparine	100% ≤ 67 j	(Conklin et al., 2002)
PGA	CML	Aucun	100% ≤ 24 j	(Niklason et al., 1999)
PGA-PHA	CML, CE et fibroblastes		100% ≤ 150 j	(Shum-Tim et al., 1999)
PU	CML	Aucun	92% ≤ 1 sem	(Yue et al., 1988)
PTFE		Aucun	80% ≤ 21 j	(Sparks et al., 2002)
Dacron® et collagène	CML et CE		Non testé	(Baguneid et al., 2004) (Weinberg and Bell, 1986)
PU/Dacron® et collagène et	CML, CE et	Aucun	75–100% 16–26	(Miwa et al., 1993) (Miwa and Matsuda,

dermatan sulfate	fibroblastes		sem	1994)
PU et collagène	EPC	Aucun	92% ≤ 3 ms	(He et al., 2003)
PU	CML et CE	Aucun	100% ≤ 4 sem	(Ratcliffe, 2000)
Tubes de silicone	MEC, fibroblastes et cellules mésenthéliales	Aucun	67% ≤ 4 ms	(Campbell et al., 1999)
Tubes de silicone entourés d'un feuillet de collagène		Protamine et héparine	73% ≤ 8 sem	(Tsukagoshi et al., 1999)
PTFE	CML, CE et fibroblastes	Aucun	50% ≤ 1 sem	(L'Heureux et al., 1998)
Verre et collagène	CE et fibroblastes	Aucun	Non testé	(Berglund and Galis, 2003)
Verre et collagène	CML et CE	Aucun	64-100% ≤ 6 ms	(Hirai and Matsuda, 1996; Kobashi and Matsuda, 1999a; Kobashi and Matsuda, 1999b) (He and Matsuda, 2002)

Durée : j = jours ; sem = semaine ; ms = mois

IV.1. Matrices synthétiques composites

Ce sont des matrices construites à l'aide de matériaux synthétiques et de substances biologiques telles que le collagène.

IV.1.1. Matrices synthétiques composites biodégradables

Ce sont des matrices créées à partir de substances que l'on ne trouve pas dans la nature, mais qui, au cours temps, se dégradent après implantation dans l'organisme.

L'équipe de Yue a réalisé un substitut à base de PU et de CML qui, après implantation, montre un taux de perméabilité supérieur à celui des substituts composites non cellularisés (Yue et al., 1988).

Deux copolymères de l'acide polyglycolique (PGA) et le polyhydroxyalkanoate (PHA) ont également été utilisés par Shum-Tim et al. (Shum-Tim et al., 1999) afin de reconstituer un vaisseau. La construction obtenue par l'association du polymère avec des CML, des fibroblastes et des CE présente un excellent taux de perméabilité à 150 jours.

Le PGA modifié par de la soude, a été utilisé par Niklason (Niklason et al., 2001), pour constituer un tube vasculaire. Le substitut a ensuite été ensemencé avec des CE et soumis au cisaillement avant d'être implanté. Les premiers résultats montrent un taux de perméabilité de 100 % après 4 semaines d'implantation chez le porc. Ce dernier modèle permet le développement de substituts vasculaires dotés d'une bonne compliance et d'une bonne perméabilité. Cependant les études rapportées à long terme sont rares. De plus, le temps de fabrication du substitut est une donnée de première importance, étant donné l'urgence de certaines situations. En effet, dans un premier temps, les cellules ont besoin d'être extraites et amplifiées *in vitro* de façon à en obtenir une quantité suffisamment importante. Puis il est nécessaire de faire maturer ensemble les cellules et la matrice *in vitro* avant que la construction puisse être utilisée en tant que prothèse chirurgicale.

IV.1.2. Matrices synthétiques composites permanentes

En 1986, Weinberg et al. ont été les premiers à proposer un biovaisseau «moulé» composé de 3 couches distinctes : une couche interne constituée de CML et une couche externe constituée de fibroblastes bovins, l'intima étant obtenue par ensemencement de CE dans la lumière du vaisseau (Weinberg and Bell, 1986). Afin de rendre les structures mécaniquement résistantes, l'utilisation d'une structure synthétique de renfort telle que le Dacron® a été proposée en vue d'améliorer la pression de rupture. Grâce à cette technique, la pression de rupture passe de 10 à 120 mm Hg, permettant du même coup l'implantation *in vivo* de ces substituts. Une perméabilité de 65 % est constatée à 6 mois (Hirai and Matsuda, 1996).

Le modèle proposé par Weinberg et Bell remplit la majorité des critères physiologiques et physiques requis pour un substitut naturel. Outre la présence de Dacron®, le

substitut proposé ici se distingue cependant des vaisseaux natifs pour deux raisons :

- l'absence d'élastine ;
- la densité d'ensemencement et l'orientation longitudinale des CML.

Sparks et al. ont eu l'idée de recouvrir le PTFE avec du péritoine. Par ce procédé, la surface viscérale mésothéliale devient la surface luminale du conduit (Sparks et al., 2002). Après implantation carotidienne chez le lapin, le taux de perméabilité s'élève à 80 % au bout de 21 jours alors que du PTFE seul montre un taux de perméabilité de 20 % seulement.

IV.2. Reconstitution vasculaire : prothèse à plusieurs épaisseurs

La technique de reconstitution vasculaire se base sur l'utilisation de moules et/ou de mandrins pour conférer une structure qui respecte les proportions du vaisseau à remplacer, tout en utilisant des substances biologiques.

• Matsuda et al. ont ainsi développé un hybride tubulaire à partir d'une solution de collagène de type I et de CML, coulée dans un moule tubulaire, puis congelée (Matsuda and Hasegawa, 1999). Après décongélation, le tube est mis en culture 7 jours et est finalement ensemencé avec des CE (figure 15). L'un des défauts du système est une résistance à la pression relativement faible, n'excédant pas 100 mm Hg, rendant toute utilisation impossible, même pour un remplacement veineux. Après renforcement de la structure par du Dacron®, la structure a été implantée sur une période de 4 semaines chez le chien. Sur 14 chiens implantés, seuls 9 présentent une veine cave perméable. D'autres expérimentations ont été effectuées avec d'autres types de renforcement, tels que le polyester et des mèches de polyuréthane-nylon, et ont montré des compliances et des résistances à la pression meilleures quand la couche de collagène est placée à l'extérieur du tube.

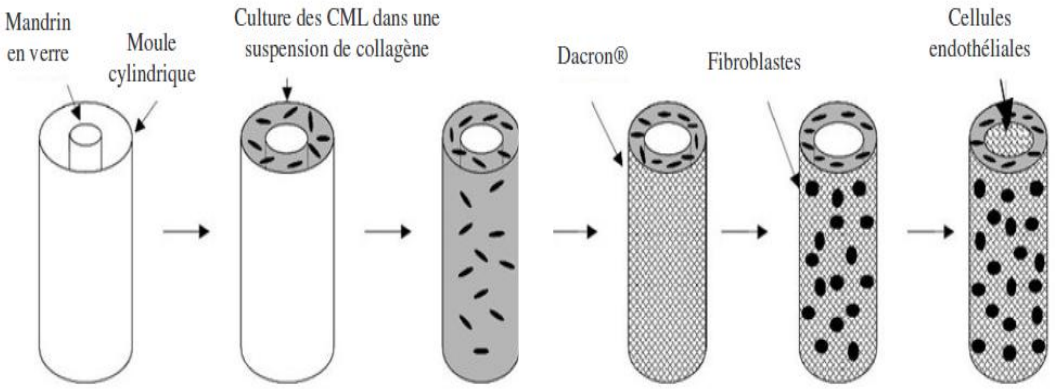


Figure 15 : **Schéma d'une construction à base de collagène.**
(Kakisis et al., 2005)

• Une technique conçue par L'Heureux et son équipe a permis la construction d'un substitut vasculaire en cours d'évaluation clinique (figure 16).

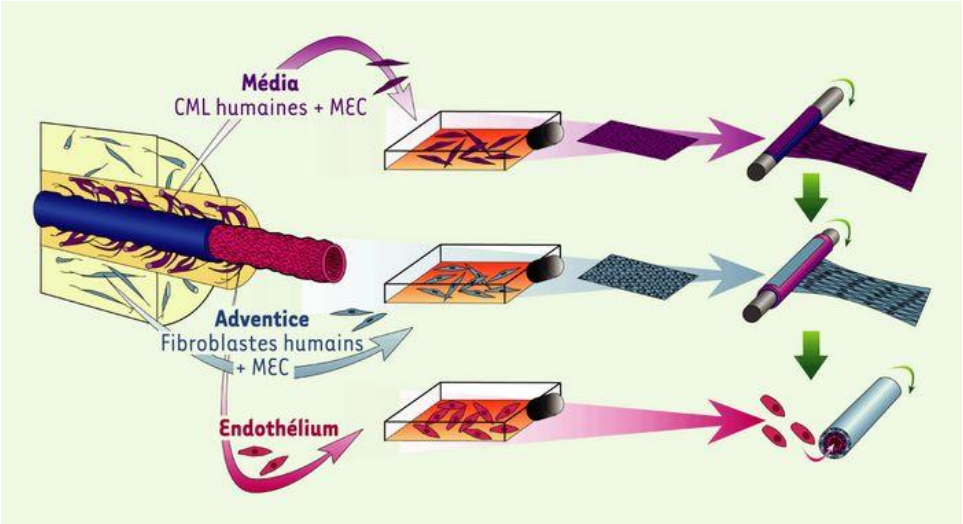


Figure 16 : **Production de vaisseaux humains par auto assemblage**. *Chacun des trois types cellulaires est cultivé à partir de tissus humains ; les cellules endothéliales et musculaires lisses sont respectivement isolées de l'endothélium et de la média du cordon ombilical, et les fibroblastes du derme. Des feuillets tissulaires produits à partir des cellules musculaires lisses (cultivées dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique pour favoriser la formation de la matrice extracellulaire) et des fibroblastes sont enroulés autour d'une matrice déposée sur un mandrin pour reconstituer la média et l'adventice. Le mandrin est ensuite enlevé et les cellules endothéliales sont ensemencées à l'intérieur du conduit. Ainsi, les différentes couches du vaisseau sont reconstituées (Stoclet et al., 2004).*

La technique est basée sur un système d'autoassemblage des feuillets cellulaires constitués de collagène et de cellules (L'Heureux et al., 1998). Dans une première étape, chacun des 3 types cellulaires est récupéré à partir de tissus humains et cultivé. Les CE et les CML sont issues de la veine ombilicale humaine et les fibroblastes proviennent du derme. La

deuxième étape consiste à enrouler les feuillets cellulaires : le feuillet obtenu avec les CML est d'abord enroulé autour d'un mandrin afin de reconstituer la média. Un deuxième feuillet, produit à partir des fibroblastes, est ensuite enroulé autour du rouleau précédent afin de constituer une adventice. A ce stade, seules les 2 couches les plus externes sont construites. La troisième tunique sera ajoutée après maturation du tube (afin d'assurer la cohésion des 2 premières couches) par ensemencement de CE à l'intérieur de la lumière du tube.

Cette technique permet donc la reconstitution d'un vaisseau dans son ensemble. Grâce à une forte densité de collagène, la résistance de ces substituts aux pressions de rupture est élevée. D'autres composantes de la MEC sont également présentes, dont l'élastine dans l'adventice. Cependant les essais réalisés chez le chien ont montré une dissection après seulement une semaine d'implantation. Une deuxième étude publiée par cette équipe a montré que l'assemblage du feuillet externe de fibroblaste et du feuillet interne de CE a permis de reconstituer un nouveau vaisseau avec des propriétés mécaniques proches de celles du vaisseau natif (L'Heureux et al., 2006). Des études *in vivo* ont été menées pendant 8 mois chez le singe et le chien et présentent des résultats encourageants :

- perméabilité de 86 % des substituts implantés ;
- formations de vasa vasorum et de média.

Les essais cliniques sont en cours (L'Heureux et al., 2007; McAllister et al., 2009). Les vaisseaux obtenus ont été implantés en tant que shunt au niveau du haut des bras et des avant-bras de patients. Sur 10 patients ayant bénéficiés de ces shunts, 7 présentent une perméabilité satisfaisante au terme de 30 mois d'implantation (McAllister et al., 2009). Un cas de thrombose et deux cas de dilatations ont cependant été relevés. Malgré ces résultats encourageants, il reste nécessaire de tester ces vaisseaux en tant que véritable substitut sanguin. Des études plus poussées concernant le remplacement de vaisseaux de la jambe sont prévues en Amérique du Sud.

Des études *in vitro* ont été menées sur les propriétés mécaniques d'artères issues de l'ingénierie vasculaire et des vaisseaux natifs (artères mammaires et veine saphène). La résistance à la pression et à la suture semble meilleure pour les substituts issus de l'ingénierie vasculaire. Cependant, la compliance de ces vaisseaux demeure bien moins importante que celle des vaisseaux natifs (Konig et al., 2009).

• En 2009, Norotte décrit la fabrication de vaisseaux de petit calibre par la méthode de bioprinting (figure 17). Le bioprinting est une méthode permettant le dépôt tridimensionnel de cellules sous forme de sphéroïdes multicellulaires sur des « *biopapers* » qui ne sont autres que des gels à base de collagène (Jakab et al., 2008).

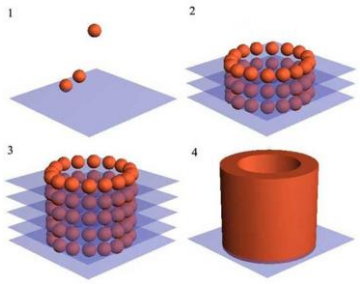


Figure 17 : **Représentation schématique du principe de bioprinting**.

Le bioprinting est une méthode assistée par ordinateur permettant la création de vaisseaux sanguins via un transfert et un dépôt des composants couches par couches.

www.musc.edu/.../assets/images/bioprinting02.jpg

Le vaisseau réalisé par Norotte est entièrement biologique et constitué de cellules humaines : CML de veine ombilicale et fibroblastes de peau. Selon ces auteurs, les tubes obtenus sont suffisamment résistants pour être cultivés dans des bioréacteurs (Norotte et al., 2009). Des études complémentaires sur les propriétés mécaniques de ces tubes restent à effectuer.

Malgré des perspectives intéressantes, le temps de fabrication et de maturation de ces vaisseaux (plus de 2 mois) constitue une limite dans les situations d'urgence.

IV.3. Matrices naturelles

Ce sont des matrices dérivées de tissus humain ou animal.

IV.3.1. Matrice à base d'intestin grêle

Lantz et al. ont développé un substitut vasculaire biologique à partir de muqueuse de l'intestin grêle (Lantz et al., 1990; Lantz et al., 1992; Lantz et al., 1993). La préparation de ces substituts consiste à abraser un segment du jéjunum de façon à éliminer la muqueuse luminale

et la musculature externe. Seuls la musculaire muqueuse et le stratum riche en collagène constituent donc la matrice vasculaire. Ce substitut montre une excellente biocompatibilité puisqu'il peut aussi bien être utilisé pour une autogreffe, une allogreffe qu'une xénogreffe. Le taux de perméabilité atteint 75 % pour l'aorte, la carotide, la fémorale et la veine cave supérieure. A l'issue de 90 jours d'implantation, les examens histologiques montrent des résultats similaires pour les 3 artères et la veine. Par ailleurs, la résistance aux infections semble meilleure qu'avec le PTFEe.

De la même façon, Huynh et al. ont réalisé une matrice à partir de collagène dérivé de la sous-muqueuse de l'intestin grêle et de collagène de type I (Huynh et al., 1999). L'intérieur du tube ainsi construit a été traité avec de l'héparine. Implanté au niveau de l'aorte de lapin, la perméabilité est satisfaisante.

IV.3.2. Matrice vasculaire décellularisée et acellularisée

Les matrices vasculaires naturelles décellularisées ont été utilisées dans de nombreux travaux. Il faut distinguer les matrices acellulaires dans lesquelles toutes les cellules sont éliminées (par traitement enzymatique et utilisation de détergents) (Allaire et al., 1997; Kaushal et al., 2001; Lopez-Soler et al., 2007; Martin et al., 2005; Schaner et al., 2004; Teebken et al., 2000) et les matrices décellularisées dans lesquelles une partie des cellules seulement est éliminée ; généralement les CE, on parle alors de désendothélialisation (Kerdjoudj et al., 2008; Kerdjoudj et al., 2006).

Une aorte de rat a ainsi été désendothélialisée par action mécanique et enzymatique. La xénogreffe est recellularisée avec des fibroblastes humains, des CE et des CML (Gomes et al., 2001). De même, Kerdjoudj et al. ont désendothélialisé une artère ombilicale avant recellularisation et implantation chez le lapin. Une perméabilité de 100 % à 12 semaines a été montrée après implantation du substitut sur des carotides de lapin (Kerdjoudj et al., 2008).

Clarke et son équipe ont totalement acellularisé des uretères de bœuf. A 10 mois post-implantation, la greffe montre une perméabilité à 100 % chez le chien, sans formation d'anévrisme (Clarke et al., 2001).

Des carotides de porc ont été acellularisées puis de l'héparine a été fixée sur la surface luminale du conduit de façon à réduire la thrombogénicité (Tamura et al., 2003). La compliance et la résistance à la suture sont bonnes et une repopulation de la paroi par les CML et de la lumière par les CE a été observée 2 mois après implantation. Cependant, l'étude a été trop courte pour conclure définitivement.

L'avantage des matrices naturelles est leur composition faite de protéines de la MEC présentes dans tout l'organisme. Par ailleurs, la structure tridimentionnelle des matrices naturelles est très similaire à celle du vaisseau à remplacer, ce qui lui confère des propriétés physiques et mécaniques proches des vaisseaux natifs. Cependant, malgré des résultats encourageants, la transmission de rétrovirus endogènes et de protéines infectieuses telles que les prions reste une limite majeure.

IV.4. Substituts vasculaires endothélialisés

L'endothélialisation de substituts vasculaires constitue une voie actuellement très développée dans la conception d'un substitut vasculaire. Trois éléments importants sont à la base de ce concept :

- une matrice naturelle ou synthétique, c'est-à-dire une structure implantable dévolue au soutien des cellules pendant le processus de régénération ;

- un revêtement de surface de façon à favoriser les propriétés adhésives de la face luminale du vaisseau vis-à-vis de cellules ;

- une source de cellules endothéliales à ensemencer dans le conduit.

IV.4.1. Matrices utilisées pour l'endothélialisation

Le PTFE, le Dacron® et le PU peuvent être utilisés pour l'ensemencement cellulaire. Lorsqu'une prothèse vasculaire est implantée chez l'homme, la néo-endothélialisation de la surface luminale ne se produit pas (Chlupac et al., 2009; Seifalian et al., 2002; Shi et al., 1997) le processus d'endothélialisation se limite uniquement aux sites d'anastomoses (Davies, 1995). Au niveau des substituts de petits diamètres, la situation est problématique car le débit

sanguin est plus faible (en comparaison avec les gros vaisseaux), il en résulte la formation rapide de caillots sur les surfaces luminales thrombogènes aussi bien sur les substituts naturels acellularisées que synthétiques.

Les polymères utilisés en chirurgie vasculaire ne sont pas compatibles avec la culture des CE (Schneider et al., 1992). En effet, le PTFEe est hautement hydrophobe, ce qui limite l'adhésion des CE (Callow, 1988). Il existe des forces répulsives électrostatiques entre les CE chargées négativement et les matériaux des greffes qui le sont également (Shimada et al., 2004; van Wachem et al., 1987). Il en va de même pour les matrices acellularisées ou déendothélialisées.

Ainsi, jusqu'à présent, sans modification de surface, l'ensemencement des CE sur les prothèses vasculaires est inefficace et se traduit par un faible nombre de CE adhérentes (Feugier et al., 2005).

Un des problèmes à résoudre est donc de faire adhérer le néo-endothélium à la composante synthétique ou naturelle qui forme la structure tubulaire. Pour cela, il est nécessaire d'interposer un recouvrement de surface qui puisse favoriser l'adhésion forte et le développement des cellules endothéliales.

IV.4.2. Les cellules

Plusieurs types cellulaires peuvent potentiellement être utilisés pour recréer un endothélium à la surface luminale des substituts :

- les cellules matures : cellules endothéliales (CE) et cellules endothéliales circulantes (CEC) ;

- les cellules souches : embryonnaires, fœtales ou adultes : mésenchymateuses, hématopoïétiques, progéniteurs endothéliaux, cellules souches induites.

IV.4.2. 1. Les cellules matures

IV.4.2.1.1. Les cellules endothéliales

Les CE constituent une source intéressante pour endothélialiser les artères (Bader et al., 2000; Baguneid et al., 2004; Hirai and Matsuda, 1996; L'Heureux et al., 1998). Cependant, en clinique, l'utilisation de CE autologues semble difficilement réalisable dans la mesure où cela nécessite d'effectuer le prélèvement d'un vaisseau sain afin d'en extraire les CE. Par ailleurs, *in vivo* les CE ne prolifèrent pas, un risque de dédifférenciation et de perte progressive du phénotype endothélial est à craindre au cours de l'amplification des cellules.

IV.4.2.1.2. Les cellules endothéliales circulantes

Les cellules endothéliales circulantes (CEC) ont été décrites pour la première fois dans le milieu des années 1970. La présence d'un nombre élevé de CEC est un signe de pathologie vasculaire. Le mécanisme de détachement endothélial n'est pas très bien compris à l'heure actuelle. Certains facteurs sont suspectés de favoriser le détachement des CE (figure 18). C'est notamment le cas de la présence de neutrophiles, de cytokines et de protéases. Certaines substances peuvent également être impliquées : les inhibiteurs de calcineurine. De même, le voisinage cellulaire et l'ancrage des CE à la MEC semblent aussi jouer un rôle dans le décrochement de ces cellules *via* la vitronectine, la fibronectine, les cadhérines et les intégrines (Haubitz and Woywodt, 2004; Woywodt et al., 2002).

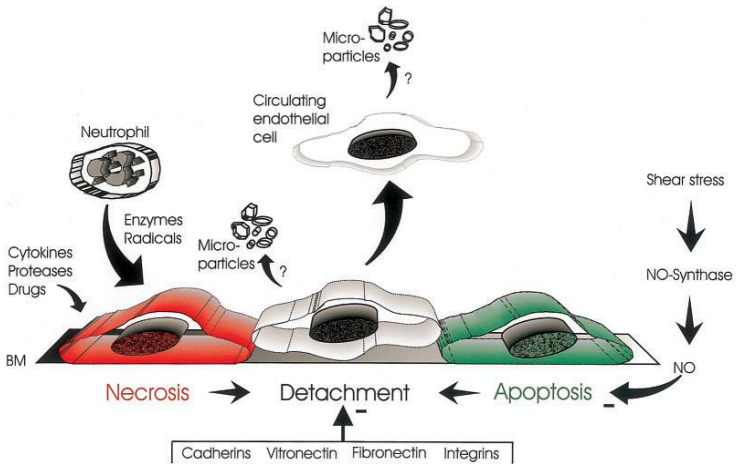


Figure 18 : **Mécanisme supposé de détachement des cellules endothéliales de la membrane basale.** *Les cellules ainsi détachées vont alors devenir des cellules endothéliales circulantes (Woywodt et al., 2002).*

Bien que ce type de cellules constitue une source intéressante de cellules en ingénierie cellulaire, leur trop faible disponibilité n'en fait pas un candidat idéal pour l'ingénierie vasculaire. La solution pourrait provenir de l'utilisation des cellules souches.

IV.4.2.2. Les cellules souches

Certaines de nos cellules sont dites "souches", parce qu'elles sont à l'origine de toutes les autres. Les cellules souches sont capables d'autorenouvellement et de différenciation, ce qui offre un potentiel prolifératif élevé relativement accessible pour l'ingénierie tissulaire (Lavik and Langer, 2004). Les cellules souches (figure 19) peuvent être issues de l'embryon, du fœtus ou de l'adulte. Il en existe quatre types, classés selon leurs potentiels :

- les cellules souches totipotentes : présentes dans les quatre premiers jours de l'embryon, elles peuvent, à elles seules, permettre le développement d'un organisme entier ;
- les cellules souches pluripotentes : présentes du $5^{éme}$ au $7^{éme}$ jours suivant la fécondation, elles peuvent donner naissance à plus de 200 types cellulaires différents ;

- les cellules souches multipotentes : présentes dans les tissus fœtaux ou adultes, elles peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées ;

- les cellules souches unipotentes : elles n'engendrent qu'un seul type de cellules différenciées mais conservent comme les hépatocytes, certaines capacités d'autorenouvellement et de prolifération.

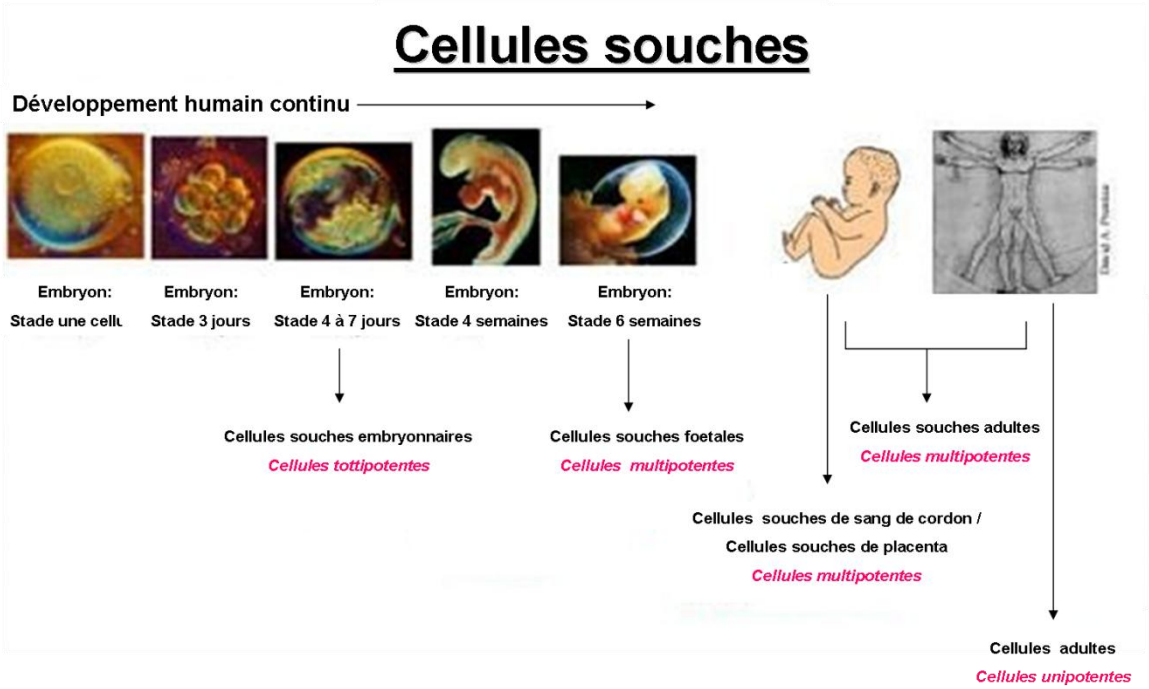


Figure 19 : **Différents types de cellules souches.**
www.nlinethumb19.webshots.com

IV.4.2.2.1. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont issues de la masse interne du blastocyste (figure 20). A ce stade de développement, les cellules sont totipotentes puisqu'elles peuvent produire tous les feuillets embryonnaires. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules embryonnaires perdent la possibilité de développer un organisme entier, mais gardent cependant leur caractère pluripotent et leur génome intact. Elles peuvent être cultivées en laboratoire. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules souches embryonnaires pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules issues du blastocyste.



Figure 20 **: Blastocyste humain obtenu par fécondation *in vitro*.**

C'est à partir d'un tel blastocyste que les cellules souches embryonnaires sont isolées.
www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecin

Placées dans des conditions de cultures bien définies (stimulations chimiques ou biochimiques), ces cellules ont également la capacité de se différencier en cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme, y compris vers une différenciation vasculaire (Hanjaya-Putra and Gerecht, 2009).

La préparation des cellules souches embryonnaires (*Embryonnic Stem Cells*) implique la production et la destruction d'embryons humains et/ou l'utilisation des embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*, puis le prélèvement de cellules du bouton embryonnaire au stade blastocyste ; ces cellules souches embryonnaires sont ensuite mises en culture afin d'obtenir un très grand nombre de cellules identiques.

La loi de bioéthique de 1994 a prohibé la recherche sur les embryons et les cellules souches embryonnaires humaines. La révision de cette loi, en 2004, a abouti à proroger cette interdiction, tout en émettant quelques dérogations de 5 ans : l'Agence de biomédecine a été chargée de délivrer ces dérogations dans des cas spécifiques « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs » et s'il n'existe pas de « méthode alternative d'efficacité comparable ». Ce régime juridique, sans équivalent dans le monde, a permis notamment un temps de réflexion afin de mieux comprendre les possibilités offertes par ce type de recherches, sans toutefois les légaliser *ipso facto*.

Depuis 2004, l'Agence de la biomédecine délivre aux équipes scientifiques demandeuses les autorisations de recherche (ainsi que les autorisations d'importations/exportations et de conservation) concernant les cellules souches embryonnaires et les embryons humains. Le fait de soumettre des protocoles de recherche à une autorisation administrative est exceptionnel en France, et se justifie dans ce cas par la nature éthiquement très sensible de l'embryon humain.

Dans le cadre de la révision des lois de bioéthique, le Conseil d'Etat a rendu en mai 2009 un avis préconisant l'autorisation de la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines, en reconnaissant qu'elles ont « un intérêt thérapeutique, même si des alternatives prometteuses se développent ». Si le moratoire temporaire préconisé par les normes précédentes lui parait « un obstacle au plan scientifique », le Conseil d'Etat préconise toutefois de conserver le même régime d'autorisations, en ne permettant que la recherche sur les cellules souches provenant d'embryons surnuméraires lorsqu' « elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs ». En 2008, 36 autorisations ont été délivrées

pour des protocoles de recherche, 17 sites ont été autorisés pour la conservation et 26 autorisations d'importation ont été attribuées.

IV.4.2.2.2. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Afin de limiter les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches embryonnaires, plusieurs groupes se sont intéressés à l'utilisation de cellules souches pluripotentes obtenues après induction appelée iPS (*induced pluripotent stem cells*). Les iPS sont des cellules adultes qui ont été génétiquement reprogrammées en pseudo-cellules souches embryonnaires par expression de certains gènes et facteurs de transcription importants pour le maintien des propriétés définissant les cellules souches embryonnaires. Parmi ces facteurs de transcription, Oct ¾, Sox-2, c-Myc et Nanog jouent un rôle important dans le maintien de la pluripotentialité de cellules souches.

En 2007, l'équipe de Takahashi a montré qu'il est possible de reprogrammer des cellules somatiques fibroblastiques de souris en cellules souches embryonnaires. Ces cellules obtenues après transfection par un rétrovirus expriment les facteurs de transcription nécessaires au maintien de la pluripotentialité (figure 21). Les cellules obtenues présentent alors une morphologie et une prolifération identiques à celles des cellules souches embryonnaires (Takahashi et al., 2007).

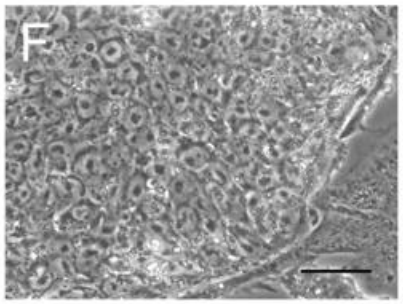


Figure 21 : **Cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes dermiques humains (Takahashi et al., 2007)**.

Les iPS ont également la capacité de se différencier en types cellulaires tels que les neurones, les cardiomyocytes et les cellules hématopoïétiques (Dimos et al., 2008; Hanna et al., 2007; Wernig et al., 2008). Niwa et al. ont montré que les cellules dérivées des iPS suivaient une différenciation hématopoïétique identique à celles des cellules souches

classiques durant l'embryogenèse (Niwa et al., 2009). Cependant à ce jour, aucune différenciation poussée jusqu'à l'état de CE n'a été rapportée. Par ailleurs, l'utilisation de rétrovirus, comme vecteur de l'expression des facteurs de transcription permettant la reprogrammation cellulaire, peut provoquer des risques de mutagénèse incontrôlée, représentant un réel problème pour des applications en médecine régénératrice.

Par leur degré important de similitude avec les cellules souches embryonnaires, les iPS font l'objet d'une veille attentive de la part de l'Agence de la biomédecine, à la fois sur un plan scientifique et sur un plan réglementaire. Toutefois, dans l'état actuel de la législation, et en dehors des aspects de consentement des patients faisant l'objet des prélèvements de cellules « sources », les recherches sur les iPS ne sont pas soumises à réglementation. Cependant, les auditions et les nombreux débats préparatoires à la révision de la loi de bioéthique (prévue en 2010) révèlent des préoccupations d'ordre éthique concernant les aspects scientifiques, mais aussi d'éventuelles applications médicales futures de ces nouvelles technologies. Ces progrès pourraient conduire à une réglementation de certains aspects, limités, de la recherche sur les iPS.

IV.4.2.2.3. Les cellules souches fœtales

D'un point de vue recherche et thérapeutique, les cellules souches fœtales peuvent être prélevées sur des fœtus issus d'une interruption volontaire de grossesse. Les cellules souches fœtales sont des cellules multipotentes parce qu'elles ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire particulier selon les feuillets ecto-, méso- ou endodermique dont elles sont issues.

De la même façon que pour les cellules souches embryonnaires, la conservation et l'utilisation des cellules souches fœtales sont restreintes en France.

IV.4.2.2.4. Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont des cellules pluripotentes, capables d'autorenouvellement et de différenciation en cellules spécifiques des tissus dans lesquels elles résident (Filip et al., 2004). Elles participent au renouvellement naturel d'un tissu et à sa

réparation. Des cellules de plusieurs origines sont utilisées dans le traitement de diverses maladies :

- *Cellules sanguines* : le receveur malade reçoit, à partir d'un donneur sain, la moelle osseuse contenant les cellules souches hématopoïétiques qui vont produire, chez lui, des cellules sanguines normales pendant toute la vie de l'individu transplanté (Rocha et al., 1998).

- *Peau :* le patient est greffé avec une " *peau artificielle* " obtenue par la multiplication en culture de cellules souches épidermiques prélevées sur une portion saine de sa peau. Il y a dans ces conditions réparation de l'épiderme et du derme superficiel (Berthod and Damour, 1997).

- *Os* : dans les grands dégâts osseux, la réparation est accélérée par l'implantation de matériaux artificiels et de cellules souches mésenchymateuses, isolées à partir de la moelle osseuse du patient, et capables de produire des ostéoblastes (Bruder et al., 1998).

- *Cerveau :* dans certaines maladies dégénératives (Parkinson ou de Huntington), il est actuellement possible d'implanter dans le cerveau malade des neurones foetaux et d'améliorer la symptomatologie des malades (Bachoud-Levi et al., 2000; Shapiro et al., 2000; Svendsen et al., 1999).

- *Pancréas* : pour ce dernier organe aussi, il existe de rares exemples de greffes ou de cellules sécrétrices d'insuline dans des diabètes instables (Shapiro et al., 2000), mais la généralisation de ce type de greffe n'est pas encore envisageable (Robertson, 2000).

IV.4.2.2.4.1. Les cellules souches mésenchymateuses

L'intérêt suscité par les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (figure 22) a débuté il y a 130 ans, lorsqu'un scientifique allemand nommé Cohnheim (1839-1884) a émis l'idée que la moelle osseuse engendre des pseudo-fibroblastes pendant le processus de réparation des lésions (Petrakis et al., 1961; Ross et al., 1970).

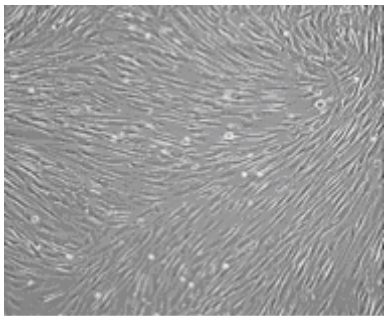


Figure 22 : **Photographie de cellules souches mésenchymateuses** *(Oswald et al., 2004).*

Cependant, les CSM ont été identifiées pour la première fois en 1966 par Friedenstein (Friedenstein et al., 1966) lorsqu'il démontra que la moelle osseuse contenait une population hétérogène de cellules adhérentes, capables de générer des dépôts osseux et cartilagineux. Ces travaux furent confirmés et approfondis un peu plus tard par plusieurs groupes de travail qui mirent en évidence que les cellules adhérentes présentes dans la moelle étaient des cellules multipotentes, ayant la capacité de s'engager dans des voies de différenciation variées, incluant notamment des types cellulaires vasculaires (Caplan, 1991; Jiang et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997; Reyes et al., 2001).

Les CSM trouvent leur origine dans la moelle osseuse et se nichent dans différents organes tels que la moelle osseuse, les tissus adipeux, le sang, la rate ou le foie (Bernacki et al., 2008; Campagnoli et al., 2001; Huang et al., 2007; in 't Anker et al., 2003). Les CSM peuvent être isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse de la crête iliaque supérieure (Digirolamo et al., 1999; Pittenger et al., 1999) du tibia ou du fémur (Murphy et al., 2002), ainsi que de la colonne vertébrale au niveau des corps vertébraux lombaires et thoraciques (D'Ippolito et al., 1999). Les CSM représentent seulement 0,01 % du pool total de cellules mononucléées présentes dans la moelle osseuse (Roberts, 2004). Cependant, elles peuvent être multipliées *in vitro* tout en conservant leur capacité à se différencier en différents types cellulaires (Pittenger et al., 1999). 10 à 20 mL de moelle osseuse (Haynesworth et al., 1992; Simmons and Torok-Storb, 1991; Bruder et al., 1997; Jones et al., 2002) permettent d'amplifier, *in vitro*, des millions de CSM en cellules matures. Les CSM prolifèrent rapidement en culture, bien que leur potentiel d'expansion soit variable en fonction de l'âge du donneur, de sa condition physique et des techniques de prélèvement (Bruder et al., 1997; Colter et al., 2000; Digirolamo et al., 1999). La caractérisation *in vitro* des CSM se fait à

travers l'expression des marqueurs spécifiques comme : $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, $CD34^{-}$, $CD45^{-}$ et $CD14^{-}$ (Noel et al., 2002).

Grâce à leur caractère multipotent, il a été démontré que ces cellules étaient capables de se différencier en plusieurs types cellulaires et notamment l'os (Aslan et al., 2006; Jaiswal et al., 1997; Long, 2001), le cartilage (Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998), le tendon (Young et al., 1998)), le ligament (Young et al., 1998) et les cellules endothéliales (Oswald et al., 2004; Pittenger et al., 1999).

Alors que l'utilisation de CE pour créer des conduits vasculaires requiert l'isolement de cellules spécifiques au patient, les CSM constituent une source cellulaire allogénique alternative intéressante pour la médecine vasculaire régénératrice.

IV.4.2.2.4.2. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent une autre source de cellules souche utilisables en ingénierie vasculaire.

Des cellules très précoces capables de générer les cellules hématopoïétiques et lymphoïdes (figure 23) se distinguent des autres cellules.

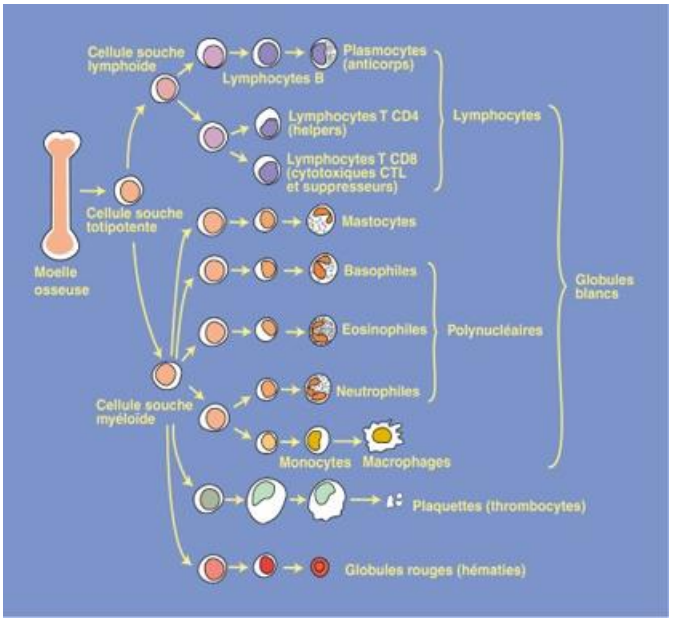


Figure 23 : **Différenciation des cellules souches hématopoïétiques**.

Selon les stimuli biochimiques reçus, les cellules souches hématopoïétiques sont capables de s'engager dans différentes voies de lignées de différenciation.

http://www.cellbiol.net/layout/image1/figure-n1-1.jpg

Les CSH précoces sont présentes en très faible quantité (< 1 cellule pour 10^5 cellules mononucléées) et n'ont été isolées qu'en 1995. Cependant, les premiers précurseurs hématopoïétiques ont été mis en évidence en 1960 par Till et MacCulloch, qui ont pour la première fois démontré l'existence d'une CSH capable de générer les différentes lignées érythroïdes, monocytaires et granulocytaires (McCulloch and Till, 1960). Les CSM partagent un précurseur commun avec les CE : l'hémangioblaste. Elles ont été identifiées au cours du développement embryonnaire (Pelosi et al., 2002). Elles persistent non seulement dans la moelle osseuse mais aussi dans le foie, en particulier chez le jeune enfant, voire chez l'adulte.

Des études sur des CSH humaines et murines ont montré leur capacité à se différencier en trois types principaux de cellules cérébrales (neurones, oligodendrocytes et astrocytes), en cellules musculaires squelettiques (Ferrari et al., 1998), cardiaques (Orlic et al., 2001b) et hépatiques (Alison et al., 2000; Theise et al., 2000). Cependant, à la différence des cellules souches embryonnaires, la CSH n'est pas dotée d'un caractère prolifératif indéfini.

Au fil des années, de nombreuses combinaisons de marqueurs de surface ont été utilisées pour identifier, isoler et purifier les CSH provenant de la moelle osseuse et du sang. Les CSH expriment les différents marqueurs suivants : c-kit$^+$, CD34$^+$, CD45$^+$ et CD14$^+$.

L'utilisation des CSH en thérapeutique humaine est plutôt rare du fait de la difficulté d'accroître le nombre des cellules sans perdre leur potentiel de différenciation. *In vitro*, leur prolifération à l'état non différencié est impossible, ce qui les distingue radicalement des CSM (Coulombel, 2003). Cette caractéristique est un obstacle à leur utilisation dans des greffes autologues ainsi qu'à la création de banques de CSH disponibles à la demande.

IV.4.2.2.4.3. Les cellules souches endothéliales

a. Rôle des EPC

La régénération de l'endothélium vasculaire est cruciale pour le bon fonctionnement du système vasculaire. *In vivo*, la reconstruction endothéliale peut être due à la migration et la prolifération des cellules avoisinant le site de la lésion. Cependant, les CE sont des cellules différenciées avec un faible potentiel de prolifération et leur capacité de régénérer un endothélium est limitée. Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont montré que le sang périphérique adulte contient un type unique de cellules circulantes provenant de la moelle osseuse et doué de propriétés proches de celles des angioblastes embryonnaires. Ces cellules, qui ont la capacité de se multiplier et de se différencier en CE matures, sont appelées cellules progénitrices endothéliales (EPC) (figure 24).

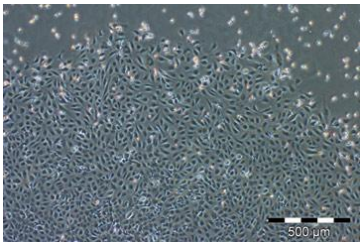


Figure 24 : **Photographie de cellules progénitrices endothéliales**.

(Rohde et al., 2007; Rohde et al., 2006; Sourij et al., 2007)

Les EPC jouent un rôle essentiel dans la néovascularisation c'est-à-dire la formation des structures vasculaires et dans le processus de cicatrisation (Asai et al., 2006) (figure 25).

Ils sont aussi impliqués dans le traitement des infarctus du myocarde (Losordo et al., 1998) et dans certains processus pathologiques tels que la croissance tumorale.

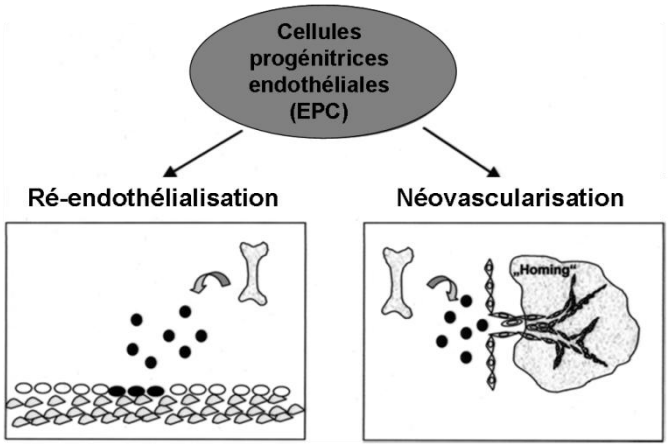


Figure 25 : **Rôle des EPC dans les phénomènes de régénération vasculaire.**
D'après (Miller-Kasprzak and Jagodzinski, 2007)

b. Isolement et caractérisation des EPC

Les EPC ont été isolées pour la première fois par Asahara en 1997 (Asahara et al., 1997). Des cellules $CD34^+$ ont été extraites à partir de sang périphérique humain grâce à l'utilisation de billes magnétiques. Après ensemencement sur fibronectine, les cellules se différencient en CE. Les EPC peuvent également être isolées après centrifugation sur gradient de densité et ensemencement de l'anneau leucocytaire (Berthelemy et al., 2009).

Les EPC peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse et de sang périphérique, mais également à partir de foie fœtal ou de sang de cordon ombilical (Asahara et al., 1997; Murohara, 2001; Murohara et al., 2000).

Trois marqueurs caractérisent les EPC : CD133, CD34 et le VEGFR-2 (figure 26). CD133 est un marqueur précoce des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices provenant de la moelle humaine, de foie fœtal et de sang périphérique (Yin et al., 1997). Les cellules possédant ces caractéristiques se localisent majoritairement dans la moelle osseuse. Dans la circulation périphérique adulte, des EPC plus matures dits tardifs présentent une perte du marqueur CD133 mais restent positifs pour CD34 et VEGFR-2. Les CE matures expriment VEGFR-2, la VE cadhérine et le facteur Von Willebrand.

Selon le stade de marqueurs exprimés, plusieurs types d'EPC sont distingués (figure 26).

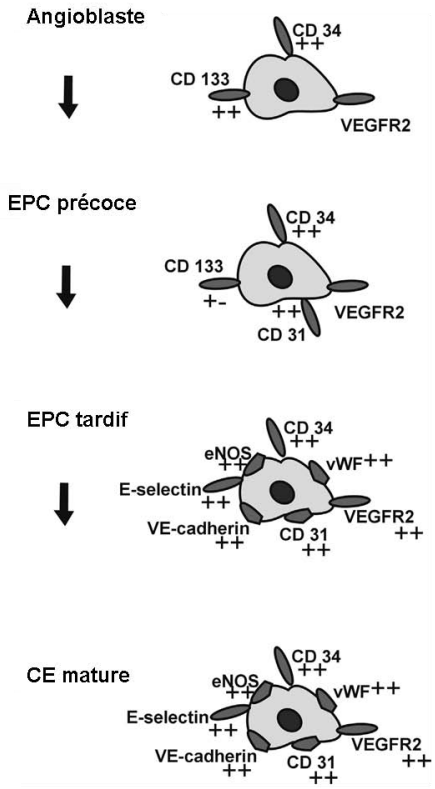


Figure 26 : **Schéma représentant l'évolution des marqueurs au cours de la différenciation phénotypique de l'hémangioblaste en EPC puis en CE** (Miller-Kasprzak and Jagodzinski, 2007).

Les EPC précoces ou « early EPC » sont issues de la lignée monocytaire ($CD14^{+}$) (Konig et al., 2009) et présentent une expression variable de CD34, CD133, CD45 et KDR (Shantsila et al., 2008).

Les EPC précoces (figure 26) ont donc davantage de marqueurs communs avec les CSH que les EPC tardifs (Bailey and Fleming, 2003). Leur potentiel de différenciation est faible et transitoire *in vitro* (Krenning et al., 2009; Krenning et al., 2007; Krenning et al., 2008). Ces cellules ne sont pas capables de s'intégrer à une monocouche endothéliale, mais ont toutefois la capacité de favoriser l'angiogénèse. Elles sécrètent de fortes concentrations de facteurs de croissance, ce qui contribue à leurs propriétés angiogènes (Smadja and Gaussem, 2009).

Les EPC tardives ou late EPC proviennent des cellules souches $CD34^+$ (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007) et, expriment, après mise en culture, exclusivement des marqueurs de CE (Krenning et al., 2009). Les EPC tardifs apparaissent au bout de 7 à 28 jours de culture sous forme pavimenteuse. Elles montrent un potentiel prolifératif important. Aucune définition clairement établie à partir des marqueurs phénotypiques n'existe pour définir précisément un EPC tardif. Certains les décrivent simplement comme des EPC précoces ayant un stade de différenciation plus avancé. Tout comme pour les EPC précoces, l'injection d'EPC tardifs favorise l'angiogénèse au niveau de sites ischémiques (Schatteman et al., 2000) (Gehling et al., 2000; Kawamoto et al., 2001; Murohara et al., 2000; Urbich and Dimmeler, 2004).

c. Mobilisation des EPC

Le relargage des EPC de la moelle osseuse est régulé par NO produit par la eNOS localisée dans le micoenvironnement de la moelle. Certaines substances comme les hormones de croissance et les *insuline growth factor* (IGF) augmentent la quantité d'EPC (Thum et al., 2007a). A l'inverse, d'autres susbstances telles que la dimethylarginine asymétrique (ADMA) diminuent la quantité de NO disponible. Ces substances sont associées à un faible niveau d'EPC ainsi qu'à l'inhibition de la mobilisation et de la différenciation des EPC, et de la formation des pseudo-tubes.

• Facteurs physiologiques et physiopathologiques influençant le nombre d'EPC :

Certains facteurs physiologiques contribuent à mobiliser les EPC présents dans les niches de la moelle osseuse. Ils sont d'ailleurs connus pour agir via un mécanisme médié par le VEGF et NO (Laufs et al., 2005; Laufs et al., 2004; Rehman et al., 2004; Steiner et al., 2005). Les œstrogènes mobilisent les EPC *via* la métalloprotéïne MMP9 et un mécanisme dépendant de la eNOS (Iwakura et al., 2006).

➔ *Facteurs favorisant le nombre d'EPC*

L'âge du sujet semble aussi avoir une influence sur la quantité d'EPC. Plus le sujet est jeune, plus le nombre d'EPC est important et les sujets d'âges moyen et mûr ont comparativement moins d'EPC que les personnes jeunes. Ceci peut être attribué à la

concentration *d'insulin growth factor-1* (IGF-1) qui diminue avec l'âge. En effet, un traitement à base d'hormone de croissance restaure le taux normal d'EPC et réduit leur sénescence *via* une augmentation d'IGF-1 (Thum et al., 2007b). La diminution de la capacité de renouvellement vasculaire avec l'âge pourrait aussi être en lien direct avec une baisse du VEGF circulant dans le plasma, limitant du même coup la mobilisation et la différenciation des EPC (Henrich et al., 2004). De plus, le vieillissement affaiblit la réponse de la moelle osseuse aux stimuli physiopathologiques (Dimmeler and Vasa-Nicotera, 2003). Une moelle osseuse sénescente et moins fonctionnelle présenterait une masse d'EPC plus faible que dans des conditions normales (Dong et al., 2005).

Le nombre d'EPC est inversement proportionnel à un certain nombre de facteurs de risques cardiovasculaires (figure 27). De façon générale, plus le nombre d'EPC est important, plus la vasculature est en bonne santé (Hill et al., 2003; Vasa et al., 2001).

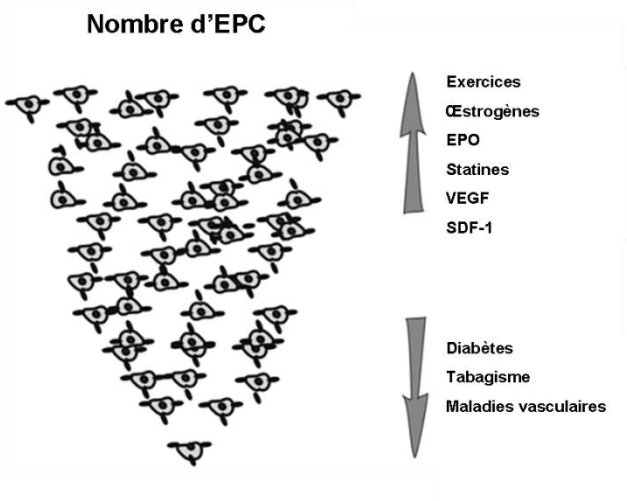


Figure 27 : **Facteurs modulant le nombre d'EPC.**
(Miller-Kasprzak and Jagodzinski, 2007)

➔ *Facteurs limitant le nombre d'EPC*

Les facteurs pathologiques et physiopathologiques diminuant le nombre d'EPC englobent notamment :

- le tabagisme augmente de façon dose-dépendante le stress oxydant et diminue NO biodisponible (Michaud et al., 2006). L'arrêt du tabac provoque d'ailleurs une rapide augmentation du nombre d'EPC (Kondo et al., 2004).

- l'hypercholestérolémie induit une baisse du potentiel de prolifération, de migration et des capacités de vasculogenèse (Chen et al., 2004). Des études ont démontré une augmentation du ratio sénescence/apoptose après incubation des EPC avec des LDL oxydées. Le cholestérol-HDL quant à lui, contribuerait à protéger les vaisseaux *via* une augmentation du nombre d'EPC.

- le diabète module de façon importante la quantité et la fonctionnalité des EPC mobilisés. Parmi les différentes complications du diabète, les complications vasculaires associées à une diminution du nombre d'EPC sont les plus fréquentes. Une sévère incapacité des EPC à réendothélialiser est principalement due à une augmentation de la NADPH oxydase (Sorrentino et al., 2007).

- la protéine C réactive régule aussi les voies de transduction associées aux cytokines impliquées dans l'inhibition de la voie JAK-STAT, jouant un rôle crucial dans la prolifération et la croissance des EPC. De la même façon, le TNFα, connu pour ses propriétés immunosuppressives, pourrait être responsable de la réduction de l'hématopoïèse et du nombre important d'EPC observés après un arrêt cardiaque.

L'infarctus aigu du myocarde (IDM) est la pathologie qui représente le plus fort stimulus pour la mobilisation des EPC. Après un IDM, les cellules souches sont mobilisées depuis la moelle osseuse, libérées dans le sang périphérique et migrent finalement dans le myocarde (Deb et al., 2003; Quaini et al., 2002). La relation existant entre la mobilisation des EPC et la réparation cardiaque a beaucoup été étudiée (Leone et al., 2005; Massa et al., 2005; Muller-Ehmsen et al., 2005; Shintani et al., 2001). La mobilisation prolongée des EPC après un IDM pourrait être due à la fois à l'ischémie et à la nécrose des tissus atteints (Li et al., 2005).

Concernant les maladies coronariennes, des données contradictoires existent au sujet de la mobilisation des EPC. Les facteurs de risques laissent penser que le nombre d'EPC devrait être faible. Cette hypothèse est appuyée par les résultats d'une étude récente montrant que les patients ayant une maladie vasculaire multifocale avaient un taux d'EPC plus faible

que des patients souffrant d'une maladie vasculaire monofocale (Miller-Kasprzak and Jagodzinski, 2007). A l'inverse, Grunden et al. ont montré que les patients nécessitant une revascularisation des coronaires présentaient un taux plus élevé d'EPC par rapport à des patients sans indication de revascularisation (Guven et al., 2006). Le taux plus faible d'EPC chez les patients souffrant de maladie coronarienne pourrait être dû à la mobilisation et au recrutement important depuis la moelle. Thum et al. ont d'ailleurs montré que la sévérité des pathologies coronariennes était corrélée aux concentrations plasmatiques de diméthylarginine asymétrique (ADMA), un agent inhibiteur potentiel de la NO synthase. Il a été démontré que la quantité d'ADMA était inversement proportionnelle au nombre de cellules $CD34^+$, $CD133^+$, alors qu'*in vitro* l'ADMA favorise la différenciation des EPC (Thum and Bauersachs, 2005).

Tous ces mécanismes pathologiques attestent que les EPC jouent un rôle majeur dans le fonctionnement du système vasculaire.

d. Facteurs intervenant dans la mobilisation et le recrutement (« *homing* ») des EPC

Plusieurs facteurs ayant la capacité de favoriser la mobilisation, la différenciation et la migration des EPC ont été mis en évidence : le granulocyte *colony-stimulating factor* (G-CSF), le *chemokine stromal derived factor- 1* (SDF-1), le VEGF et l'érythropoïétine (EPO). Ces facteurs agissent *via* la protéine kinase AKT.

Les niveaux de G-CSF et VEGF sont significativement plus élevés chez les patients atteints d'un infarctus (Leone et al., 2006). De plus, ces mêmes patients présentent un nombre plus important de cellules $CD34^+$, suggérant que le G-CSF pourrait être à l'origine de la mobilisation des EPC. D'ailleurs, une étude complémentaire a également montré que les quantités de cellules $CD34^+$ mobilisées étaient corrélées avec le niveau de VEGF (Shintani et al., 2001). G-CSF est la cytokine la plus utilisée en clinique pour la mobilisation de CSH à partir de la moelle osseuse (Aicher et al., 2003). GM-CSF (Cho et al., 2003) ainsi que le *stem cell factor* (Corti et al., 2002) sont aussi utilisés, mais seulement en complément de l'utilisation du G-CSF (Bodine et al., 1994; Patschan et al., 2006). Les études menées chez l'animal ont montré que les injections de G-CSF améliorent la fonction cardiaque en

permettant le remodelage du ventricule gauche et diminuent le taux de mortalité après un IDM (Minatoguchi et al., 2004; Orlic et al., 2001a). La mobilisation de cellules $CD34^+$ après injection de G-CSF réduit les complications dues à la neutropénie consécutive à la chimiothérapie (Crawford et al., 1991). Cependant, l'utilisation de cette cytokine a montré qu'elle joue un rôle important dans la croissance tumorale et qu'elle augmente les risques de leucémies myéloïdes aigues et de syndromes myélodysplasiques chez les femmes ayant subi une chimiothérapie suite à un cancer du sein (Natori et al., 2002).

L'EPO augmente *in vitro* la capacité d'adhésion et de prolifération des EPC (George et al., 2005). *In vivo*, il a été montré que l'EPO augmentait le nombre d'EPC circulants et de cellules $CD34^+$ /$CD45^+$ (Bahlmann et al., 2004). En 2003, Heeschen et al ont montré que certaines hormones comme l'EPO étaient capables de stimuler la néovascularisation postnatale, notamment en permettant la mobilisation des EPC à partir de la moelle osseuse (Heeschen et al., 2003). En clinique, la mesure du niveau d'EPO dans le sérum permet de détecter les patients dont la capacité de mobilisation des EPC est diminuée. Des études réalisées chez des animaux souffrant d'IDM ont montré qu'une simple injection d'EPO permettait d'améliorer la fonction cardiaque (Prunier et al., 2007). Néanmoins, de nombreuses cellules cancéreuses utilisent l'érythropoïétine comme facteur favorisant la croissance et l'angiogénèse tumorales (Leyland-Jones, 2003; Yasuda et al., 2003).

Le rôle de SDF-1 a été clairement mis en évidence dans les modèles expérimentaux ischémiques. Yamaguchi et son équipe (Yamaguchi et al., 2003) ont montré que la concentration locale de SDF-1 et de son récepteur CXCR4 présent sur les EPC était directement liées avec la néovascularisation.

L'AMD 3100 est une substance exogène. C'est un antagoniste du récepteur CXCR-4. La liaison entre SDF-1α et CXCR4 joue un rôle majeur dans la mobilisation et l'incorporation des EPC au niveau des sites de néovascularisation. En effet, l'interaction du SDF-1α à son récepteur confine les EPC dans la moelle osseuse. AMD 3100 administré en sous-cutané permet de rompre la liaison entre SDF-1α et CXCR4, ce qui permet la mobilisation des EPC de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Aiuti et al., 1997; Liles et al., 2003).

L'augmentation du niveau basal faible d'EPC dans le sang constitue un enjeu considérable, notamment dans le cadre de leur utilisation en ingénierie vasculaire.

e. Utilisation des EPC en ingénierie vasculaire

Les EPC constituent une source de cellules intéressantes en ingénierie vasculaire. En effet, de par leur capacité à se différencier en CE, ils constituent un excellent candidat pour l'endothélialisation autologue de prothèses vasculaires. Par ailleurs, la simplicité de la technique de prélèvement (simple prise de sang comparée à une intervention chirurgicale) rend la technique attrayante pour toute application clinique chez l'homme (Ward et al., 2007).

Kaushal et al. ont ainsi montré qu'il était possible d'endothélialiser des artères iliaques de porc avec des EPC de mouton (Kaushal et al., 2001). Aper et son équipe ont réalisé la même étude chez le porc (Aper et al., 2007). Ces 2 équipes ont montré qu'il était possible d'ensemencer des artères avec des EPC différenciées au préalable en CE. Les tests réalisés *in vivo* sur le mouton ont montré une perméabilité à 130 jours. Ces greffons présentent également la capacité de se contracter de façon comparable à un vaisseau natif. Il est à noter que la différenciation et l'expansion des EPC sont d'abord effectuées sur support conventionnel avant ensemencement dans les artères. Par ailleurs, le délai de fabrication de l'artère reste relativement long, principalement à cause du temps imparti à la différenciation des EPC en CE.

Afin de réduire le délai imputé à la différenciation des cellules, notre laboratoire a développé un coating à base de polyélectrolytes. Il a été montré que le film $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$ accélérait la différenciation des EPC de lapin en CE (Berthelemy et al., 2008; Berthelemy et al., 2009). Sur un support de verre, la différenciation des EPC est réduite à 14 jours, comparée à un support classique de fibronectine, où le temps de différenciation est de 2 mois. Il serait donc intéressant de déposer ce film $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$ sur la surface luminale des artères afin de permettre le recouvrement de la lumière par des EPC.

IV.4.3. Les revêtements de surface

Le succès clinique d'une prothèse endothélialisée repose en grande partie sur la qualité

de l'adhésion cellulaire à la surface du matériau. Afin de permettre aux cellules, ensemencées sur la surface luminale du substitut, de résister aux contraintes imposées par le sang, et de maintenir l'intégrité du néo-endothélium, différents revêtements de surface ont été testés. Les plus classiques sont l'albumine (Bos et al., 1999), la fibronectine, la colle de fibrine, la fibrine, le collagène (Budd et al., 1989; Dalsing et al., 1989; Itoh et al., 2001), le collagène-élastine (Goissis et al., 2000), la gélatine (Marois et al., 1999), le sérum et les composants de la MEC.

Developpons en premier lieu 2 composants utilisés en ingénierie cellulaire : le collagène et la fibronectine.

Une prothèse recouverte par du collagène présente un taux de retention cellulaire 3 fois supérieur à la même prothèse non traitée (Budd et al., 1989; Haegerstrand et al., 1993; Thomson et al., 1989; Vohra et al., 1991). Cependant, des études contradictoires existent (Sank et al., 1992; Stansby et al., 1994a; Stansby et al., 1994b) et la littérature scientifique reste très partagée au sujet de l'efficacité du collagène.

La fibronectine, quant à elle, permet une bonne adhésion cellulaire, mais la rétention des cellules soumises à des contraintes mécaniques est mauvaise (Fischlein et al., 1992). Par ailleurs, son efficacité est étroitement corrélée à la concentration à laquelle elle est utilisée (Budd et al., 1989; Vohra et al., 1991).

A l'inverse, le recouvrement de la surface luminale d'une prothèse par du plasma ou de la colle de fibrine semble permettre un recouvrement luminal satisfaisant, mais les tests *in vivo* ne sont pas probants (Salacinski et al., 2001; Yu et al., 2003).

Yu et son équipe ont testé *in vivo* l'efficacité de la fibronectine. Ils ont montré qu'après implantation, seul 51 % des CE subsistaient sur une prothèse recouverte de fibronectine (Yu et al., 2003). Un recouvrement par de la fibrine montre des résultats quasi similaire avec une perte de 45 % des CE après application d'une force de cisaillement (Zilla et al., 1989).

Le recouvrement par des peptides RGD n'est pas plus efficace puisqu'il ne permet qu'un recouvrement de 75 % après cisaillement des prothèses (Walluscheck et al., 1996).

Les revêtements de surface existants ne remplissent donc pas les critères de satisfaction nécessaires pour l'endothélialisation correcte des prothèses vasculaires. Aucun de ces revêtements de surface ne présente une rétention cellulaire satisfaisante après tests *in vivo* (Rotmans et al., 2006). Par ailleurs, la plupart de ces recouvrements se dégradent rapidement (Kaehler et al., 1989) et ne possèdent pas la propriété de pouvoir être fonctionnalisés avec des substances pharmacologiques actives. C'est dans ce contexte que nous avons choisi de développer l'utilisation de films multicouches de polyélectrolytes en ingénierie vasculaire.

V. Films multicouches de polyélectrolytes

Des progrès considérables ont été réalisés dans la fonctionnalisation des surfaces des dispositifs médicaux dans le but d'améliorer leur fonction biologique et les rendre les plus biomimétiques possible. Les revêtements de surface basés sur l'assemblage de molécules en plusieurs couches sont étudiés depuis les années 1930. Ces films sont notamment destinés au recouvrement des matériaux de façon à leur conférer des propriétés de surface spécifiques. La technique de Langmuir-Blodgett et la chimisorption ont été les premières méthodes utilisées pour réaliser des films multicouches. Cependant, ces techniques sont limitées à l'utilisation de certaines molécules organiques et ne permettent pas d'obtenir des assemblages multicouches stables et résistants. Depuis les années 1990, une technique basée sur l'adsorption alternée de polyanions et de polycations sur des surfaces solides a permis d'obtenir des films stables appelés *multicouches de polyélectrolytes* (MPE) pouvant atteindre des épaisseurs de plusieurs micromètres. Le dépôt couche par couche des polyélectrolytes est un procédé très simple à mettre en œuvre et qui s'applique sur tout type de substrat. Depuis une dizaine d'années, ces assemblages supramoléculaires suscitent une attention considérable en raison de leur large potentiel d'applications, notamment en tant que revêtements d'implants, traitements de surface antireflets pour l'optique, systèmes de séparation de molécules et de nanofiltration, ou encore membranes à haute résistance mécanique.

Depuis une dizaine d'année, le film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH a été développé au laboratoire et a montré des propriétés intéressantes pour la réalisation d'un substitut vasculaire de petit calibre.

V.1. Dépôt des films : technique « couche par couche » (« *layer by layer* »)

Différents types de molécules chargées peuvent être utilisés pour la réalisation des films multicouches (Bertrand et al., 2000; Cooper et al., 2005; Decher and Schlenoff, 2003; Kotov, 1999). Les polyélectrolytes sont les plus fréquemment utilisés pour la réalisation de ce type d'architecture. Le principe de la méthode de dépôt couche par couche, "Layer-by-Layer" (LbL) est décrit très schématiquement dans la figure 28.

Un substrat chargé négativement est d'abord mis au contact d'une solution polycationique pendant un temps donné (5 à 20 min) (Advincula et al., 1996; Hoogeveen et al., 1996; Ramsden et al., 1995). Les polycations s'adsorbent sur la surface et l'excès est éliminé par simple rinçage (Caruso et al., 1998a; Caruso et al., 1998b; Lvov et al., 1999). Après rinçage, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement : il y a surcompensation de charges lors de l'adsorption (Caruso et al., 1998a; Caruso et al., 1998b; Ladam et al., 2000). Lorsque ce substrat est ensuite exposé à une seconde solution, contenant des polyanions, ceux-ci peuvent également interagir électrostatiquement et s'adsorber sur la surface. Cette adsorption est à nouveau suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée négativement en raison d'une surcompensation de charges négatives. La surcompensation de charge après chaque dépôt a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta (Caruso et al., 1999; Hoogeveen et al., 1996; Ladam et al., 2000) et constitue la force motrice de la construction des films multicouches.

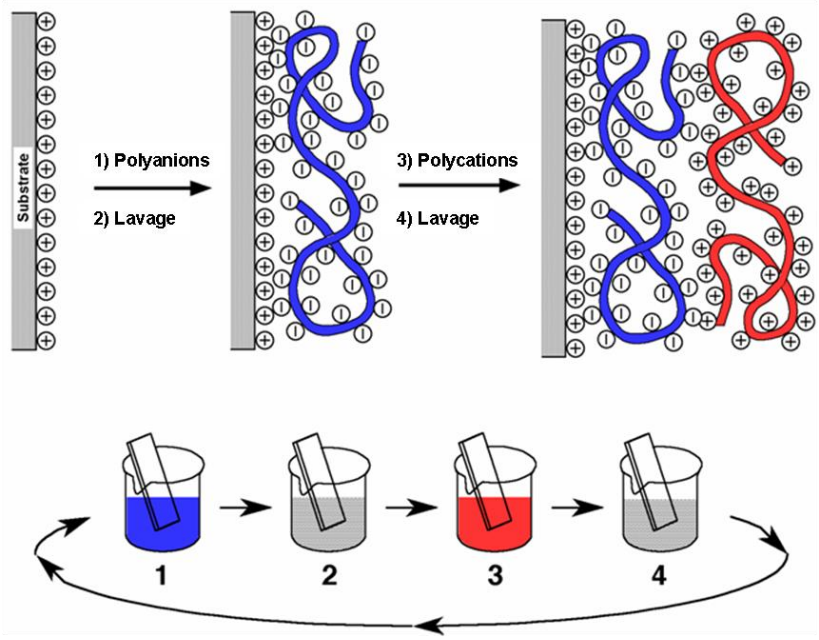


Figure 28 **: Principe de construction de film multicouche de polyélectrolytes.**
Dans le cas illustré, le substrat est chargé positivement en surface. Le premier dépôt consiste à plonger le substrat dans une solution de polyanions (représentée en bleu). Après un lavage, un second dépôt est effectué à l'aide d'une solution de polycations (représentés en rouge) (Decher, 1997b) .

Le protocole de dépôt est simple et applicable à différents types de substrats, y compris biologiques tels que les artères. Des films contenant des espèces moléculaires chargées, incluant des polypeptides, polysaccharides, ADN, protéines, virus peuvent également être construits de façon à apporter une fonction supplémentaire au film.

V.2. Mode de croissance

Le premier système de polyélectrolytes a été décrit par Decher et al (Decher, 1997a). Ce système montre la croissance linéaire à la fois de la masse et de l'épaisseur du film proportionnellement au nombre de couches déposées. Le couple polystyrène sulfonate/polychlorohydrate d'allylamine (PSS-PAH) est un des exemples les plus typiques de système à croissance linéaire (Picart, 2008). Ce film a une structure stratifiée, chaque couche de polyélectrolytes interpénétrant seulement avec ses voisines.

Le film PAH/PSS est caractérisé par une épaisseur qui augmente proportionnellement avec le nombre de couches déposées. Ce système est l'exemple le plus largement étudié. Des analyses par réflectométrie des rayons X et réflectivité des neutrons, réalisées sur des films construits avec des polyélectrolytes deutérés, ont mis en évidence l'existence d'une structure relativement stratifiée (Decher, 1997b). En effet, les résultats ont montré que dans les films PAH/PSS, les polyélectrolytes ne pénètrent que les couches adjacentes constituant ainsi une structure pseudo-stratifiée avec un désordre local baptisé « *fuzzy layers* » (Decher, 1997b).

Il est à noter que, bien qu'il existe des films dont la croissance est exponentielle, ces derniers atteignent des épaisseurs très importantes après le dépôt de quelques paires de couches seulement (supérieures à 1 µm pour une dizaine de paires de couches). La croissance du film par cycle dépend du pH et de la force ionique de la solution. Ces films s'obtiennent notamment en utilisant des polypeptides ou des polysaccharides.

V.3. Biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes

Les films synthétiques multicouches de polyélectrolytes les plus étudiés sont de loin les films denses et à croissance linéaire tels que PAH/PSS. La biocompatibilité de ces films a été testée avec différents types cellulaires tels que les CE, les fibroblastes, les ostéoblastes et les hépatocytes (Picart, 2008). D'une façon générale, l'adhésion et la prolifération des cellules sur ces films sont très bonnes. Ceci est attribué à la présence de groupes sulfonate (Picart, 2008).

V.4. Interactions mises en jeu lors de la construction du film

Les supports les plus souvent utilisés sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales dont la nature et les dimensions dépendent des applications envisagées et des techniques de caractérisation employées.

Pour de nombreux substrats organiques non chargés en surface, des interactions de type Van der Waals ou/et hydrophobes assurent l'adsorption de la première couche de polyélectrolyte sur ce support.

Plusieurs types d'interactions peuvent être impliqués dans la construction des

films : les interactions électrostatiques, les liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogènes. La nature de ces interactions dépend du type de molécules adsorbées et définit les forces impliquées.

V.4.1. Interactions électrostatiques

La construction des films multicouches de polyélectrolytes met principalement en jeu les forces électrostatiques entre les polyions. Les propriétés du film sont liées à la nature (groupements ioniques qu'il comporte) et à la conformation des chaînes des polyélectrolytes (densité et distribution des groupements ioniques le long de la chaine).

V.4.2. Liaisons hydrophobes

Les polyélectrolytes possèdent souvent des régions aliphatiques. Les forces hydrophobes contribuent donc parfois fortement à la conformation de ces régions dans les films. Les travaux menés par Kotov ont montré que la contribution des interactions hydrophobes est indispensable lors du phénomène d'adsorption (Kotov, 1999). Les polyélectrolytes à caractère hydrophobe se présentent sous forme associée en solution et en se rapprochant de la surface chargée du substrat, ils se séparent pour s'y adsorber et former un film stable (Cochin and Laschewsky, 1999). Il est même possible dans certains cas d'utiliser une surface non chargée, elle même hydrophobe, pour promouvoir l'adsorption (Delcorte et al., 1996; Delcorte et al., 1997).

V.4.3. Liaisons hydrogènes

Dès 1997, l'équipe de Rubner a montré la possibilité de construire des films multicouches en alternant des polymères neutres interagissant par le biais de liaisons hydrogène (Rubner, 1997). Ces liaisons étant très faibles et extrêmement sensibles au pH, il devient envisageable de construire le film à un pH tel que ces liaisons en assurent la stabilité (Wang et al., 1997). En modifiant le pH, les ponts hydrogène peuvent être rompus et entraîner la dissolution du film (Sukhishvili and Granick, 2002).

V.5. Expertise du laboratoire

L'équipe Ingénierie vasculaire de l'UMR-CNRS 7561 étudie l'interaction des films multicouches de polyélectrolytes avec les CE depuis le début des années 2000.

Les résultats obtenus par Boura et al. ont montré que le film $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$ constituait l'un des meilleurs films pour la culture de CE (Boura et al., 2003) (figure 29). En effet, ce film semble favoriser l'adhésion et le développement des CE, probablement grâce à des interactions non spécifiques fortes.

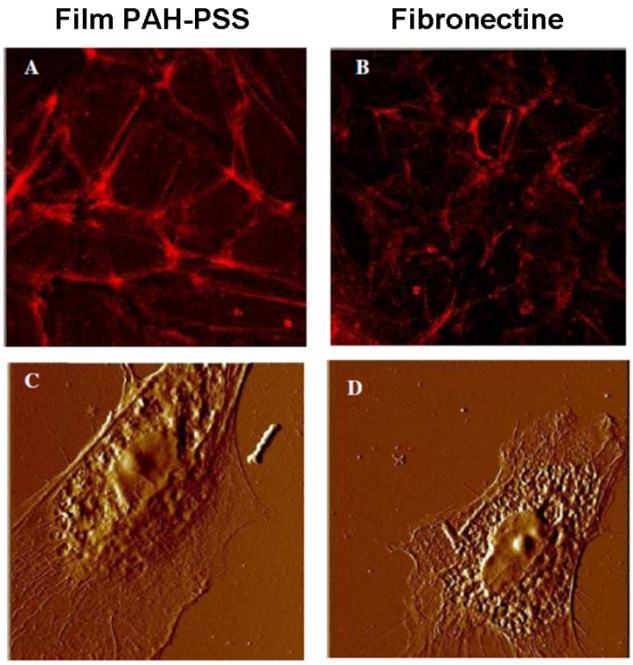


Figure 29 **: Photographie montrant l'étalement des cellules endothéliales.**
L'observation est réalisée par microscopie de fluorescence confocale. (A et B, cytosquelette en rouge) et microscopie à force atomique en mode contact (C, D). Les images montrent un meilleur étalement des cellules endothéliales sur le film multicouche de polyélectrolytes (A,C) que sur la fibronectine (B, D) (Boura et al., 2005).

Par ailleurs, Berthélémy et al. ont montré que le film améliorait le temps de différenciation des EPC en CE par rapport à un support classique de fibronectine (Berthelemy et al., 2008) (figure 30).

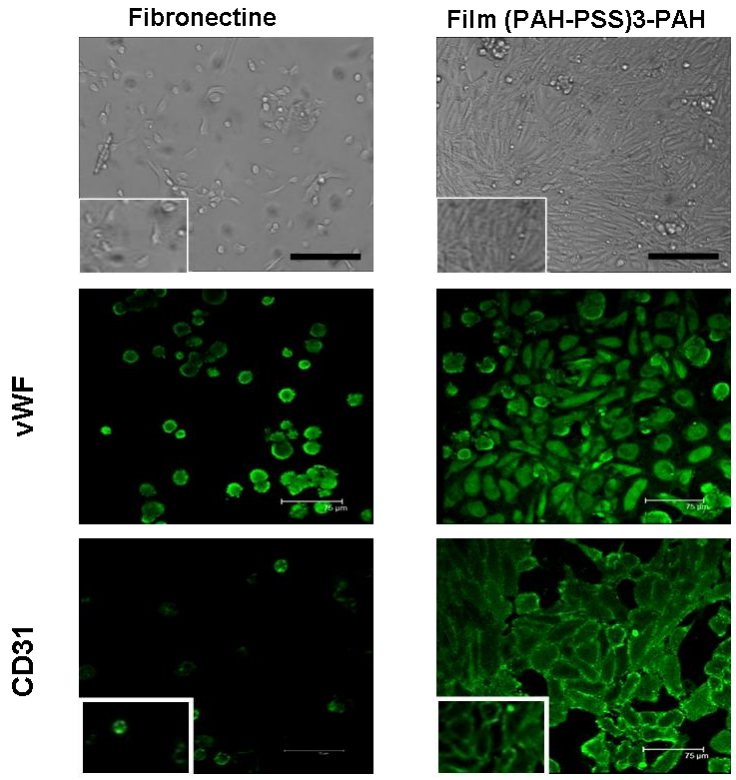


Figure 30 : **Photographie en microscopie à contraste de phase et en microscopie confocale (objectif X 40) d'EPC cultivés sur un support de verre recouvert soit de fibronectine soit de film (PAH-PSS)$_3$-PAH.** *La prolifération et la différenciation (vWF et CD31) des EPC en CE sont meilleures avec le film multicouche de polyélectrolytes (Berthelemy et al., 2008).*

Il a également été montré que le film favorisait la différenciation des EPC placées en hypoxie en CML (Berthelemy et al., 2009). De plus, il a démontré *in vitro* que le film (PAH-PSS)$_3$-PAH favorisait l'adhésion et la différenciation de CSM sur lames de verre recouvertes de film MPE (Moby et al., 2008).

.

Enfin, il semblerait que le film (PAH-PSS)$_3$ déposé sur la surface luminale d'artères ombilicales permette de maintenir la perméabilité des vaisseaux de petits diamètres une fois implantés sur le lapin (Kerdjoudj et al., 2008) (figure 31).

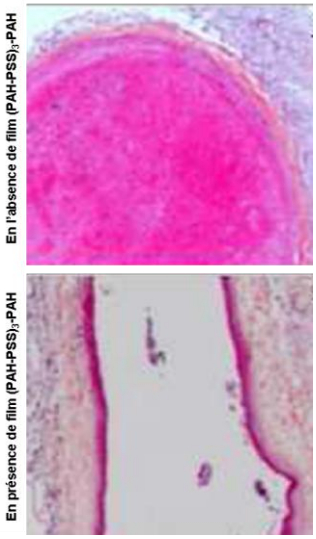


Figure 31**: Coupes histologiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film (PAH-PSS)$_3$ après une semaine d'implantation.** *La lumière des artères non traitées par le film est obstruée après une semaine d'implantation, (microscope inversé Olympus IX 50, Japon). Coloration hématoxyline-éosine-safran ; grossissement × 200 ; nombre de lapins = 6 (Kerdjoudj et al., 2008).*

Cette propriété est principalement attribuée à une répulsion électrostatique entre le film chargé négativement et les cellules, elles-mêmes chargées négativement à cause des héparanes sufate et des protéoglycannes présentes à la surface de la membrane plasmique.

V.6. Ambition et projet de développement

La littérature actuelle met en évidence l'absence de substituts vasculaires performants de petits calibres. La principale difficulté est de maintenir la perméabilité du substitut à long terme. Pour permettre une telle performance, les pistes de réflexion convergent toutes vers l'idée d'obtenir une surface luminale non thrombogène en reconstruisant un endothélium fonctionnel dans la lumière du vaisseau. Cependant, aucun revêtement de surface n'est, à l'heure actuelle, suffisamment performant pour permettre la pérénnité de cet endothélium sur le long terme. Au vu des résultats prometteurs obtenus ces 10 dernières années avec les films MPE par l'équipe vasculaire de l'UMR-CNRS 7561, notre ambition est de mettre au point un substitut vasculaire de petit calibre performant, obtenu par endothélialisation pérenne de sa surface luminale grâce à un film (PAH-PSS)$_3$-PAH.

Objectifs

de

l'étude

L'objectif de cette étude est d'élaborer une nouvelle matrice vasculaire de petit calibre dont la lumière revêtirait des propriétés anti-thrombogéniques grâce à la reconstitution d'un néo-endothélium autologue sur un support naturel fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes.

Dans une première étape, la persistance des cellules ensemencées sur un support biologique recouvert de film multicouche de polyélectrolytes a été évaluée *in vitro* après application d'une contrainte de cisaillement. Les artères ont été préalablement acellularisées de façon à permettre une vérification quantitative de la cellularisation par dosage des ARN totaux. L'état de la matrice et le phénotype des cellules ont été appréciés par histologie et microscopie confocale. Enfin, l'impact des films sur le fonctionnement cellulaire a été déterminé par qPCR.

Dans une deuxième étape, cette technique a été validée sur des vaisseaux de référence utilisés couramment en clinique. Des veines saphènes humaines ont ainsi été recouvertes d'un film multicouche de polyélectrolytes, puis implantées au niveau de la carotide de lapin. Le dépôt correct du film ainsi que la structure de la veine ont été vérifiés par histologie, tandis que la perméabilité du substitut a été évaluée *in vivo* par une technique non invasive basée sur l'échographie-Doppler.

Dans une troisième étape, des artères fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes et ensemencées avec des cellules endothéliales ont été préconditionnées par un cisaillement progressif, puis expertisées *in vivo.* Le suivi au cours du temps des substituts implantés chez le lapin a été effectué par échographie-Doppler. Après explantation, le remodelage potentiel des substituts a été estimé par histologie et microscopie confocale.

Les 3 premières étapes ont permis de valider le concept d'endothélialisation d'une matrice vasculaire à partir de cellules matures. Dans le but d'obtenir des prothèses non immunogènes, cette étude s'est poursuivie par l'endothélialisation d'une matrice vasculaire par des cellules progénitrices endothéliales issues du lapin.

Ainsi, dans cette dernière étape, des artères dont la surface a été modifiée par un film multicouche de polyélectrolytes ont été ensemencées avec des cellules progénitrices endothéliales, analysées *in vitro* avant et après cisaillement et enfin expertisées *in vivo*.

Matériel

et

Méthodes

I. Culture cellulaire et tissulaire

I.1. Culture Cellulaire

Au cours de ces travaux, plusieurs types de cellules ont été utilisés :

- des cellules de veine ombilicale humaine (HUVEC) ;
- des cellules mononucléées extraites du sang périphérique de lapin

I.1.1. Réactifs et milieux de culture

Tampons sans calcium ni magnésium : deux types de tampons isotoniques sont utilisés dans la plupart des étapes de culture cellulaire (lavage des cultures principalement). Leur composition est donnée dans le tableau IV.

Tableau IV : **Composition des tampons sans calcium ni magnésium.**

Tampon	Constituants	Préparation	Fournisseur
Hank's balanced salt solution (HBSS)	KCl 5 mM, NaCl 137 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, Na_2HPO_4 0,3 mM, D-glucose 5 mM, Rouge de phénol 0,03 mM.	- Reconstitution de la solution par dissolution de la poudre dans 1L d'eau distillée -pH ajusté entre 7,2 et 7,4 - Filtration sur membrane de 0,22 µm	Sigma, France
Phosphate Buffer Saline (PBS)	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,4 mM.	- pH ajusté entre 7,2 et 7,4 - Filtration sur membrane de 0,22 µm	Préparé au laboratoire

Gradient de densité : Histopaque 1077 (Sigma, France) est une solution de polysucrose et de diatrizoate de sodium ajustée à une densité de 1,077g/mL. Cette solution permet de séparer les cellules mononucléées des autres constituants du sang.

Solution de digestion (Enzymes) : à chaque passage, le détachement des cellules est réalisé à l'aide d'un mélange trypsine-EDTA à 0,25 % (Sigma, France), soit 2,5 g de trypsine porcine et 0,2 g d'EDTA tétrasodique dans 100 mL d'HBSS.

Milieu de culture : le milieu utilisé pour la culture des cellules (EPC ou HUVEC) est le *Endothelial Basal Medium-2* (EBM-2 : Lonza, Belgique). Il est supplémenté avec :

- 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 56°C pendant 30 min
- VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ;
- FGF (*fibroblast growth factor*) ;
- EGF (*epidermal growth factor*) ;
- IGF (*insulin like growth factor*) ;
- acide ascorbique ;
- héparine ;
- hydrocortisone ;

SingleQuots, (Lonza, Belgique)

- gentamycine ;
- 100 UI/mL de pénicilline (Sigma, France) ;
- 100 µg/mL de streptomycine (Sigma, France) ;
- 2 mM de glutamine (Sigma, France) ;
- 2,5 µg/mL de fungizone (Sigma, France).

I.1.2. Isolement des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine

I.1.2.1. Dons de cordon ombilical

Les cordons ombilicaux humains sont fournis par la Maternité régionale de Nancy. En conformité avec la loi de bioéthique et de recherche clinique, en raison de la convention « de cession de fragments de cordons ombilicaux à but non thérapeutique » établie entre l'Unité de thérapie cellulaire et tissulaire (UTCT), le Laboratoire d'ingénierie cellulaire et tissulaire UMR-CNRS 7561 et la Maternité régionale de Nancy, et après consentement libre et éclairé de la mère, les cordons ombilicaux de nouveau-nés, sont prélevés par les sages-femmes et stockés dans du tampon HBSS, à 4°C, avant d'être acheminés au laboratoire. Un specimen du formulaire de consentement est présenté dans la figure 32.



ANNEXE III

Formulaire de recueil du consentement des donneurs

Maternité Régionale de Nancy
10 rue du Docteur Heydenreich
54000 NANCY
☎ 03 83 34 44 44

UTILISATION DES CORDONS A DES FINS NON THERAPEUTIQUES

A DEFINIR

Si vous consentez à ce que tout ou partie de votre don soit utilisé à des fin non directement thérapeutiques, merci de le manifester en complétant et signant le volet ci-dessous.

NOM :

Je soussigné(e) .....

Après avoir été informé(e) par la Maternité Régionale de Nancy de l'utilisation du cordon à des fins non directement thérapeutiques, déclare consentir à ce que mes prélèvements soient en tout ou en partie orientés vers une telle utilisation, et ceci dans le respect des règles éthiques.

Fait à ..... Le .....

Signature

Date et signature du cédant

Nancy, le

Directeur
Maternité Régionale de Nancy

Date et signature du cessionnaire

Nancy, le
Professeur Jean-Pierre FINANCE
Président
Université Henri Poincaré, Nancy I

Figure 32: **Formulaire de recueil du consentement des cordons ombilicaux extrait de la convention « cession de fragments de cordons ombilicaux à but non thérapeutique ».** *Ce formulaire doit être complété et signé par toute femme faisant don de son cordon.*

I.1.2.2. Constitution de la primo-culture

Le cordon ombilical contient deux artères et une veine, entourées d'une masse gélatineuse appelée gelée de Wharton (figure 33).

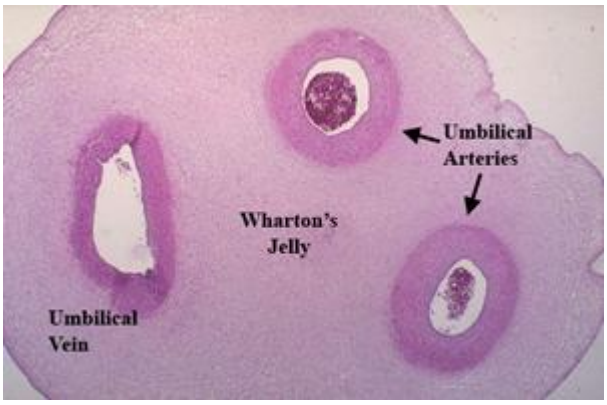


Figure 33 : **Photographie d'une coupe transversale de cordon ombilical humain.**
Le cordon comporte 2 artères et 1 veine enveloppées de gelée de Wharton.
http://www.frcblog.com/wp-content/uploads/2009/12/umbilicalcord-crosssection3.jpg

La mise en culture des HUVEC est effectuée selon la méthode de Jaffe (Jaffe et al., 1973).

Le matériel utilisé pour isoler les HUVEC doit être stérilisé à l'autoclave (130°C pendant 30 min). L'isolement est réalisé en 2 étapes principales :

- Lavage de la veine (figure 34) : le cordon est déposé dans une boîte de Pétri. L'extérieur du cordon est nettoyé avec de l'éthanol 70 %. Un robinet (Polylabo, France) est introduit dans l'orifice de la veine puis ligaturé fortement à l'une des extrémités du cordon. La veine est lavée trois fois avec du tampon HBSS préchauffé à 37°C afin d'éliminer le sang. Après lavages, la deuxième extrémité libre du cordon est fermée à l'aide d'un clamp vasculaire.

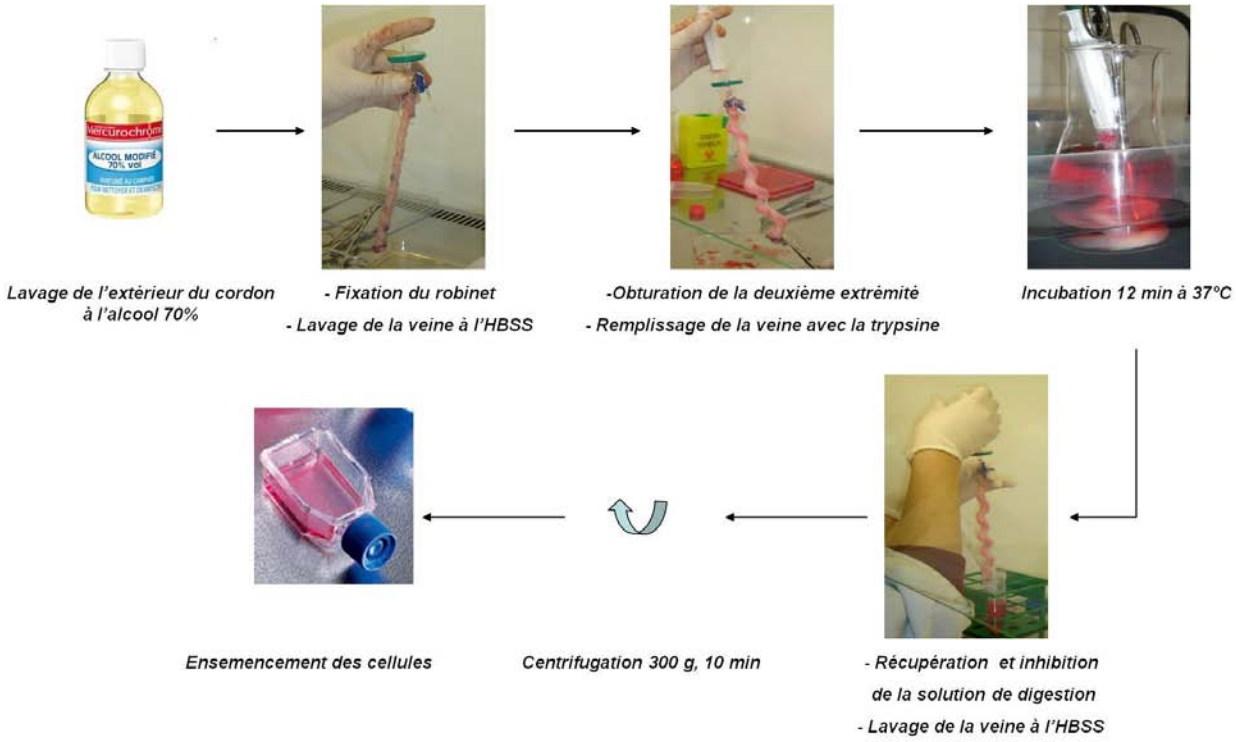


Figure 34 : **Schéma retraçant les différentes étapes du protocole d'isolement des HUVEC.**

- Détachement et mise en culture des cellules endothéliales (figure 35) : la veine est remplie avec 15-20 mL de trypsine à 0,25g/L (Sigma, France). Le cordon est immergé dans le tampon HBSS puis placé au bain-marie pendant 12 min à 37°C. Il est ensuite posé dans une boîte de Pétri et massé doucement quelques secondes. Le clamp vasculaire est retiré. La solution de digestion est recueillie dans un tube de 50 mL et l'action de la trypsine est alors inhibée par 5 mL de sérum. La veine est lavée trois fois avec du tampon HBSS afin de récolter le maximum de cellules. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 300 *g* pendant 10 min à TA. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet. Les cellules sont ensemencées dans une boîte de culture de 25 cm^2 (Nunc®, Deutcher, France), puis placées dans un incubateur à 37°C et à 5 % de CO_2.

Dès le lendemain, l'observation des cellules au microscope inversé à contraste de phase (Olympus, Japon) montre que la plupart des CE ont adhéré au fond de la boîte. Elles forment de nombreux îlots cellulaires. Le milieu contenant des érythrocytes est éliminé, et les

cellules sont lavées deux fois avec du tampon HBSS. Elles sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu de culture.

I.1.3. Isolement des cellules progénitrices endothéliales

I.1.3.1. Cadre éthique de l'expérimentation animale

Toutes les expérimentations effectuées ont été réalisées chez le lapin en respectant les règles éthiques en vigueur en Europe (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, liées à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). Les conséquences de cette réglementation sont développées dans le paragraphe III intitulé : évaluation *in vivo* du substitut : suivi post-implantation.

I.1.3.2. Anesthésie de l'animal

Le lapin néo-zélandais (Cégav, France) est anesthésié par injection intraveineuse de pentobarbital sodique (Ceva, France). Le protocole d'anesthésie est détaillé dans le paragraphe III intitulé : évaluation *in vivo* du substitut : suivi post-implantation.

I.1.3.3. Prélèvement du sang

L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal. Les zones d'intervention chirurgicale sont rasées. Après application d'un anesthésique local (Xylocaïne, Astra Zenaca, France), une incision d'environ 4 cm est pratiquée au niveau du cou, le long de la trachée, afin de dégager la carotide. Une administration intraveineuse de 300 U/mL d'héparinate de sodium (Sanofi Synthelabo, France) est effectuée par la veine marginale de l'oreille pour prévenir la formation de caillots. Après avoir clampé la carotide au niveau distal et proximal, une artériotomie proximale (0,5 cm) est pratiquée et un cathéter hépariné est alors introduit dans la carotide. Le sang (60 à 80 mL) est ensuite prélevé dans des seringues de 20 mL préalablement héparinées. Les prélèvements sanguins sont conservés à 4°C avant leur utilisation.

I.1.3.4. Euthanasie et devenir des cadavres

Après prélèvement sanguin, les animaux sont euthanasiés en conformité avec les recommandations publiées par la Commission européenne (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, lié à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). Le protocole et le devenir des

cadavres sont précisés dans le paragraphe III intitulé : évaluation *in vivo* du substitut : suivi post-implantation.

I.1.3.5. Isolement des EPC

Un gradient de densité est effectué sur le sang prélévé afin d'en séparer les différents constituants du sang (plaquettes, cellules mononucléées et globules rouges) (figure 35). 10 mL de sang sont dilués dans 16 mL de PBS. Le sang dilué est alors ajouté doucement à 10 mL d'Histopaque® 1077, puis centrifugé à 400 *g* pendant 30 min. L'anneau de leucocytes ainsi séparé est aspiré avec une pipette Pasteur stérile, puis transféré dans un tube contenant 10 mL de MCDB 131 (Gibco, France) supplémenté de 5 U/mL d'héparinate de sodium. Le tube est ensuite centrifugé à 250 *g* pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 mL de MCDB 131 hépariné. Cette dernière opération est répétée trois fois. Le culot est alors resuspendu dans du milieu de culture EBM-2 et les cellules sont ensemencées sur les différents supports à étudier.

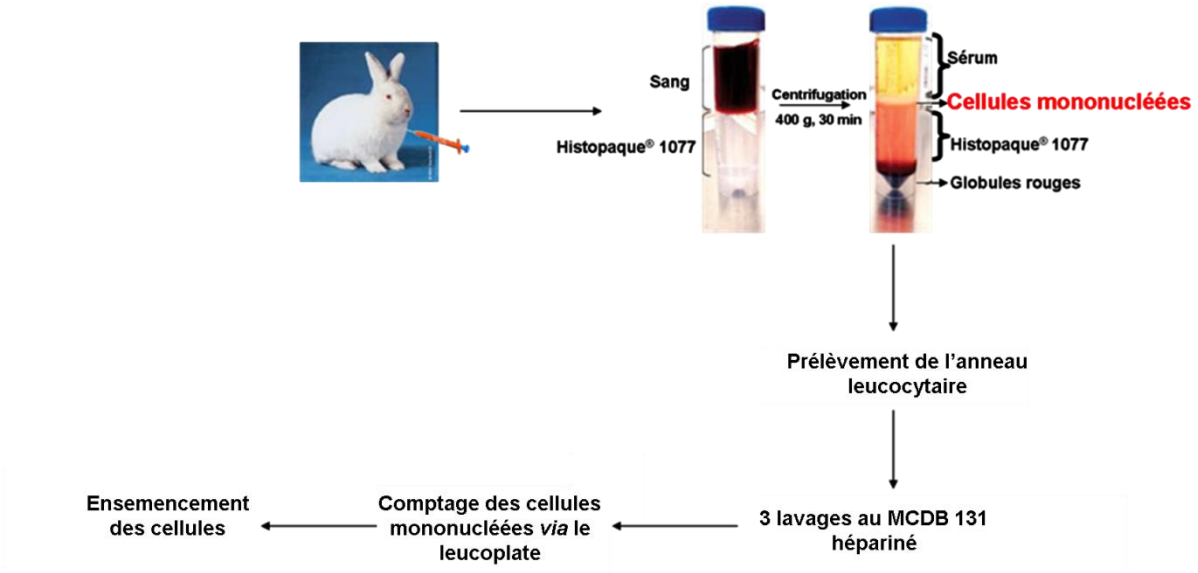


Figure 35 : **Schéma montrant les différentes étapes du protocole d'isolement des EPC.**

Au bout de 4 jours de culture, deux lavages sont réalisés avec du MCDB 131 afin d'éliminer les cellules non adhérentes et les globules rouges résiduels.

I.1.4. Passage en subculture

A confluence (figure 36), le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées avec 5 mL de tampon HBSS.

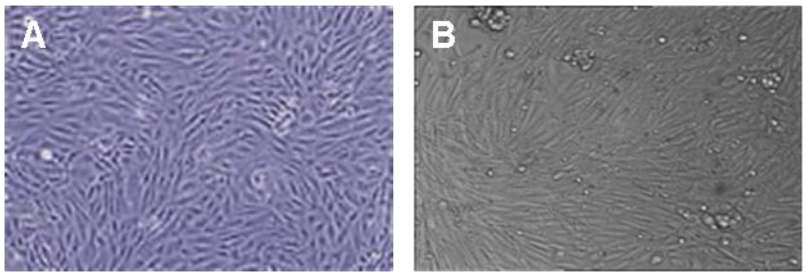


Figure 36 : **Photographie en microscopie à contraste de phase d'HUVEC en passage 0 (A) et de cellules endothéliales-*like* issues d'EPC en passage 0 (B), x 20.**

Ce lavage permet à la fois d'éliminer le sérum (qui inhiberait l'activité enzymatique de la trypsine) mais aussi de libérer des ions Ca^{2+} qui faciliteront le détachement des cellules. Les cellules sont détachées à l'aide de 5 mL de trypsine à 0,25g/L (Sigma, France). Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé à contraste de phase (Olympus, France). L'action de la trypsine est inhibée par ajout de 2 mL de milieu de culture grâce aux protéines sériques contenues dans le sérum (α-2-macroglobuline et enzyme anti-trypsique). La suspension cellulaire est recueillie, puis centrifugée à 300 *g* pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire remis en suspension dans du milieu de culture. La suspension cellulaire est enfin ensemencée.

I.2. Préparation des matrices vasculaires

Les artères ombilicales sont extraites du cordon sous hotte à flux laminaire au laboratoire. Les veines saphènes nous sont fournies par un partenaire industriel : la banque de tissus BioProtec®.

I.2.1. Milieux de conservation des vaisseaux

I.2.1.1. Milieux de conservation des artères ombilicales

Milieu de cryoconservation : les artères sont congelées par descente progressive à basse

température (-180°C) dans un milieu de cryoconservation. Celui-ci est constitué de 70 % de milieu de culture supplémenté de 20% de SVF décomplémenté et de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma, France).

Solution de décontamination : après chaque traitement, les artères sont conservées à 4°C dans une solution de décontamination. Cette dernière est constituée d'HBSS supplémenté de 100 UI/mL de pénicilline, de 100 µg/mL de streptomycine et de 2,5 µg/mL de Fungizone®. Elle est filtrée sur filtre 0,22 µm (Millipore, France) et conservée à 4°C.

I.2.1.2. Milieu de conservation des veines saphènes

Les veines saphènes sont conservées dans un milieu isotonique tamponné contenant des antibiotiques à large spectre et des antifongiques en quantités nécessaires et suffisantes pour maintenir la stérilité des veines. Ces dernières nous étant fournies par la société BioProtec®, la composition du milieu de conservation ne peut être davantage détaillée pour des raisons de confidentialité.

I.2.2. Isolement et conservation des vaisseaux

I.2.2.1. Isolement et conservation des artères ombilicales

Après récupération des HUVEC, le cordon ombilical humain est placé dans une boîte de Pétri stérile et il est coupé en tronçons de 7 cm de long. La veine est ensuite ouverte longitudinalement afin de faciliter l'extraction des artères. La gelée de Wharton est alors éliminée à l'aide de clamps et les artères dégagées. Chaque artère est placée dans un cryotube stérile (Nunc®, France) contenant 1 mL de milieu de cryocongélation. Les cryotubes sont conservés une nuit à -80°C, puis stockés dans de l'azote liquide pendant au moins six mois, durée réglementaire correspondant au temps nécessaire pour effectuer les tests sérologiques avant l'utilisation des tissus.

I.2.2.2. Isolement et conservation des veines saphènes

Les veines saphènes ont été fournies par la société privée BioProtec®. Cette banque de tissus permet de fédérer sur le territoire français les activités de recueil de veines saphènes

ainsi que d'assurer la production et la cession d'allogreffons veineux aux établissements demandeurs.

Les veines saphènes humaines sont ainsi prélevées suivant un protocole clairement établi, permettant leur tracabilité (annexe). Elles sont isolées par *stripping* au cours d'une intervention chirurgicale sur des patients sains. Les qualités mécaniques et bactériologiques des veines prélevées sont vérifiées, les éventuels vaisseaux collatéraux sont ligaturés et les veines éventuellement anastomosées. Les allogreffons sont alors stockés à 4°C dans leur milieu de conservation.

I.2.3. Décongélation et traitement des artères ombilicales

I.2.1.3.1. Décongélation des artères

Avant utilisation, les artères ombilicales sont décongelées au bain-marie à 37°C. Elles sont ensuite lavées deux fois avec la solution de décontamination. Cette étape est nécessaire pour éliminer toute trace de DMSO (car cytotoxique pour les cellules à 37°C).

I.2.1.3.2. Traitement des artères

Après décongélation et selon le protocole retenu, les artères subissent un traitement visant à éliminer toute ou une partie des cellules vasculaires. Elles seront alors soit acellularisées, soit désendothélialisées :

- acellularisation, c'est-à-dire élimination de toutes les cellules présentes dans le tissu vasculaire. Seule la matrice vasculaire est conservée. Après lavage, les artères sont incubées avec dodécylsulfate de sodium (SDS) à 0,5 % (Sigma, France) sous agitation, pendant 24h, à 37°C. Elles sont ensuite lavées avec du PBS pendant 24h, à 37°C, sous agitation, puis incubées avec une solution de DNase à 0,2 mg/mL et de RNase à 20 µg/mL (Sigma, France), pendant 24h, à 37°C et sous agitation. Pour finir, les artères sont de nouveau lavées avec du PBS pendant 24h, à 37°C, sous agitation, puis stockées à 4°C.

- désendothélialisation, c'est-à-dire élimination des CE uniquement. Les extrémités de l'artère sont tout d'abord canulées et un petit embout fixé à chaque extrémité afin de permettre l'injection de liquide dans la lumière. Celle-ci est lavée trois fois avec 3 mL

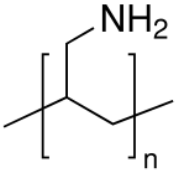
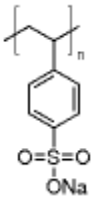
du tampon HBSS. L'artère est ensuite désendothélialisée par une action enzymatique à l'aide de trypsine. Après 30 min d'incubation, l'action de la trypsine est inhibée avec 2 mL de milieu de culture. La désendothélialisation est complète après plusieurs injections de tampon HBSS dans la lumière. La lumière de l'artère est alors prête à être recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes.

I.2.4. Modification de la surface luminale par un film multicouche de polyélectrolytes (MPE).

I.2.4.1. Solutions de polyélectrolytes

La concentration des polyélectrolytes utilisés est de 5 mg/mL. Les solutions sont préparées dans un tampon Tris/NaCl (Tris 10 mM et NaCl 150 mM) pH 7,2. Ce tampon est également utilisé pour les différents lavages. Les principales caractéristiques et les structures des monomères des polyélectrolytes utilisés sont données dans le tableau V.

Tableau V : **Caractéristiques des polyélectrolytes.**

Polyélectrolyte	**Formule chimique**	**Poids (kDa)**	**Fournisseur**
Polycation : Chlorhydrate de polyallylamine (PAH)		56	Sigma Aldrich, France
Polyanion : Polystyrène -4-sulfonate de sodium (PSS)		70	Sigma Aldrich, France

Remarque : avant leur utilisation, les solutions sont filtrées sur 0,22 µm et sont conservées à 4°C.

I.2.4.2. Dépôt des polyélectrolytes dans la lumière des vaisseaux

Les films MPE sont déposés à TA dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées préalablement traitées. Le schéma du dispositif utilisé pour déposer les films

est illustré figure 37.

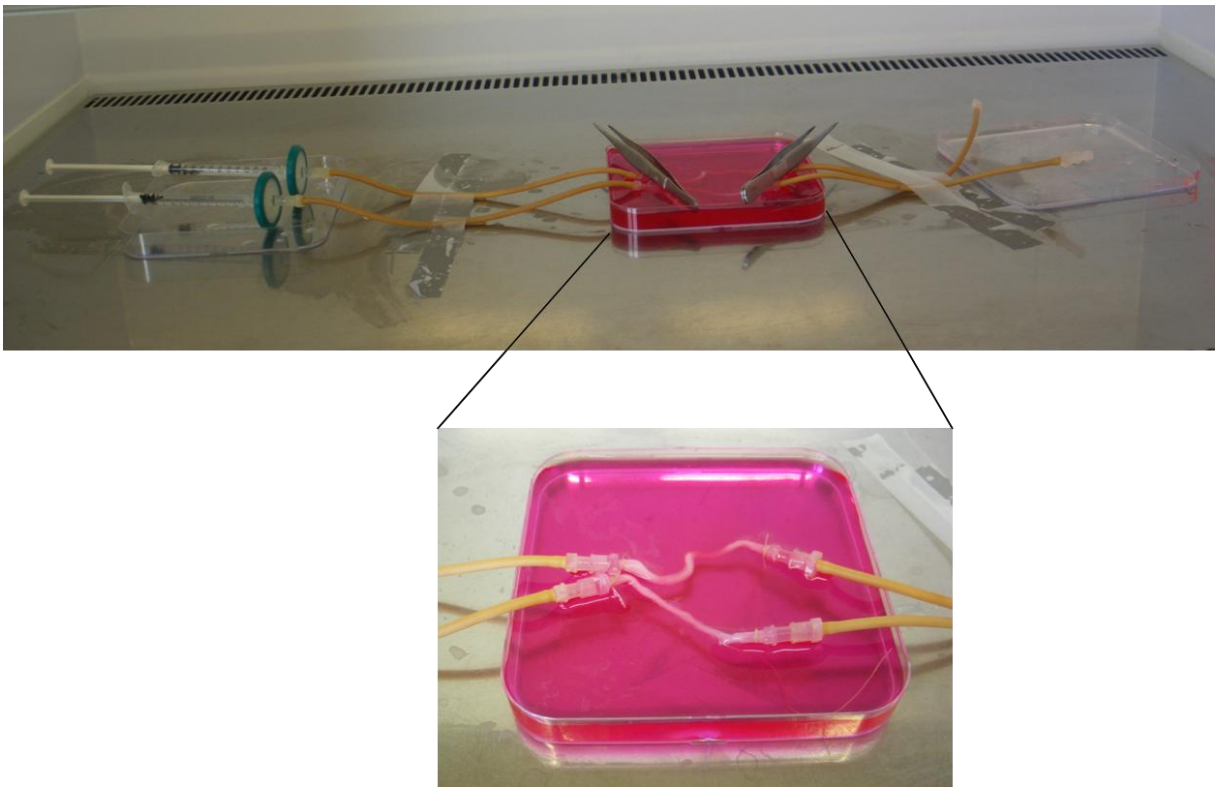


Figure 37 : **Photographie du dispositif permettant d'injecter les solutions de polyélectrolytes dans la lumière de l'artère afin d'y déposer les films MPE.**

Après deux lavages à TA au tampon Tris/NaCl, la solution de polycations (PAH) constituant la première couche, est injectée dans la lumière de l'artère. Elle est incubée pendant 15 min à TA dans la lumière de l'artère. Cette étape est suivie par trois lavages de trois minutes au tampon Tris/NaCl. Les solutions de PSS et de PAH constitutives des deuxième et troisième couches, sont alternativement injectées et adsorbées pendant 15 min. Les trois premières couches sont ainsi obtenues. Entre chaque dépôt, trois lavages de 3 min chacun, au tampon Tris/NaCl, sont effectués. L'opération est répétée jusqu'à obtention du nombre de couche désiré.

Les films $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH que nous avons construits comportent trois bicouches PAH/PSS et une couche de PAH.

Les artères cryoconservées, traitées et soumises uniquement aux opérations de lavages sont considérées comme témoins. Les artères traitées par les films MPE et les artères témoins sont conservées et décontaminées toute une nuit à 4°C dans la solution de décontamination avant utilisation.

Remarque : le film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH est également déposé sur des lames de verre préalablement traitées 15 min par du SDS (Sigma, France) et de l'HCl (Sigma, France) bouillants. Ces supports nous serviront à évaluer la vitesse de croissance des EPC ensemencées à l'intérieur des artères.

I.2.4.3. Ensemencement des cellules dans la lumière des matrices artérielles

a. Ensemencement des CE et cellules endothéliales-*like*

Les cellules endothéliales ou les cellules endothéliales-*like* (issues d'EPC) sont trypsinées (comme décrit précédemment dans le paragraphe « Passage en subculture ») et comptées sur une cellule de Thoma. La viabilité des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma, France). La viabilité est supérieure à 90 %. Les CE sont ensuite injectées dans les différentes matrices (acellularisées et désendothélialisées) de façon à obtenir une densité de 1×10^5 cellules/cm^2. Afin de permettre une répartition optimale des cellules, les substituts endothélialisés sont placés sous légère agitation pendant 4 heures à l'aide d'un agitateur à balancement générant des mouvements de bascule lents (Apelex, France). Chaque artère réendothélialisée est plongée dans un flacon de culture puis placée dans un incubateur à 37°C (5 % de CO_2 et 95 % d'air) et cultivée pendant une semaine.

b. Ensemencement des cellules mononucléées

Les cellules mononucléées sont récupérées à partir d'un prélèvement de sang (comme décrit dans le paragraphe « isolement des EPC »). Les cellules sont comptées sur une cellule de Thoma en prenant soin de discriminer les globules rouges par une coloration au Leucoplate (Sobioda, France). Les cellules sont ensuite soit ensemencées sur des plaques de verre à une densité de 2×10^6 cellules/cm^2 afin d'y être préalablement différenciées en cellules endothéliales-*like,* soit injectées directement dans la matrice désendothélialisée à une densité de 5×10^6 cellules/cm^2 afin d'être différenciés *in situ* dans la matrice. De la même façon que

les matrices ensemencées avec des CE, les substituts endothélialisés sont placés sous légère agitation pendant 24 heures afin de permettre une adhésion homogène des EPC sur toute la surface luminale, puis cultivés dans un incubateur à 37°C (5 % de CO_2 et 95 % d'air) pendant 2 semaines.

I.2.5. Stimulations mécaniques : contraintes de cisaillement

Les cellules ensemencées dans les matrices artérielles ont été soumises à un flux laminaire.

Dans le cas des cellules ensemencées sur matrices acellulaires, la contrainte de cisaillement est appliquée de façon à évaluer la rétention cellulaire en conditions de culture dynamique.

Dans le cas des matrices désendothélialisées, la contrainte de cisaillement est appliquée de façon à orienter les cellules endothéliales dans le sens du flux, de manière à les préconditionner avant implantation du substitut sur l'animal.

Nous avons exposé les matrices à un flux laminaire permettant de générer des contraintes de cisaillement de 1 Pa (10 dynes/cm2). Ces contraintes correspondent à celles appliquées par le sang à proximité des sites d'anastomose lors des pontages fémoropoplités (Ott and Ballermann, 1995). La simulation est réalisée dans une chambre d'écoulement développée au laboratoire (figure 38).

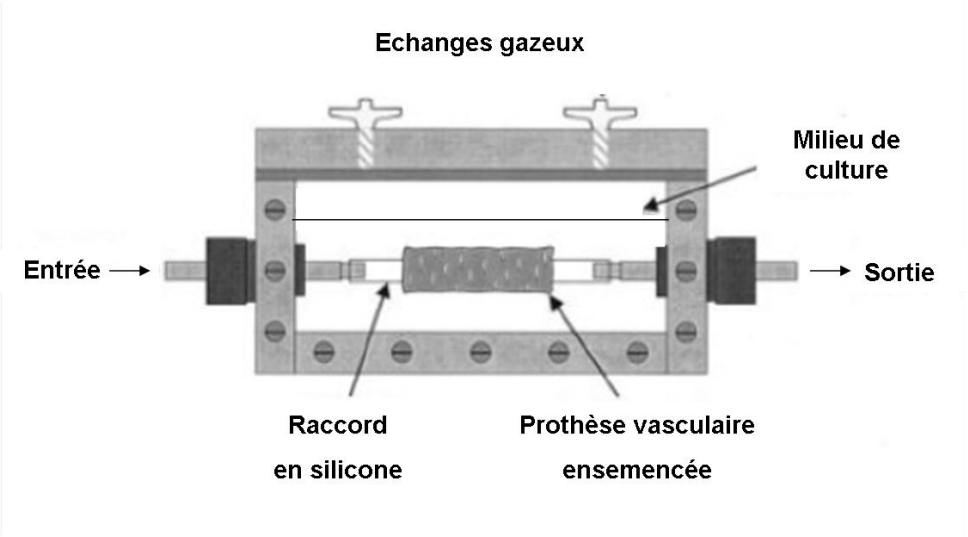


Figure 38 : **Schéma de la chambre d'écoulement.**

Cette chambre, en acier inox, est incorporée dans un circuit fermé comportant (figure 39) :

- un réservoir de milieu de culture complet ;
- une pompe péristaltique (Ismatech, Suisse) ;
- une arrivée pour les échanges gazeux ;
- des tuyaux en polypropylène (Pharmed®, Bioblock, France) ainsi que des raccords autoclavables (Bioblock, France) ;
- une chambre d'écoulement en inox.



Figure 39 : **Photographie de l'ensemble des éléments constitutifs du circuit permettant de soumettre les artères au cisaillement.**

La température du milieu circulant est maintenue à 37°C par une enceinte thermostatée.

Le débit de la pompe est contrôlé et ajusté en temps réel grâce à un logiciel (BSL pro, France) directement relié à la pompe et capable de modifier le débit instantanément.

Les contraintes de cisaillement sont calculées par l'équation suivante :

$$\tau = (4Q\mu) / (\pi r^3)$$

dans laquelle τ : contrainte de cisaillement (Pa), μ : viscosité du milieu complet $0{,}9 \times 10^{-3}$ Pa.s à 37°C, Q : débit (m^3/s), r : rayon (m).

Cette relation montre qu'il suffit de fixer le débit pour connaître avec précision les contraintes de cisaillement appliquées. Dans notre cas, nous avons procédé à un étalonnage rigoureux de la pompe péristaltique et du logiciel de contrôle.

La valeur de la contrainte de cisaillement appliquée aux cellules est augmentée progressivement de 0,1 Pa toutes les 5 min. Une contrainte de 1 Pa est ainsi obtenue 50 min après le début du cisaillement. Cette contrainte sera appliquée aux artères pendant 1h à 3h.

II. Méthodes de caractérisation et d'investigation

II.1. Caractérisation histologique et immunohistochimique

II.1.1. Histologie

II.1.1.1. Réactifs

- Fixateur : formol tamponné 10 % (Labonord, France) ;
- Alcools : éthanol 95 %, 100 % (VWR, France) ;
- Toluène (Carlo Erba, France) ;
- Paraffine (Sakura, France) ;
- Lames polysine (VWR, France) ;
- Albumine glycérinée (Labonord, France).

II.1.1.2. Fixation

Les implants prélevés sont rincés dans une solution de NaCl 0,9 %. Ils sont ensuite placés 48 heures dans du formol à 10 %.

II.1.1.3. Déshydratation et inclusion dans la paraffine

Après fixation, les artères sont placées dans des cassettes d'inclusion (Labonord, France), puis dans un automate (Leica ASP 300S, France) qui réalisera l'inclusion dans la paraffine.

Les échantillons subissent différents bains d'alcools de concentration croissante, de manière à les déshydrater progressivement :

- deux bains d'alcool à 95 % de durée suivante : 60 min et 75 min ;
- trois bains d'alcool à 100 % de 45 min, 60 min et 75 min.

Les artères sont ensuite immergées dans 3 bains de toluène (un solvant de la paraffine) de durée suivante : 45 min, 60 min et 75 min. Les pièces sont ensuite plongées dans trois bains de paraffine liquide à 56°C : un bain de 60 min et deux bains de 90 min. Les artères sont incluses en blocs à l'aide de moules sur une station d'enrobage. Ces blocs sont conservés à TA jusqu'à leur coupe.

II.1.1.4. Coupe et étalement

Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2145, France). Elles sont étalées sur une lame au moyen d'une solution aqueuse d'albumine glycérinée à 2 % (v/v). Cette étape est effectuée sur une plaque chauffée à 42°C.

II.1.1.5. Colorations histologiques

Trois colorations différentes ont été réalisées : hématoxyline-éosine-safran, Weigert ou Von Kossa.

Les coupes sont colorées selon la méthode à l'hématoxyline, éosine et safran. Il s'agit d'une coloration standard trichromique associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par l'éosine et une coloration du collagène et du tissu conjonctif par le safran. Les noyaux sont colorés en bleu, le cytoplasme en rose, les fibres de collagène en jaune safran et les fibres musculaires ainsi que les hématies en rouge vif.

Les fibres élastiques sont colorées selon la méthode de Weigert *via* une solution de résorcine et de fuchsine précipitée par le chlorure de fer III. Après coloration, les fibres élastiques apparaissent en bleu noir, les noyaux en brun, le collagène en rouge et les fibres musculaires ainsi que les hématies en jaune.

La réaction de Von Kossa met en évidence la calcification de la paroi vasculaire. La coupe est traitée par une solution de nitrate d'argent ; le cation métallique lourd se substitue au calcium et il ne reste plus qu'à réveler le sel d'argent ainsi obtenu, en le réduisant en argent métallique. Les sites contenants des sels de calcium sont recouverts d'un précipité noir intense d'argent.

II.1.1.5.1. Réactifs

- Alcool éthylique ammoniacal à 0,1 %, préparé avec de l'alcool éthylique 96 % et de l'ammoniaque 20 % (VWR, France) ;
- Hématoxyline de Harris stabilisée (Labonord, France) ;
- Eosine acétifiée : 50 µL d'acide acétique (VWR, France) dilué dans 500 mL d'érythrosine à 1 % (VWR, France) ;
- Safran du Gâtinais (F-SAFRAN, Microm, France) ;
- Fuchsine basique (Sigma, France) ;
- Acide picrique en solution saturée (Sigma, France) ;
- Chlorure de fer III (VWR, France) ;
- Résorcinol (Sigma, France) ;
- Acide chlorhydrique (VWR, France) ;
- Nitrate d'argent (VWR, France) ;
- Thiosulfate de sodium à 5 % (Sigma, France) ;
- Révélateur photo (Ilford, Allemagne) ;
- Milieu de montage : Eukitt (Labonord, France).

II.1.1.5.2. Déparaffinage

L'élimination de la paraffine est nécessaire avant toute coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains :

- un bain de toluène de 8 min permettant l'élimination de la paraffine ;
- deux bains d'alcool de titre décroissant : un bain d'alcool à 95 % pendant 8 min et un bain d'alcool à 70 % pendant 8 min.

Juste avant la coloration, les coupes sont réhydratées par un bain dans de l'eau osmosée.

II.1.1.5.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine-safran

La coloration à l'hématoxyline-éosine-safran est réalisée par un automate (Varistain

Gemini, Thermo Shandon, France).

Les coupes sont immergées 4 min dans l'hématoxyline, puis lavées 4 min à l'eau osmosée. Afin de bleuir les noyaux, les coupes sont ensuite plongées 10 secondes dans de l'alcool chlorhydrique à 0,25 % (v/v), puis de nouveau lavées à l'eau osmosée pendant 6 min. Elles sont ensuite immergées 3 min dans de l'éosine acétifiée, puis lavées 3 min à l'eau courante. Avant de colorer les coupes avec du safran (dissous dans de l'alcool absolu), il est nécessaire de les déshydrater totalement par immersion dans l'éthanol à 96 %, puis dans l'alcool absolu pendant 3 min ; les tissus sont ensuite colorés en les immergeant durant 1 min dans le safran à 1,5 % (p/v). Les coupes sont déshydratées par immersion dans 2 bains d'alcool absolu de 3 min, puis dans un bain de toluène de 3 min et enfin montées entre lame et lamelle.

II.1.1.5.4. Coloration selon la méthode de Weigert

La solution de Weigert est préparée à partir de fuchsine basique (10g) et de résorcinol (20g) dans 1 L d'eau distillée bouillante. Le colorant est ensuite précipité sous agitation avec 150 mL d'une solution de chlorure de fer III à 30 % à 100°C. Après filtration, le contenu du filtre (boue noirâtre) est redissous dans 1 L d'éthanol 95 % et 20 mL d'acide chlorhydrique, puis filtré à nouveau. Les coupes sont immergées 60 min dans la solution de Weigert. Elles sont ensuite lavées 3 secondes à l'eau osmosée, incubées 10 secondes avec de l'acide chlorhydrique à 1 % (v/v) et lavées avec de l'eau osmosée. Une contre-coloration par la méthode Van Gieson est ensuite réalisée en incubant les coupes 10 min dans du picro indigo carmin. Les coupes sont de nouveau lavées 3 secondes à l'eau distillée, puis déshydratées dans des bains d'alcool croissant de 5 min (alcool 70 %, 95 %, 100 %). Enfin, les coupes subissent un dernier bain de toluène afin d'éliminer toutes traces d'eau et d'alcool. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelle.

II.1.1.5.5. Réaction de Von Kossa

Les coupes sont incubées avec du nitrate d'argent à 5 % pendant 30 min à l'abri de la lumière, puis lavées soigneusement avec de l'eau osmosée. Elles sont ensuite mises au contact du révélateur photographique pendant 5 min, lavées avec de l'eau osmosée pendant 3 secondes, puis incubées au contact de l'hyposulfite de sodium à 5 % pendant 5 min. Après un rinçage à l'eau osmosée, les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol croissant :

- un bain d'éthanol à 70 % pendant 5 min ;
- un bain d'éthanol à 96 % pendant 8 min ;
- un bain d'éthanol à 100 % pendant 8 min.

Enfin, les coupes sont plongées quelques minutes dans un bain de toluène, puis montées entre lame et lamelle.

II.1.1.5.6. Montage et observation des lames

Une goutte de résine (Eukitt, Labonord, France) est utilisée pour monter les coupes entre lame et lamelle. La résine polymérise en une vingtaine de minutes à TA. Les lames colorées sont observées au microscope inversé (Olympus IX 50, Japon). La capture des images se fait par une caméra reliée à un logiciel d'acquisition (Leica, France).

II.1.2. Immunohistochimie

II.1.2.1. Réactifs

- PBS (Fisher-Bioblock) ;
- Tween 20 (MP Biomedical, France) ;
- EDTA (Euromedex, France) ;
- Tampon Tris-HCl 1 M à pH 8,2 (Sigma, France) ;
- Solution d'Eukitt (Labonord, France) ;
- DakoPen® (Dakocytomaton, France) ;
- N-éthylmaléide (Sigma, France) ;
- Serum-albumine-bovine (Eurobio, France) ;
- Azide de sodium 30 % (Sigma, France) ;
- Glycérol (Carlo Erba, France).

II.1.2.2. Anticorps

Les techniques immunohistochimiques permettent de localiser des antigènes dans des tissus. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer. Cet anticorps est lui-même couplé de façon directe ou indirecte à un traceur (généralement une enzyme) permettant de visualiser la réaction. Les anticorps dirigés contre les antigènes recherchés

(collagène IV) sont dilués dans une solution à base de PBS dont la composition est la suivante :

- PBS : pH 7,4 ;
- N-éthylmaléimide (0,4 mM) ;
- albumine bovine (1 % p/v) ;
- azide de sodium (1,4 mM) ;
- glycérol (244,3 mM).

Un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-souris conjugué à la biotine (Dakocytomaton, France) a été utilisé pour la révélation. La biotine se lie à la streptavidine conjuguée à la peroxydase par une liaison de haute affinité et de grande spécificité. Le système biotine-streptavidine-peroxydase est alors révélé par ajout d'un substrat spécifique de la peroxydase : le NovaRed™ (Vector Laboratories, USA).

II.1.2.3. Déparaffinage et démasquage des sites antigéniques

Les coupes sont déparaffinées dans le toluène, l'éthanol de titre décroissant, puis réhydratées dans l'eau osmosée. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé par une hydrolyse à la vapeur sous pression (Proteogenix, Retriver, France) de 5 min à 121°C dans du tampon EDTA pH 8,2. Après refroidissement, les lames sont lavées pendant 5 min avec de l'eau osmosée. Les coupes sont ensuite mises au contact avec de la collagènase diluée dans du chlorure de calcium (10 mg/100 mL de chlorure de calcium à 4 g/L) pendant 20 min, à 37°C. Les coupes sont lavées à l'eau osmosée, puis incubées dans du PBS-Tween pendant 20 min afin d'améliorer l'hydratation et la diffusion des anticorps.

II.1.2.4. Marquage et révélation

La solution d'anticorps primaire diluée au 1/70ème est déposée sur les coupes et incubée une nuit à 4°C, à l'abri de la lumière. Après rinçage dans du PBS-Tween, la solution d'anticorps secondaire biotinylée diluée au 1/200ème est déposée sur les coupes, puis incubée 1h à TA et à l'abri de la lumière. Après rinçage dans du PBS-Tween, les peroxydases endogènes sont inhibées par de l'eau oxygénée à 6 % (v/v) pendant 20 min, à TA. Après rinçage dans du PBS-Tween, la streptavidine marquée à la peroxydase est incubée avec les coupes pendant 20 min, à TA et à l'abri de la lumière. L'activité peroxydasique est révélée

par la technique du NovaRED™ en incubant les coupes 5 min à TA. Après lavage à l'eau osmosée, les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline diluée au ½, pendant 1 min, puis soigneusement rincées à l'eau osmosée. Les lames sont enfin passées 6 secondes dans du tampon Tris-HCl à pH 8,2, puis rincées à l'eau osmosée. Après déshydratation, les lames sont montées avec de la résine (Eukitt), puis observées au microscope optique.

II.2. Caractérisation par microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser ou CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*) permet de visualiser en trois dimensions des tissus vivants marqués par des molécules fluorescentes.

II.2.1. Description de l'appareillage

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky en 1957 (figure 40). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis : le point focal de l'échantillon, à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage appelé *pinhole* (« trou d'aiguille ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (figure 41). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur pour constituer l'image. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le *pinhole* est disposé au niveau du plan image de l'objectif. L'ouverture du diaphragme conditionne en grande partie la qualité optique de l'image (élimination de la lumière parasite).

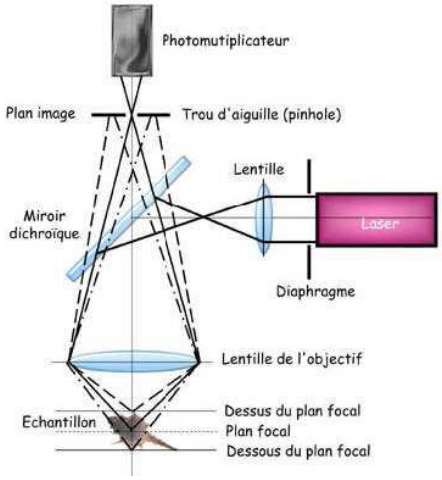


Figure 40 : **Principe d'un microscope confocal à balayage laser.**

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en z), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions (figure 41).

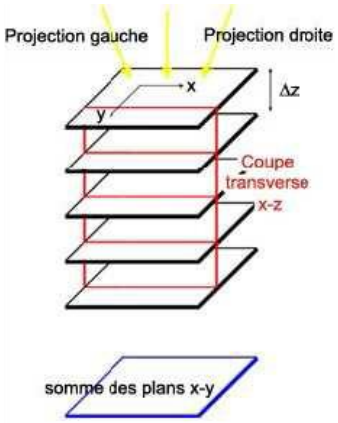


Figure 41 : **Principe de reconstitution d'images en 3 dimensions.**

Une image numérique (x,y) est réalisée à différentes hauteurs en z avec un pas de déplacement constant z et l'image en 3 D est reconstituée par la somme de ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux (x,z) et (y,z).

II.2.2. Visualisation du film multicouche de polyélectrolytes

Afin de visualiser le film MPE dans la lumière des artères, le PAH utilisé pour déposer la dernière couche de polycation a été couplé à un fluorochrome : la rhodamine.

II.2.2.1. Réactifs

- Chlorhydrate de polyallyamine couplé à la rhodamine (la synthèse et le couplage ont été effectués à Strasbourg, INSERM U 595).

II.2.2.2. Protocole

La solution de PAH-rhodamine est injectée dans la lumière de l'artère et incubée 10 min à l'abri de la lumière. Trois lavages successifs au Tris-NaCl sont ensuite effectués. Puis l'artère est fixée dans du paraformaldéhyde (PAH) à 1 % et maintenue à 4°C jusqu'à observation microscopique. La longueur d'onde d'excitation de la rhodamine est de 594 nm.

II.2.3. Visualisation du noyau

II.2.3.1. Réactifs

- Syto 16® (Molecular Probes, France) ;
- RPMI 1640 sans rouge de phénol (Sigma, France) ;
- Paraformaldéhyde (PAF, Sigma, France) : 1% (p/v) dans de l'eau physiologique : fixation.

II.2.3.2. Protocole

Le noyau des cellules a été visualisé à l'aide d'un marqueur permanent des acides nucléiques : le Syto 16®. Ce marqueur est capable de traverser les membranes des cellules vivantes. Des anneaux artériels ont ainsi été incubés 30 min avec 400 µL de Syto 16® dilué au 1/100ème dans du RPMI 1640. Après 3 rinçages de 5 min au RPMI 1640, les anneaux sont fixés avec du PAF à 1 %, puis conservés à 4°C jusqu'à observation des échantillons.

II.2.4. Visualisation du phénotype cellulaire par immunocytologie

II.2.4.1. Principe

La visualisation des marqueurs endothéliaux et musculaires est effectuée par une réaction d'immunofluorescence. Deux types d'immunomarquage peuvent être réalisés : direct ou indirect.

Dans l'immunomarquage direct, la molécule d'intérêt (récepteurs membranaires ou composés intracellulaires) est reconnue spécifiquement par un anticorps couplé directement à un fluorochrome (figure 42).

Dans l'immunomarquage indirect, la molécule d'intérêt est reconnue spécifiquement par un anticorps primaire. Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps ou anticorps secondaire est utilisé. Ce dernier est couplé à un fluorochrome dirigé spécifiquement contre le fragment commun de l'anticorps primaire (figure 42).

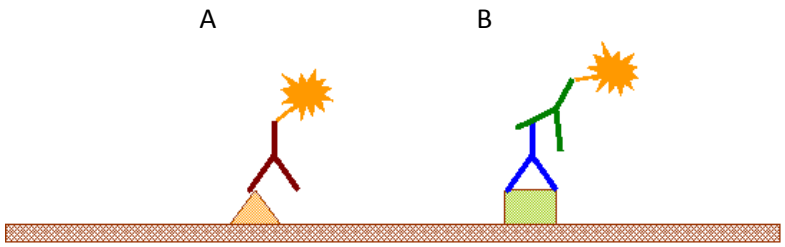


Figure 42 : **Principe de l'immunomarquage direct (A) et indirect (B).**

II.2.4.2. Réactifs

– Sérumalbumine bovine (BSA, Sigma, France) utilisée à 0,5 % (p/v) dans RPMI 1640 sans rouge de phénol (Sigma, France) ;
– RPMI 1640 sans rouge de phénol (Sigma, France) ;
– Paraformaldéhyde (PAF, Sigma, France) : 1% (p/v) dans de l'eau physiologique : fixation ;
– Triton-X100 (Sigma, France) : 0,5% et 0,1% (p/v) dans de l'eau distillée : perméabilisation.

II.2.4.3. Les anticorps

Nous avons utilisé des anticorps qui permettent de visualiser des récepteurs membranaires (CD31) et des constituants intracellulaires (vWF, α-actine et SM-MHC) par immunomarquages indirects. Les tableaux VI et VII résument les caractéristiques de ces anticorps. Le suivi du phénotype endothélial a été réalisé à travers l'expression de marqueurs spécifiques CD31 et vWF ; le phénotype du muscle lisse, quant à lui, est déterminé par l'expression de marqueurs fortement exprimés par les cellules musculaires différenciées : α-

actine et SM-MHC.

Tableau VI **: Liste des anticorps primaires.**

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Fournisseur
PECAM-1	Humain	Souris IgG1	JC70A	Dako, France
FacteurVon Willebrand (vWF)	Humain	Souris IgG1	F8/86	Dako, France
α- Smooth Muscle actine (α-SMA)	Humain	Souris IgG1	1A4	Dako, France
Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC)	Humain	Souris IgG1	SMMS-1	Dako, France

Tableau VII : **Caractéristiques de l'anticorps secondaire.**

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur
Alexa Fluor 488	Souris	Brebis	Molecular Probes, USA

II.2.4.4. Immunomarquage des récepteurs membranaires

Les anneaux d'artères sont lavés avec du RPMI 1640, puis sont incubés pendant 30 min à 37°C avec 400 µL d'anticorps primaire dilué au 1/50ème dans du RPMI 1640 supplémenté avec 0,5 % de BSA. Les anneaux sont ensuite lavées 3 fois avec 500 µL de RPMI 1640, puis incubés, de nouveau, pendant 30 min à 37°C, à l'abri de la lumière avec 400 µL d'anticorps secondaire dilué 1/100ème dans du RPMI 1640 supplémenté avec 0,5 % de

BSA. Après 3 lavages avec 500 µL de RPMI 1640, les artères sont fixées avec 500 µL de PAF 1 %, puis conservées à 4°C et à l'obscurité jusqu'à observation microscopique.

II.2.4.5. Immunomarquage intracellulaire

Pour un marquage intracellulaire, les fragments d'artères sont fixés avec du PAF 1 % pendant 10 min à TA, puis lavés avec du RPMI 1640. Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide d'une solution de Triton 0,5 % pendant 15 min à TA, puis incubées avec l'anticorps primaire dilué au 1/50ème dans du Triton 0,1 % supplémenté avec 0,5 % de BSA. Le protocole de marquage est identique au protocole précédent.

II.2.5. Suivi des cellules à long terme

Afin de visualiser la persistance des cellules ensemencées dans la lumière des substituts greffés chez le lapin, les CE sont marquées préalablement à la PKH-26, une molécule hydrophobe qui s'insère dans la bicouche lipidique des membranes. Le marqueur lipophile PKH-26 se lie de manière irréversible aux membranes cellulaires et la liaison reste stable jusqu'à 3 mois.

Dans notre étude, PKH-26 est utilisé pour évaluer par microscopie de fluorescence l'intégration et la survie des CE ensemencées dans la lumière du substitut, et ainsi discriminer les CE transplantées des cellules de l'hôte (ici le lapin).

La PKH-26 se détecte en microscopie confocale à balayage laser. Sa longueur d'onde d'excitation est de 551 nm.

II.2.5.1. Réactifs

- PKH-26 *red fluorescent cell linker* kit (Sigma, France) ;
- Trypsine 0,25 g/L (Sigma, France) ;
- Milieu de culture EGM-2 (Lonza, France) ;
- PBS ;
- SVF décomplémenté (Gibco, France) ;
- Bleu trypan (Sigma, France).

II.2.5.2. Marquage à la PKH-26

Les différentes étapes du marquage des cellules à la PKH-26 sont résumées dans la figure 43.

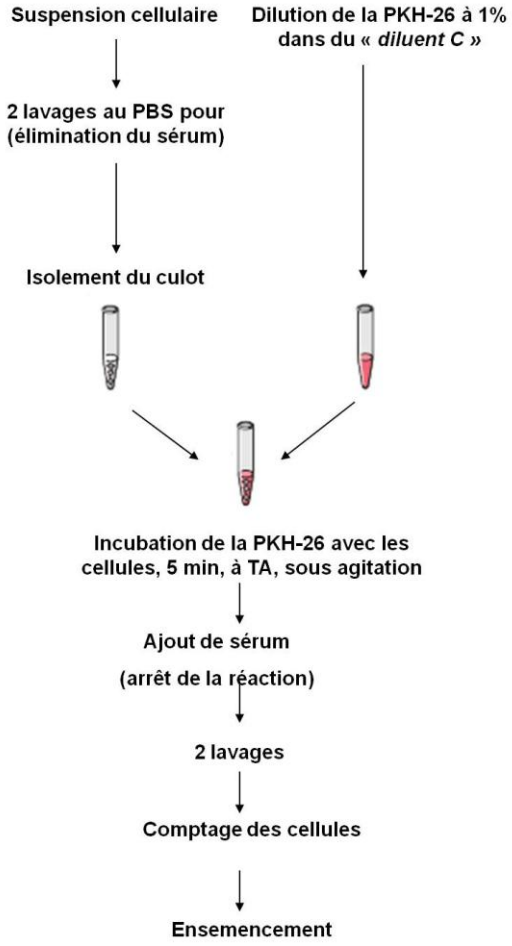


Figure 43 : **Protocole de marquage des HUVEC avec la PKH-26**.

Après passage des CE, les cellules sont lavées 2 fois dans du PBS afin d'éliminer toute trace de SVF : le culot cellulaire est ainsi resuspendu dans 20 mL de PBS et centrifugé à 400 g pendant 10 min. Un comptage cellulaire est effectué, le surnageant est éliminé, puis le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de PKH-26 diluée à 1 % et dont le volume est fonction du nombre de cellules à marquer : 100 µL de PKH diluée à 1% pour 2 millions de cellules. Après 5 min d'incubation sous agitation et à l'obscurité, la réaction de marquage est stoppée par ajout d'1 mL de SVF. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du milieu EGM-2, puis centrifugées à 400 g pendant 5 min avant d'être ensemencées dans les artères.

II.3. Caractérisation par biologie moléculaire : qPCR

L'adhésion des CE (sur les substituts artériels recouverts de film) ainsi que leur fonctionnement physiologique sont évalués à l'aide de 2 techniques basées sur l'extraction et le dosage des acides nucléiques. L'ARN extrait est quantifié et son expression est examinée par qPCR. Deux gènes ont été sélectionnés : eNOS pour estimer l'implication vasomotrice des CE, et E-sélectine pour renseigner sur l'inflammation.

La quantité de CE ayant adhéré à la matrice est quantifiée par dosage des ARN totaux, tandis que l'expression des 2 gènes est quantifiée par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR).

La qPCR se réalise en 4 étapes : - extraction des ARN totaux ;
- quantification des ARNm ;
- rétrotranscription ;
- qPCR.

II.3.1. Extraction des ARN totaux

II.3.1.1. Réactifs

- Trizol® (Sigma, France) ;
- PBS ;
- Chloroforme (Sigma, France) ;
- Eau DEPC (Sigma, Frane) ;
- RNeasy minikit (Qiagen, France) ;
- RNAse DNase free set (Qiagen, France).

II.3.1.2. Protocole d'extraction

Après ensemencement et culture des matrices acellularisées, les artères sont lavées deux fois au PBS froid. L'artère est ensuite finement hachée, puis les cellules sont lysées à l'aide de 5 mL de Trizol® et incubées 5 min à TA. La suspension cellulaire est placée dans un microtube, homogénéisée à la seringue et centrifugée à 4°C pendant 10 min à 12 000 *g* (pour séparer les grosses protéines de la suspension cellulaire) ou bien conservée à -80°C.

Afin de séparer les différents acides nucléiques des protéines, 0,2 mL de chloroforme sont ajoutés au surnageant récupéré lors de l'étape précédente (Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski and Sacchi, 2006). L'ensemble est homogénéisé avec un agitateur type « Vortex » pendant 15 s, puis après un repos de 3 à 5 min, le tube est centrifugé à 4°C pendant 15 min à 12 000 *g*. La phase supérieure, riche en ARN, est transférée dans un nouveau microtube (figure 44).

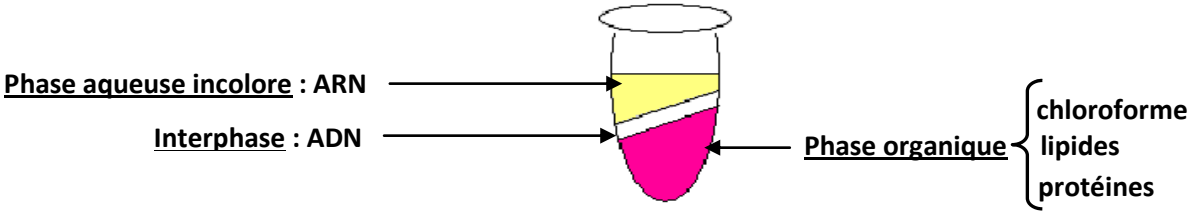


Figure 44 : **Schéma d'un microtube après séparation sur phénol-chloroforme.**
(Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski and Sacchi, 2006).

Un volume équivalent d'éthanol à 70 % (v/v dans de l'eau DEPC) est ajouté afin de laver les ARN totaux. Après agitation, le mélange est déposé en plusieurs fois sur une colonne (kit d'extraction RNeasy minikit, Qiagen, France) qui sera placée dans un tube collecteur propre et centrifugée à 4°C pendant 15 s à 10 000 *g*. Cette étape permet de fixer les ARN totaux à la résine contenue dans la colonne afin de les purifier.

A ce stade, il est possible que notre échantillon soit contaminé par une petite quantité d'ADN. Il faut alors procéder à une digestion à la DNase I (RNase-free DNase set, Qiagen, France). La colonne (contenant l'échantillon) est conditionnée avec 350 µL de tampon RWI (Kit RNeasy) pendant 2 min à TA, puis centrifugée à 4°C pendant 15 s à 10 000 *g*. La DNase I est diluée au 1/8ème dans son tampon pour un volume final de 80 µL. Cette solution est incubée 15 min à TA au contact de la colonne. L'enzyme est ensuite éluée avec 350 µL de tampon RWI et centrifugée à 4°C pendant 15 s à 10 000 *g*. Finalement, la colonne est lavée deux fois avec 500 µL de tampon RPE (Kit RNeasy). Le premier lavage est suivi d'une centrifugation à 4°C pendant 15 s à 10 000 *g*, la 2ème centrifugation dure 2 min pour bien sécher la colonne. La colonne est transférée dans un tube neuf et les ARN totaux sont élués par ajout de 30 µL d'eau RNase free (kit RNeasy) et centrifugation à 4°C pendant 1 min à 10 000 *g*. Les ARN totaux ainsi extraits sont placés 10 min à 56°C.

II.3.2. Quantification des ARN

Les ARN totaux extraits sont dilués au 1/50ème dans du Tris-HCl-EDTA pH 8, puis quantifiés par lecture de l'absorbance à 260 nm (Biophotomètre, Bio-Rad, France).

La concentration en ARN est calculée grâce à la formule :

Concentration d'ARN (µg/µL)= 40 x DO_{260} x facteur de dilution x 1000

II.3.3. Intégrité des ARN

L'intégrité des ARN extraits est vérifiée sur gel d'agarose 0,8 % contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. Un volume de 9 µL contenant 500 ng d'ARN et 6 µL de tampon de charge migre pendant 30 min à 80 V. Le gel (figure 45) est ensuite révélé par une lampe UV.

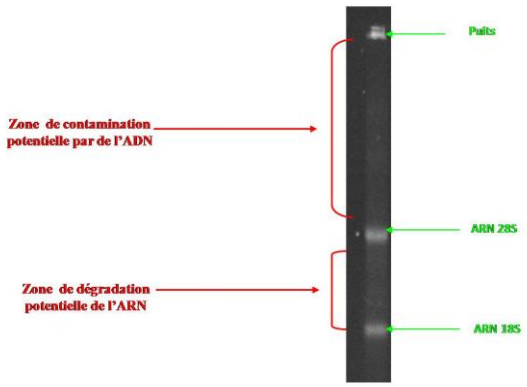


Figure 45 : **Révélation de la présence et de l'intégrité des ARN totaux par migration des échantillons sur gel d'agarose 0,8 %. Les flèches indiquent la position des ARN ribosomiaux**.

Le gel met en évidence la présence d'ARN 28S et 18S (les plus abondants dans la cellule) pour tous les échantillons. Aucune bande supplémentaire n'est visualisable, preuve que les ARN totaux extraits sont de bonne qualité.

II.3.4. Rétrotranscription des ARN

Les ARNm extraits sont d'abord transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide

du kit *iScriptTM cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, France) contenant une reverse transcriptase (tableau VIII).

Tableau VIII : **Réactifs et quantités utilisés pour la rétro-transcription.**

Réactifs	Quantités	Rôle
ARN totaux extraits	1 µg	Matrice
5X transcript reaction Mix [oligo(dT) et dNTP Mix]	4 µL	Amorces et élongation
iScript™ Reverse Transcriptase	1 µL	Transcriptase inverse
Nuclease free water	Qsp 20 µL	Volume réactionnel

Le mélange de chacun de ces composants est incubé selon le programme décrit dans le tableau IX.

Tableau IX : **Détails des températures utilisées pour rétro-transcrire l'ARNm en ADNc.**

Programme de rétro-transcription
25°C, 5 min : hybridation des amorces ↓ 42°C, 30 min : transcription ↓ 85°C, 5 min : inactivation de la transcriptase inverse

II.3.5. qPCR

II.3.5.1. Principe

Après rétro-transcription des ARN, les ADNc sont amplifiés par qPCR (ou PCR en temps réel) en utilisant le SYBR® Green comme fluorophore.

Le SYBR® Green est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques. Il permet de quantifier les acides

nucléiques en solution pendant la PCR en temps réel car il n'interfère pas lors de la réaction.

En effet, le SYBR® Green est un intercalant de l'ADN qui ne se lie qu'aux ADN double brins. Il permet de quantifier la synthèse d'ADN double brin pendant la PCR. L'utilisation de cette sonde est combinée à l'utilisation de l'appareil *My IQ* (Bio-Rad, France). Les échantillons sont quantifiés en fonction de l'expression d'un gène ubiquitaire : RPS 29, codant pour une protéine ribosomale de la petite sous-unité (40S) des ribosomes. Ce gène a été choisi car il n'intervient pas dans les phénomènes étudiés (inflammation et vasomotion).

II.3.5.2. Choix des amorces

Les amorces de E-sélectine et eNOS ont été choisies suivant une démarche précise (tableau X).

Tableau X : **Détails des séquences des amorces utilisées pour la qPCR.**

Amorces		Références	Séquences
RPS 29	**Sens**	Recherche des séquences des gènes : www.ensembl.org/index.htm Détermination des séquences des amorces : (Primer 3 Output®) http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi Alignement des séquences : http://xylan.igh.cnres.fr/bin/align-guess.cgi	- AGA CAC GAC AAG AGC GAG AA -
	anti-sens		- AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTG TAC TG -
eNOS	**Sens**		- GAT GCT CCC AAC TTG ACC TTG ACC AT -
	anti-sens		- TAG GTC TTG GGG TTG TCA GG -
E-sélectine	**Sens**		- AGC TTC CCA TGG AAC ACA AC -
	anti-sens		- CTG GGC TCC CAT TAG TTC AA -

Le site www.ensembl.org/index.html a été utilisé pour rechercher les séquences des gènes d'intérêt.

Puis les séquences des amorces sont déterminées à l'aide du site *primer 3 output* http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Les amorces doivent faire une vingtaine de paires de bases (pb) et s'hybrider sur deux exons différents afin de pouvoir mettre en évidence d'éventuelles contaminations des échantillons par de l'ADN génomique. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb. Les amorces ne doivent pas s'hybrider sur plusieurs *single nucleotide polymorphisme* (SNP).

Finalement, les amorces sont alignées sur les séquences de gènes de la même famille. En effet, des gènes de la même famille possèdent des domaines conservés, et nous devons nous assurer d'amplifier le bon gène. L'alignement des séquences est effectué à l'aide du site http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi.

II.3.5.3. Réactifs

- SYBR® Green Mix (Biorad, France) ;
- Primer sens ;
- Primer anti-sens ;
- Eau distillée filtrée autoclavée (eau DFA).

II.3.5.4. Protocole de qPCR

Pour chaque gène étudié, les différents constituants sont mélangés dans les proportions indiquées dans le tableau XI, avant d'être placés dans un Thermocycler.

Tableau XI : **Proportions des différents réactifs utilisés pour la qPCR.**

Réactifs	Quantités	Rôle
ADNc	5 µL dilué au 1/50 dans de l'eau DFA	Matrice
SYBR® Green Mix [ADN polymerase, dNTP Mix, Syber Green]	12,5 µL	Polymérisation, élongation, fluorescence
Primer sens	0,75µL à 10 pmol/µL	Amorce
Primer anti-sens	0,75µL à 10 pmol/µL	Amorce
eau distillée filtrée autoclavée	6 µL	Volume réactionnel

Le Thermocycler est un appareil permettant de faire varier la température et ainsi d'amorcer les réactions de polymérisation/dépolymérisation nécessaires à la polymérisation en chaîne. Le programme de température utilisé est décrit dans le tableau XII.

Tableau XII : **Détails des températures employées pour amplifier l'ADNc.**

Programme de qPCR
95°C, 3 min : dénaturation ↓ 95°C, 10 s : dénaturation ↓ 60°C, 1 min : hydridation et élongation **50 cycles** ↓ 95°C, 1 min : inactivation de l'enzyme ↓ 55 à 95°C (augmentation de 0,5°C toutes les minutes) melting curve **80 cycles** ↓ 55°C, 10 s: *melting curve*

III. Evaluation *in vivo* du substitut : suivi post-implantation

III.1. Cadre éthique de l'expérimentation animale

Toutes les expérimentations effectuées ont été réalisées sur le lapin en respectant les règles éthiques en vigueur en Europe (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, liées à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). L'origine des animaux est parfaitement contrôlée et ils sont hébergés dans une animalerie agréée par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche sous couvert de la Direction départementale des services vétérinaires. Les lapins proviennent de CEGAV (France) et sont hébergés à l'animalerie centrale de la Faculté de médecine, Nancy-Université. Toutes les précautions nécessaires ont été prises pour éviter la souffrance de l'animal lors des expérimentations.

III.2. Choix du modèle animal

Le modèle animal choisi est le lapin blanc mâle de Nouvelle-Zélande (*Oryctolagus cuniculus*) pesant 3 ± 0,5 kg. Il a été retenu pour notre étude en raison du diamètre de sa carotide qui est similaire à celui des artères coronaires humaines (Ma et al., 2008).

III.3. Anesthésie de l'animal

L'induction de l'anesthésie est réalisée *via* la veine marginale externe de l'oreille et au moyen d'un cathéter intraveineux (nécessaire épicrânien, Salva, Cooper, France), par l'injection lente d'une dose de 10 mg/kg de pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, France). L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée avant le début de tout acte chirurgical par pincement interdigital de la patte arrière du lapin. L'anesthésie est entretenue par injection intraveineuse itérative de pentobarbital.

III.4. Réactifs

- *Anesthésiques :* deux types d'anesthésiques sont utilisés :
  - ➔Anesthésie générale : Pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, France) ;
  - ➔Anesthésie locale : Xylocaïne (Astra Zenaca, France) ;
- *Anticoagulant :* héparinate de sodium 5000 UI / mL (Sanofi Synthelabo, France) ;
- Sérum physiologique (NaCl 0,9 % Cooper, Rhône-Poulenc, France) ;

- *Antiseptique :* polyvidone iodée (Bétadine dermique 10 %™ Laboratoire Sarget, France) ;
- Fils chirurgicaux monofilaments non résorbables en polyamide 8/0, double aiguille spatulée de courbure 3/8 et de longueur 6,4 mm (Péters Surgical, France) ;
- Fils chirurgicaux monofilaments résorbables en polydioxanone 2/0 et 4/0, mono-aiguille triangulaire de courbure 3/8 et de longueur 19 mm (Péters Surgical, France) ;
- Micropinces chirurgicales, porte-aiguille, microclamps vasculaires, microciseaux (Landanger Chirurgie, France).

III.5. Technique du pontage termino-latéral

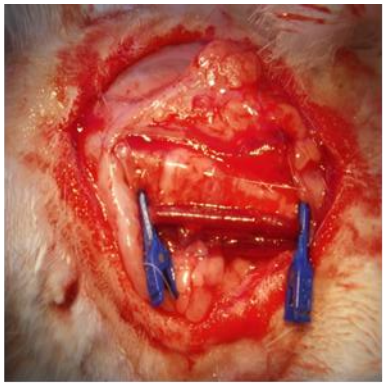
Les différentes étapes pour réaliser le pontage sont rapportées dans la figure 46.



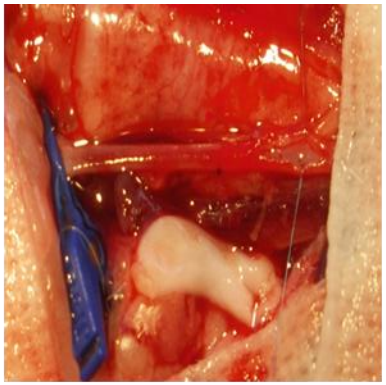
2 - Anesthésie par la veine marginale de l'oreille



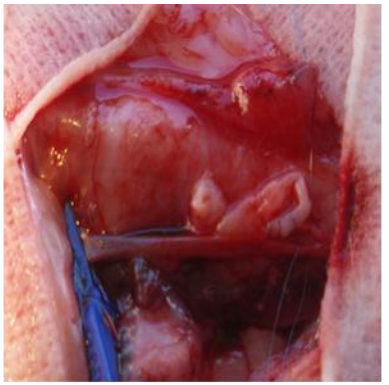
3 - Rasage
- Application de Xylocaïne



4 - Isolement de la carotide

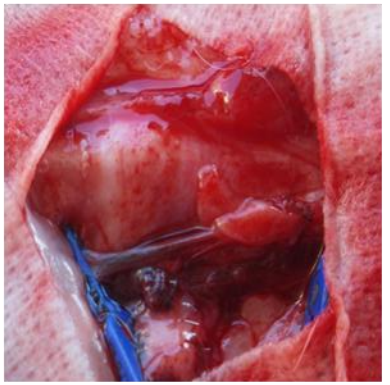


5- Artériotomie proximale et palette anastomotique



6 - Points de surjet en tension

e des différentes étapes dans le pontage vasculaire.

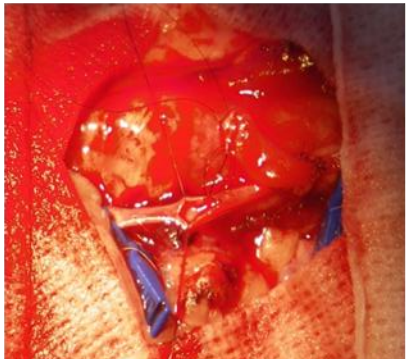


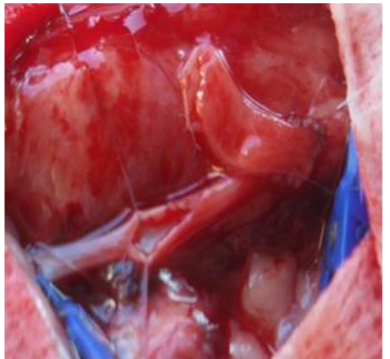
7 - Pontage proximal achevé
- Lavage et purge











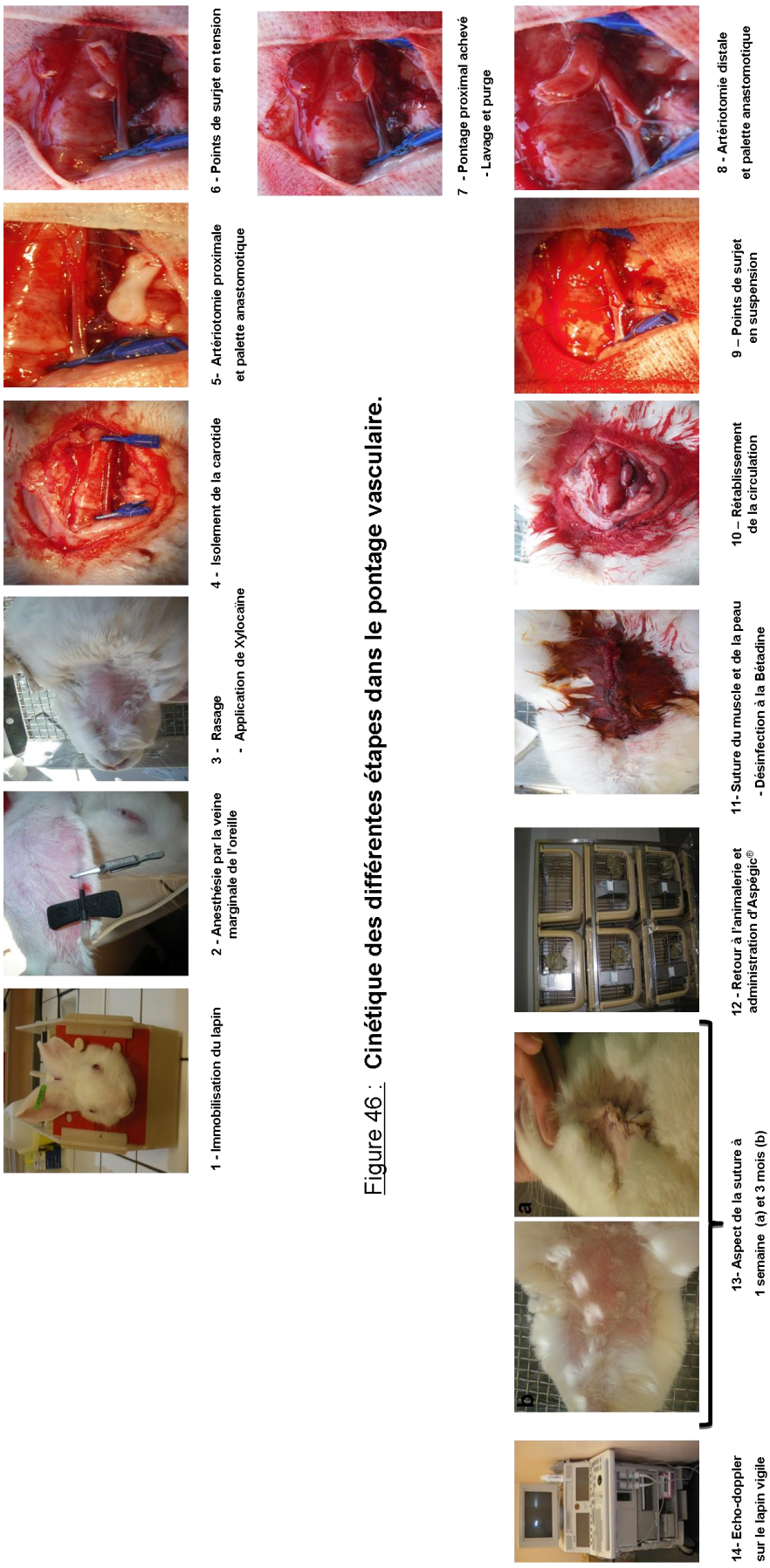


Figure 46 : **Cinétique des différentes étapes dans le pontage vasculaire.**

L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal sous une lampe chauffante permettant de maintenir la température corporelle constante. Les zones d'intervention chirurgicales sont rasées, puis désinfectées à la polyvidone iodée.

Après application de xylocaïne, une incision d'environ 6 cm est pratiquée au niveau du cou, le long de la trachée. Les tissus sont écartés et la carotide est dégagée.

Afin de prévenir la coagulation du sang, 1500 UI d'héparinate de sodium sont administrés au lapin par la veine marginale de son oreille juste avant la mise en place des clamps vasculaires aux niveaux proximal et distal.

Après avoir clampé la carotide, une artériotomie proximale est pratiquée à une distance d'environ 1 cm du clamp (figure 47).



Figure 47 : **Photographie montrant une incision en vue de réaliser une artériotomie.**

www.carotide.com

Le greffon vasculaire est ensuite préparé : il est incisé en biseau à son extrémité, ce qui permet de réaliser une palette anastomotique de taille comparable à l'artériotomie (figure 48).

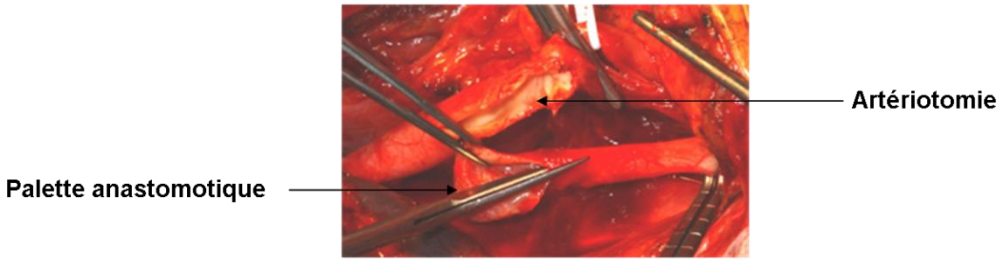


Figure 48 : **Photographie montrant une artériotomie et une palette anastomotique.**

www.carotide.com

La suture de l'artère sur la carotide est d'abord réalisée par un surjet en suspension à l'aide d'un fil de suture 8/0 (technique dite « du parachute »), puis, après quelques points, le

surjet est mis en tension. Le point de surjet permet d'obtenir une couture apparente, propre et solide, pour unir bord à bord les 2 vaisseaux (figure 49).



Figure 49 : **Photographies représentant quelques points de surjet.**

www.carotide.com

Après fixation de la première extrémité du greffon sur la carotide, les lumières sont lavées au sérum physiologique : ce sont les manœuvres de purge (figure 50).

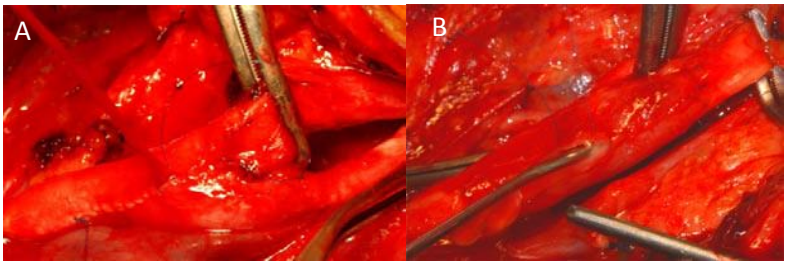


Figure 50 : **Photographies montrant la purge (A) et le lavage au sérum physiologique (B).**

www.carotide.com

L'anastomose distale est effectuée de la même façon que l'anastomose proximale. Une fois le greffon mis en place, l'artère carotide est ligaturée et la circulation sanguine dans le greffon est vérifiée (figure 51).

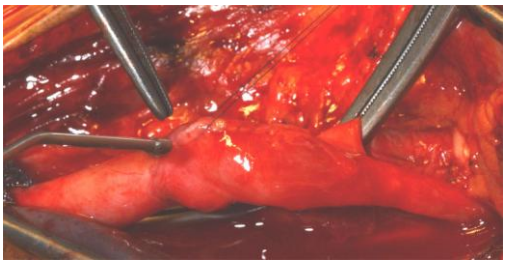


Figure 51 : **Photographie montrant la fin d'une anastomose distale.**

www.carotide.com

La plaie est ensuite désinfectée avec de la Bétadine dermique, puis les muscles et la peau sont suturés avec du fil chirurgical résorbable de tailles respectives 4/0 et 2/0.

Après réveil, l'animal est remis à l'animalerie et un antalgique (Aspégic 500®, Sanofi Aventis, France) est dissous dans l'eau de boisson à une concentration de 0,5 mg/mL afin de minimiser la douleur post-opératoire.

III.6. Echotracking vasculaire

La perméabilité des substituts artériels implantés sur les lapins est suivie par une technique non invasive : l'échographie-Doppler (Sonos 7500 Philips) (figure 52).



Figure 52 : **Photographies montrant l'échographe-Doppler (Sonos 7500) Philips utilisé pour vérifier la perméabilité des substituts (A) et la contention du lapin avant et pendant l'échographie (B).** *Le lapin vigile est maintenu immobile sur le dos. Son cou est en extension afin de faciliter l'accès de la sonde à la zone d'intervention.*

L'échographe-Doppler est constitué d'un échographe classique couplé à une sonde Doppler. Lorsqu'un faisceau d'ultrasons traverse les vaisseaux, l'écho renvoyé par les éléments figurés du sang (qui deviennent des émetteurs) a une longueur d'onde plus grande (son plus grave) si ces éléments s'éloignent du capteur et une longueur d'onde plus faible (son plus aigu) s'ils se dirigent vers le capteur. La sonde Doppler recueille donc un écho dont la fréquence (longueur d'onde) est différente de la fréquence d'émission, ce qui permet de préciser le sens et la vitesse du flux sanguin.

Les échographes-Doppler permettent un codage couleur des flux sanguins. Par

convention, les flux qui s'approchent de la sonde sont codés en rouge, et ceux qui s'en éloignent sont codés en bleu.

L'échographie-Doppler artérielle permet de mettre en évidence l'épaisseur des parois artérielles et leur évolution, la réduction de calibre, ainsi que le débit sanguin au niveau du vaisseau.

Dans notre étude, une échographie-Doppler a été effectuée régulièrement. Les lapins sont maintenus éveillés tout au long des mesures (figure 52). Après rasage des poils au niveau du cou, du gel pour ultrasons (Nicomgel, France) est appliqué sur la peau et à l'aide d'une sonde (3,5 Hz, Philips, France), la perméabilité a été contrôlée. La vitesse du sang et l'évolution du diamètre du substitut ont aussi été vérifiées pendant 12 semaines. La carotide native sert de contrôle.

III.7. Prélèvement des substituts

Après 2 et 12 semaines d'implantation, les greffons et les carotides témoins sont prélevés sur l'animal anesthésié, rincés avec de l'eau physiologique héparinée, et préparés pour les examens macroscopiques et microscopiques.

III.8. Euthanasie des lapins

Les animaux sont euthanasiés par injection d'une dose létale de pentobarbital sodique, conformément aux recommandations publiées par la Commission européenne (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, lié à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). La mort de l'animal est constatée après arrêts respiratoire et cardiaque. Le cadavre est conservé à -20°C jusqu'à incinération.

IV. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type. Une analyse de la variance a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test ANOVA (Statview IV®, Abacus

Concepts Inc., Berkley, CA, USA).

Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05 % ont été considérées comme significatives (* $p< 0,05$, ** $p< 0,01$, *** $p< 0,005$).

Résultats

et

Discussion

L'élaboration d'un nouveau substitut vasculaire de petit calibre a été permise grâce à la combinaison ordonnée de trois éléments : une artère ombilicale, un film multicouche de polyélectrolytes et des cellules endothéliales. La mise en œuvre de ce substitut a nécessité optimisation et perfectionnement du concept initialement imaginé. Plusieurs étapes ont été nécessaires pour valider notre substitut vasculaire. Chacune d'entre elles constituera une partie du chapitre « résultats et discussion ».

Le tableau XIII résume les différentes étapes de notre travail et précise la méthodologie adoptée.

Tableau XIII : **Axes de travail développés et méthodologie associée.**

	Objectifs / Evaluation	**Vaisseau**	**Traitement de la matrice**	**Film MPE**	**Endothélium**	**Caractérisation**
Etape 1	- Persistance cellulaire endothéliale en présence de film MPE après cisaillement - Biofonctionnalité du film MPE	Artère ombilicale	Acellulaire (dépourvue de toutes cellules)	$(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$	Cellules endothéliales matures	Dosage ARN qPCR
Etape 2	- Etude de faisabilité *in vitro* et *in vivo* sur un substitut de référence	Veine saphène	-	$(PAH\text{-}PSS)_3$	-	Histologie Echo-Doppler
Etape 3	- Expertise *in vivo* des substituts endothélialisés par des CE matures	Artère ombilicale	Désendothélialisée (dépourvue de CE)	$(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$	Cellule endothéliales matures	Echo-Doppler Microscopie confocale Histologie
Etape 4	- Expertise *in vitro* et *in vivo* des substituts endothélialisés par des EPC	Artère ombilicale	Désendothélialisée (dépourvue de CE)	$(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$	Cellules progénitrices endothéliales	Echo-Doppler Microscopie confocale Histologie

Dans une première étape, l'impact des films MPE sur les CE a été étudié et la capacité de persistance cellulaire sur le film MPE a été évaluée après culture sous contraintes de cisaillement.

La seconde étape constituera une étude de faisabilité et permettra de valider notre modèle d'étude sur un produit de substitution vasculaire de référence, qu'est la veine saphène, fonctionnalisé par un film MPE.

La troisième étape sera consacrée à l'évaluation *in vivo* du substitut vasculaire artériel fonctionnalisé et endothélialisé par des cellules endothéliales matures.

Enfin, dans la quatrième étape, nous cellulariserons notre substitut vasculaire fonctionnalisé par des cellules progénitrices endothéliales issues de sang périphérique de lapin.

I. Fonctionnalité cellulaire et impact du cisaillement sur une matrice vasculaire naturelle fonctionnalisée et endothélialisée

Après extraction et stockage, les artères ont été acellularisées. La matrice obtenue a été fonctionnalisée par un film MPE et ensemencée avec des cellules endothéliales issues de veine ombilicale humaine (HUVEC). La biofonctionnalité et la capacité de persistance des cellules sur le film MPE au cours du cisaillement ont été évaluées.

I.1. Résultats expérimentaux

I.1.1. Elaboration d'une matrice acellulaire

• *Vérification de l'acellularisation de la matrice par microscopie confocale à balayage laser*

La microscopie confocale permet de vérifier la destruction des cellules après traitement de l'artère ombilicale par le SDS et les nucléases. L'absence de noyaux a d'abord été recherchée avant d'analyser plus finement l'état cellulaire des 2 tuniques (intima et média) renfermant les cellules vasculaires, respectivement CE et CML.

Pour cela, les noyaux ont été marqués au Syto16®. Les CE ont été mises en évidence par marquage du CD 31 et du vWF, et les CML par immunomarquage de la myosine et de l'α-actine.

La figure 53 présente les résultats obtenus avant et après traitement de l'artère

ombilicale. Les résultats afférents aux artères ombilicales acellularisées ont été comparés à ceux obtenus pour des artères ombilicales fraîchement isolées, qui constituent le témoin. Sur l'artère témoin, les cellules vasculaires, composant l'intima et la média, sont clairement visibles. Le marquage des noyaux au Syto 16® montre à la fois des structures arrondies et des structures fusiformes plus allongées. Elles correspondent respectivement aux noyaux des CE de l'intima et aux noyaux des CML de la média. L'immunomarquage confirme effectivement la présence de cellules, ainsi que le phénotype endothélial et musculaire des cellules présentes dans l'artère ombilicale fraîche.

L'artère traitée, quant à elle, ne montre aucun immunomarquage en microscopie confocale à balayage laser : ni marquage nucléaire, ni marquage endothélial ou musculaire, que ce soit en coupe transversale ou luminale. Elle est donc complétement acellularisée et semble débarrassée de tous ses composants cellulaires.

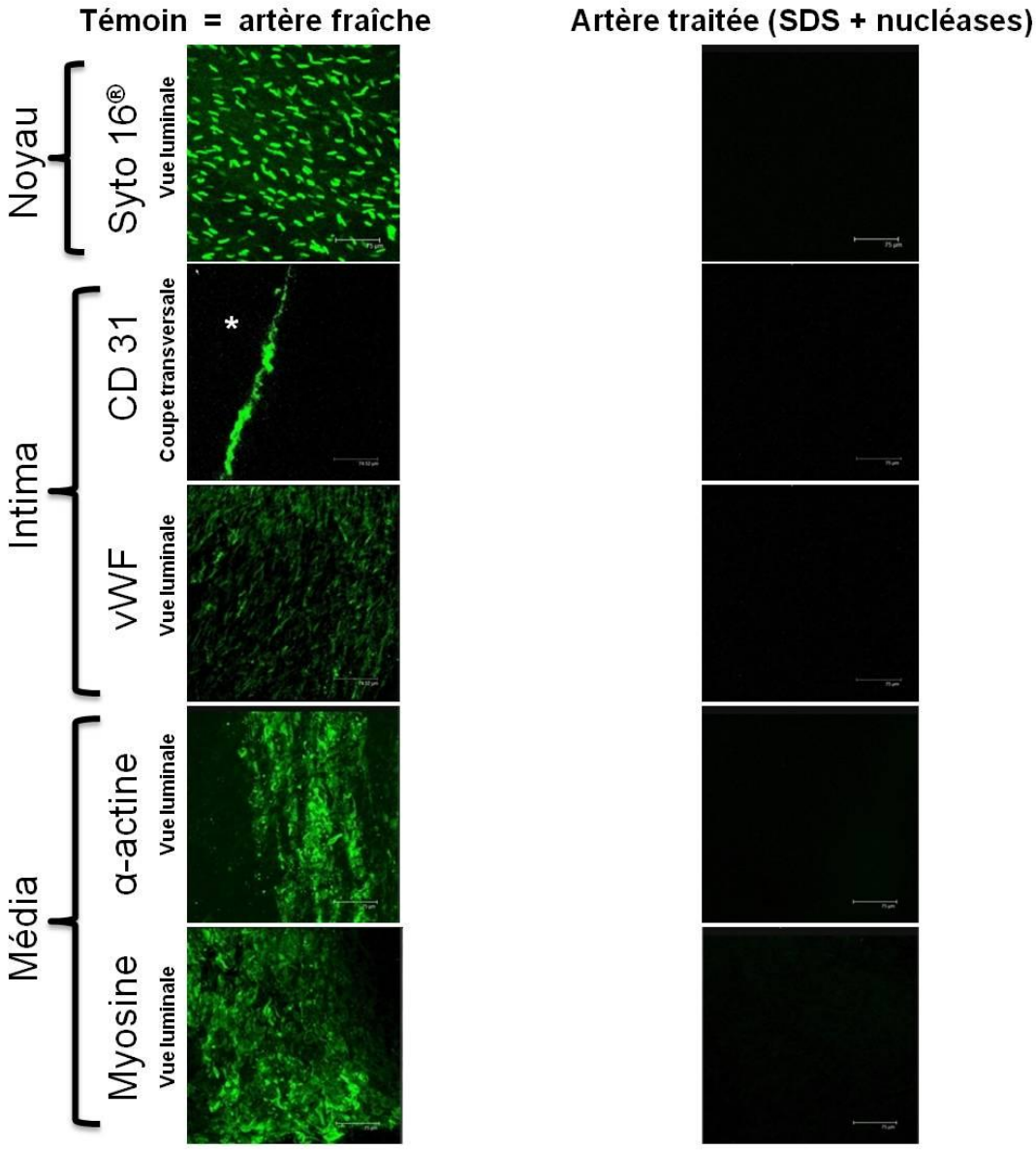


Figure 53 : **Immunomarquages de la paroi vasculaire avant et après traitement.** *Les artères ont été traitées par du SDS et des nucléases (DNAse et RNase) en vue de les acellulariser. Les artères ombilicales fraîches constituent les témoins. Les noyaux des cellules vasculaires ont été marqués par le Syto 16®, les cellules endothéliales par marquage du CD31 et du vWF, et les cellules musculaires lisses par marquage de l'α-actine et de la myosine. La visualisation a été réalisée en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne) en vue luminale (Syto 16®, vWF, α-actine et myosine) ou en coupe transversale (CD31). Après traitement des artères, aucun imunomarquage nucléaire, endothélial ou musculaire n'est observé. L'astérisque situe la lumière de l'artère. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle 75µm ; vWF = facteur Von Willebrand ; n = 3 artères.*

• *Vérification de l'acellularisation de la matrice par histologie*

Cet examen permet de vérifier l'absence d'acides nucléiques résiduels consécutivement à la destruction du noyau. Pour cela, des coupes d'artères témoins et traitées ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) afin de visualiser les différents acides nucléiques (Figure 54).

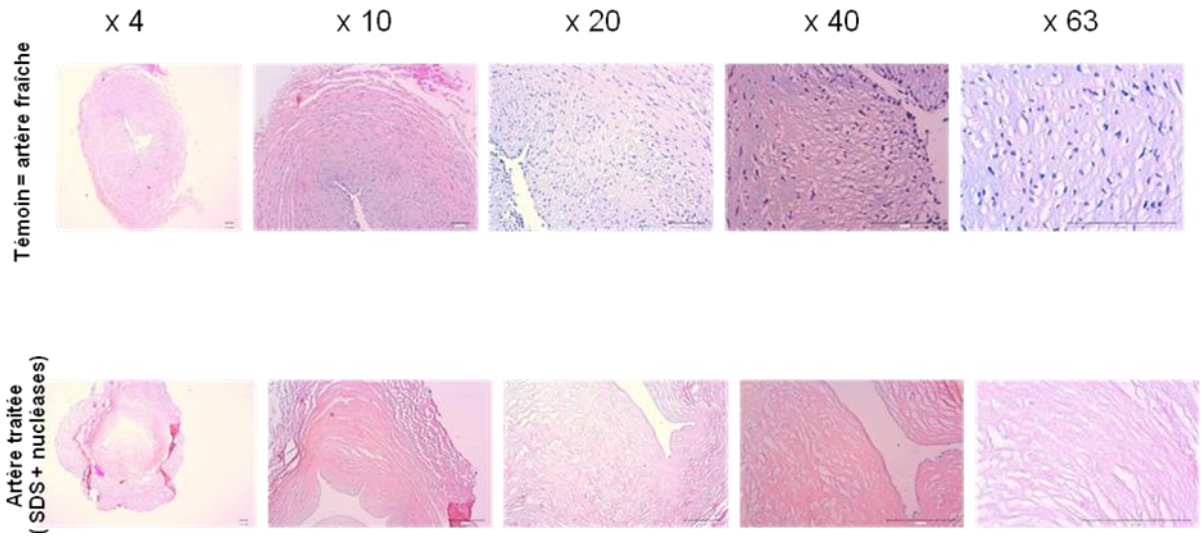


Figure 54 : **Coupes histologiques transversales d'artères ombilicales fraîches et d'artères ayant subi le traitement d'acellularisation**. *Après inclusion dans la paraffine, une coloration à l'hématoxyline-éosine-safran a été réalisée sur les artères. L'observation est effectuée au microscope inversé (Leica, Allemagne). Les acides nucléiques sont visualisés en bleu. Comparée à l'artère fraîche, l'artère traitée au SDS et nucléases présente une paroi exempte de tout acide nucléique. Microscope inversé Olympus IX, Japon, n =3.*

Les artères ombilicales fraîches présentent un aspect normal. Les noyaux sont clairement visibles dans les différentes tuniques. Ils ont un aspect net et un contour régulier, témoignant de l'intégrité nucléaire.

Les artères, traitées au SDS et nucléases, présentent un tout autre aspect. La figure 54 montre clairement une absence de noyaux après traitement. Autre point important, aucun résidu d'acides nucléiques (filament ou pelote d'ADN) n'est visible.

La figure 55 montre l'aspect macroscopique de l'artère ombilicale avant et après

traitement. L'intégrité macroscopique est conservée et l'artère traitée présente sa forme cylindrique habituelle « de tuyau », ce qui facilitera l'injection ultérieure de solution dans sa lumière.

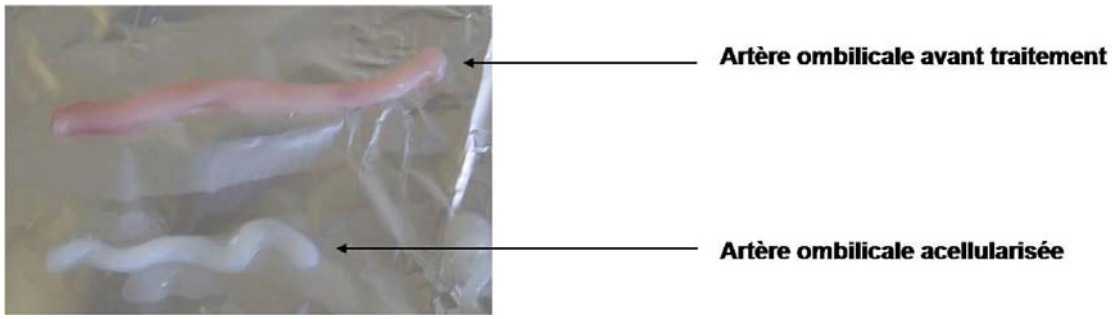


Figure 55 : **Photographie de 2 artères : l'une avant traitement au SDS et nucléases et l'autre après traitement.** *La structure macroscopique et la forme cylindrique semblent bien conservées même après traitement et restent similaires au témoin.*

I.1.2. Vérification du dépôt du film multicouche de polyélectrolytes

La surface luminale de l'artère acellularisée a été recouverte d'un film MPE (PAH-PSS)$_3$-PAH par injection alternée de PAH et de PSS dans sa lumière.

• *Visualisation du dépôt du film MPE par microscopie confocale à balayage laser*

Pour évaluer le dépôt du film, la solution de PAH utilisée pour la construction de la dernière couche a été remplacée par une couche de PAH couplé à un marqueur fluorescent : la rhodamine.

Grâce à la fluorescence de la rhodamine couplée à la dernière couche de PAH, la figure 56 montre, en microscopie confocale, le dépôt du film MPE (PAH-PSS)$_3$-PAH sur une artère acellularisée. Le dépôt est homogène et régulier sur l'ensemble de la surface interne de la matrice acellulaire.

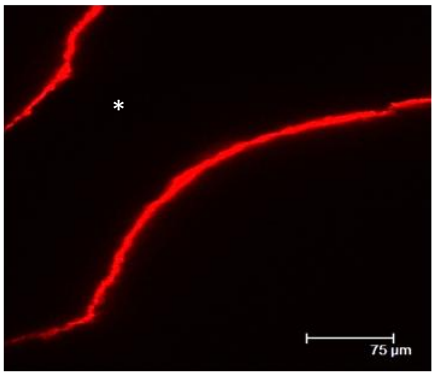


Figure 56 : **Coupe transversale d'artère acellularisée montrant le recouvrement de sa lumière par le film MPE (PAH-PSS)$_3$-PAH dont la dernière couche de PAH a été marquée à la rhodamine**. *Le recouvrement de la surface luminale est régulier et homogène. L'astérisque situe la lumière de l'artère. Microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne), Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3 artères.*

• *Visualisation du dépôt du film par histologie*

Après dépôt du film (PAH-PSS)$_3$-PAH, une coloration HES est réalisée. Cette coloration a la propriété de colorer en fuchsia le film MPE. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 57.

X 20 X 60

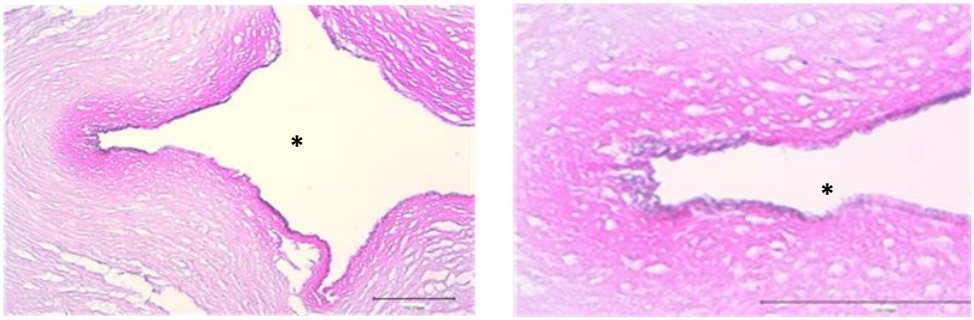


Figure 57 : **Coupes transversales d'artères acellularisées montrant le recouvrement de leur lumière par le film (PAH-PSS)$_3$-PAH**. *Le traitement à l'hématoxyline-éosine-safran colore en rose fuchsia le film multicouche de polyélectrolytes situé sur la paroi luminale de l'artère. Ces coupes histologiques montrent un recouvrement régulier et homogène de la surface luminale par le film MPE. L'astérisque situe la lumière de l'artère. Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 4 ; n = 3 artères.*

Les observations histologiques confirment le dépôt régulier du film MPE sur la matrice artérielle acellularisée. Ces observations nous indiquent également que le film diffuse légèrement dans la matrice.

I.1.3. Endothélialisation des artères

L'artère ombilicale acellularisée et fonctionnalisée par le film MPE a été cellularisée à l'aide de cellules endothéliales matures. Ces cellules ont été isolées de la veine ombilicale humaine, amplifiées *in vitro*, puis ensemencées en passage 3 sur la matrice.

L'endothélialisation de la matrice artérielle a été vérifiée par microscopie confocale. Le phénotype endothélial des cellules a été recherché par immunomarquage du vWF et du CD 31.

La figure 58 montre que les cellules ensemencées à l'intérieur des artères acellularisées et fonctionnalisées par le film MPE ont correctement adhéré à la surface luminale. Elles forment une couche continue tout le long de la paroi interne de l'artère. Le phénotype endothélial est conservé, aboutissant à la formation d'un néo-endothélium comparable à celui observé dans les artères fraîches.

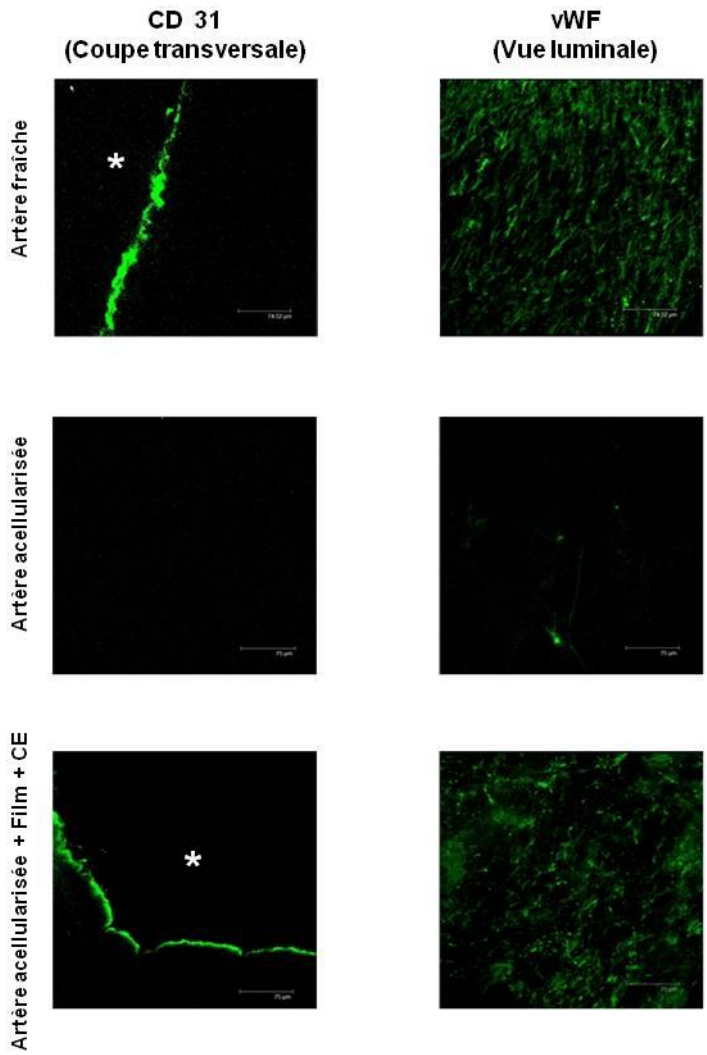


Figure 58 : **Evaluation et caractérisation des cellules ensemencées à l'intérieur des matrices acellularisées recouvertes de film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH.** *Le film MPE a été déposé à l'intérieur des artères acellularisées par injection alternée des solutions de PAH et PSS. Les cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical ont ensuite été ensemencées en passage 3 et à une concentration de 10^5 cellules/cm^2. Puis la construction obtenue est placée en incubateur à 37°C pendant 1 semaine. Le recouvrement cellulaire et le phénotype ont été évalués par immunomarquage du CD 31 (coupe transversale) et du vWF (vue luminale) et visualisés en microscopie confocale à balayage laser (AOBS sp2, Leica, Allemagne). L'astérisque situe la lumière de l'artère. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3 artères ; CE = cellules endothéliales.*

I.1.4. Impact du film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH sur le comportement des cellules endothéliales

Afin de s'assurer de la capacité du film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH à constituer un revêtement adéquat pour l'ensemencement des cellules, l'objectif de cette étude a été de vérifier la biocompatibilité du film avec les CE ensemencées dans la construction.

L'inflammation éventuellement induite par le film a été étudiée par PCR quantitative grâce à l'expression du marqueur de la E-sélectine, tandis que l'influence du film sur la fonctionnalité des CE a été évaluée *via* l'expression de la eNOS.

Les résultats de qPCR montrent que les cellules ensemencées sur la matrice acellulaire recouverte de film MPE présentent un niveau d'expression d'ARNm de E-sélectine plus faible que les cellules cultivées sur la matrice vasculaire seule (figure 59). Ces résultats montrent un niveau d'inflammation cellulaire plus faible en présence de film, ce qui suggère une très bonne biocompatibilité entre le film MPE avec les cellules endothéliales.

Comparées aux cellules ensemencées directement sur l'artère acellulaire, les cellules ensemencées sur la matrice recouverte de film MPE présentent une meilleure expression de eNOS, suggérant une meilleure fonctionnalité des cellules endothéliales en présence qu'en l'absence de film MPE.

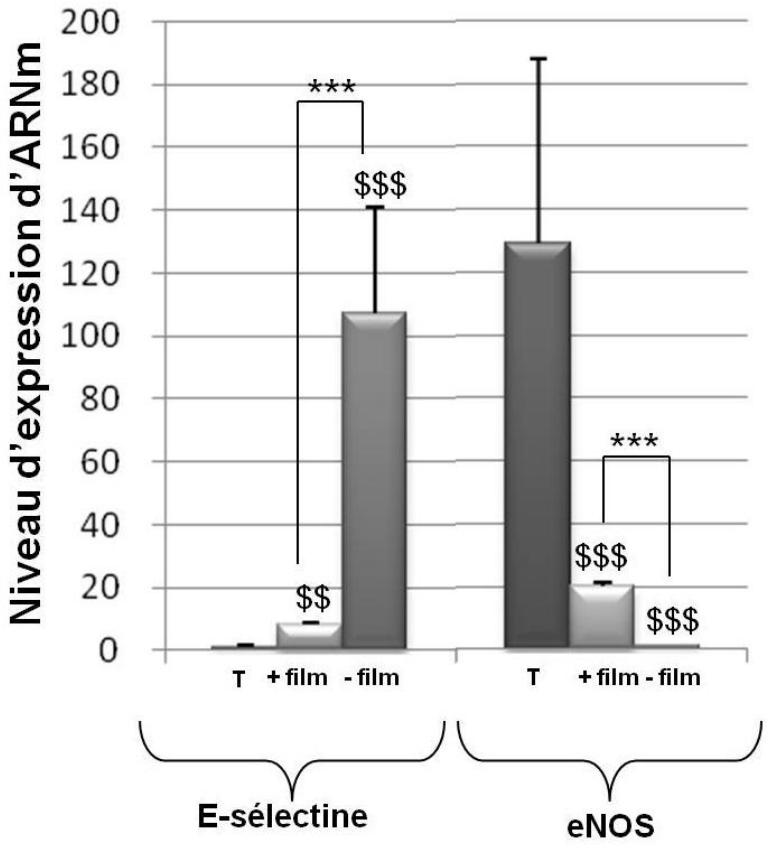


Figure 59 : **Niveaux d'expression d'ARNm de E-sélectine et de eNOS de cellules endothéliales cultivées sur une matrice acellulaire recouverte de film multicouche de polyélectrolytes.** *Après lyse des cellules, les ARN ont été purifiés, rétrotranscrits et polymérisés par qPCR (My IQ, Bio-Rad, France) pour les gènes de la E-sélectine et de la eNOS. Chaque analyse (n=3) a été réalisée en triplicate. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type. Test ANOVA ; $$: p ≤ 0.01, $$$: p ≤ 0.001 versus témoin, et *** : p ≤ 0.001 versus groupe indiqué ; T = témoin (artère fraîche) ; + film = artère ombilicale acellulaire recouverte de film MPE et endothélialisée ; - film = artère ombilicale acellulaire endothélialisée.*

I.1.5. Impact du film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH sur la rétention des CE après cisaillement

L'adhérence des CE sur le film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH soumis à un cisaillement a été évaluée. L'objectif de cette étude est de mettre en avant les propriétés adhésives du film vis-à-vis des CE ensemencées à l'intérieur d'une matrice acellulaire recouverte par ce film.

Des artères acellulaires fonctionalisées par un film MPE et ensemencées par des CE ont été d'abord cultivées en conditions statiques jusqu'à formation d'une monocouche de CE, puis soumises à cisaillement de 1Pa pendant 1h.

La présence de CE sur la construction a d'abord été mise en évidence par microscopie confocale à balayage laser (figure 60), puis le nombre de cellules restant après application d'une contrainte de cisaillemnt a été quantifié par dosage d'ARN (figure 61).

• *Evaluation de la rétention cellulaire par microscopie confocale à balayage laser*

L'examen en microscopie confocale permet de vérifier la rétention des cellules sur le film MPE, suite à l'application de forces de cisaillement. Le phénotype endothélial a été mis en évidence par immunomarquage du CD 31 et du vWF (figure 60). Les images obtenues en microscopie confocale montrent une bonne rétention cellulaire et confirment la conservation du phénotype endothélial après application des forces de cisaillement. A l'issue de ce dernier, la monocouche formée par les CE reste quasiment identique à celle observée avant cisaillement.

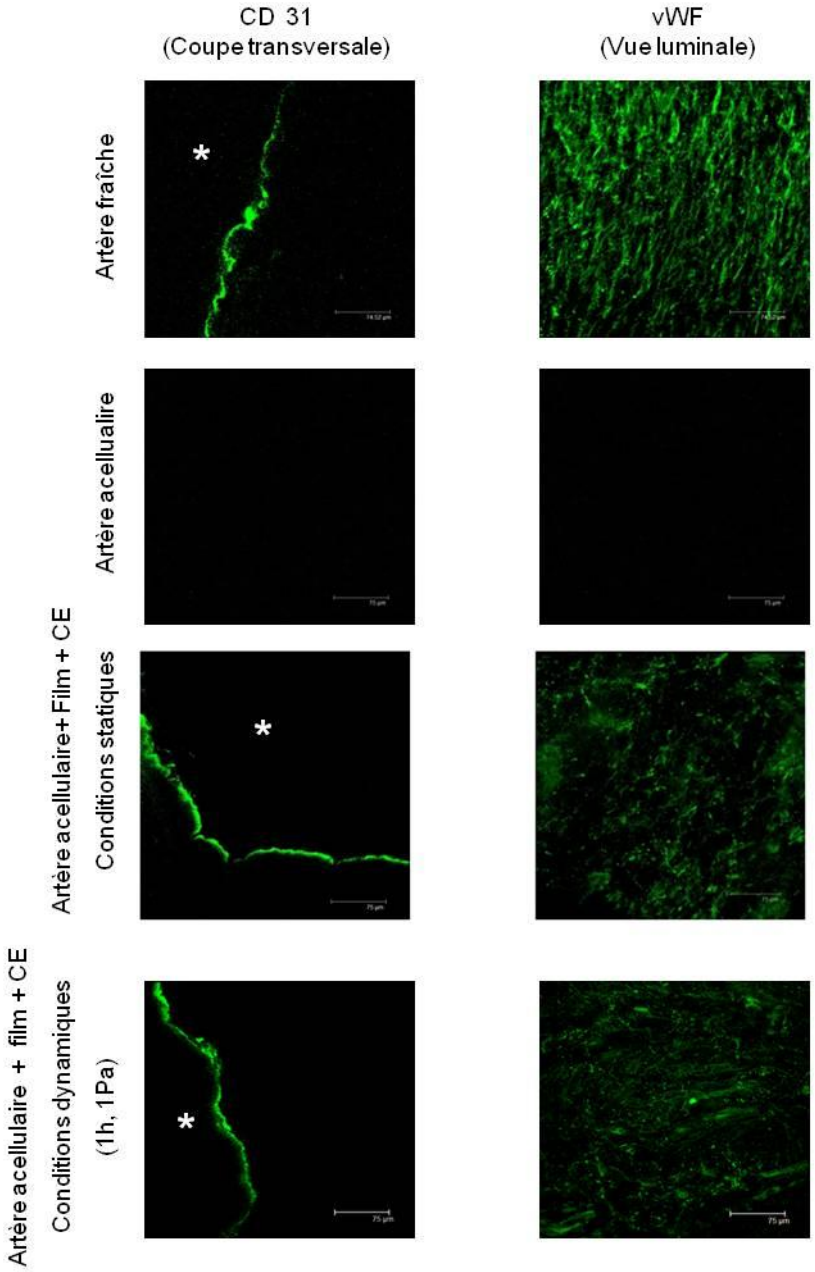


Figure 60 : **Evaluation de la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans des artères acellularisées recouvertes de film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH en conditions de culture statique et dynamique.** *Des artères acellularisées fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes et ensemencées par des CE ont été soumises à cisaillement de 1 Pa pendant 1h. La quantité de cellules restant adhérentes sur le film MPE après cisaillement a été évaluée par immunomarquage du CD 31 (coupe transversale) et du vWF (vue luminale) et visualisée en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'astérisque situe la lumière de l'artère. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3 artères ; CE = cellules endothéliales ; vWF = facteur Von Willebrand.*

• *Vérification de l'adhérence cellulaire par dosage d'ARN*

La quantité de cellules endothéliales restant adhérente a été évaluée quantitativement par dosage des ARN totaux.

En statique : les artères acellularisées présentent une quantité nulle d'ARN. Par contre, les artères acellularisées et ensemencées par des HUVEC, qu'elles soient ou non recouvertes de film MPE, présentent une quantité d'ARN comparable entre elles et significativement différent de celui de l'artère acellulaire. La quantité de cellules ayant adhéré est donc comparable, indépendamment de la présence du film.

En dynamique : les matrices cellularisées présentent une quantité plus élevée d'ARN lorsqu'elles ont été préalablement recouvertes de film MPE. De plus, après cisaillement, la quantité de cellules présentes sur l'artère recouverte de film est similaire à celle mesurée avant cisaillement. Le film MPE améliore donc la rétention des cellules soumises à des contraintes de cisaillement.

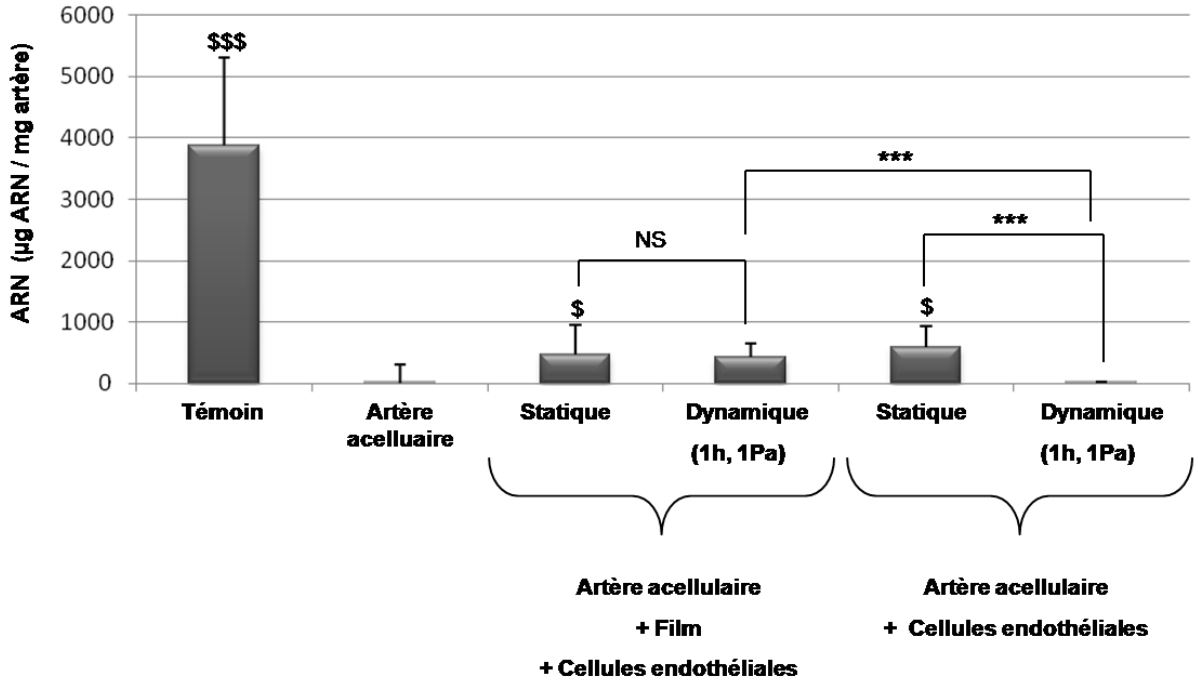


Figure 61 : **Evaluation quantitative de la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans des artères acellularisées recouvertes de film (PAH-PSS)$_3$-PAH en conditions de culture statique et dynamique.** *Des artères acellularisées recouvertes du film multicouche de polyélectrolytes et ensemencées par des CE ont été soumises aux forces de cisaillement de 1Pa pendant 1h. La quantité de cellules restant adhérentes sur le film après cisaillement a été évaluée par dosage d'ARN. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type. Chaque analyse a été réalisée en triplicate. n = 3 artères ; Témoin = artère fraîche contenant des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses ; test ANOVA ; $: p≤ 0,1 ; $$$: p ≤ 0.001 versus artère acellulaire et *** : p ≤ 0.001 versus groupe comparé ; NS = non significatif.*

I.2. Discussion

La perméabilité médiocre des substituts vasculaires de petits calibres actuellement disponibles, résultant principalement de l'absence de surface suffisament anti-agrégante ou recouverte de CE, a conduit au développement fulgurant de l'ingénierie vasculaire. Son objectif vise à concevoir un substitut vasculaire naturel de petit diamètre grâce à la reconstruction d'une surface interne semblable à celle en place dans le vaisseau natif. La surface luminale des vaisseaux natifs, appelée intima, est en effet constituée d'un ensemble de CE permettant de prévenir la thrombose. La reconstruction d'un tel endothélium sur une prothèse vasculaire constitue un réel challenge car l'adhésion des CE doit être suffisamment forte pour assurer leur rétention aux forces de cisaillement exercées par le flux sanguin. Notre travail s'inscrit dans cette problématique.

Les propriétés adhésives des CE sur film multicouche de polyélectrolytes (PAH-PSS)$_3$-PAH ont été démontrées sur lames de verre (Boura et al., 2003; Boura et al., 2005) et sur des substituts vasculaires synthétiques (Moby et al., 2008). Les propriétés de ce film favorables à l'adhérence cellulaire n'ont cependant jamais été mises en évidence sur un support naturel tel que des artères ombilicales.

Pour le démontrer, nous avons dû nous affranchir totalement de la présence des cellules propres à l'artère ; et c'est sur cette matrice acellulaire, que le film MPE et les cellules ont été déposés.

Dans ce travail, nous avons construit un substitut vasculaire naturel dont l'endothélialisation a été obtenue par ensemencement des CE dans une artère ombilicale acellulaire fonctionnalisée par un film multicouche de polyélectrolytes (PAH-PSS)$_3$-PAH. La capacité du film à constituer un revêtement adéquat pour l'endothélialisation et l'impact du film sur les CE ainsi que la capacité du film à favoriser l'adhérence de celles-ci sous contraintes de cisaillement ont fait l'objet de notre étude.

Afin de réaliser l'évaluation la plus précise possible, nous avons choisi d'acellulariser la matrice artérielle, c'est-à-dire d'éliminer toutes les cellules constitutives des tuniques de l'artère de façon à mettre en évidence quantitativement les cellules constituant le néo-endothélium.

Diverses méthodes ont été testées pour acelluláriser les artères : bain hypotonique/hypertonique (Vyavahare et al., 1997; Woods and Gratzer, 2005), Triton (Kaushal et al., 2001; Wang et al., 2007), déshydratation (Kaushal et al., 2001). Chacune de ces méthodes a été testée pour l'acellularisation de nos artères ombilicales. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants et font état de la présence de résidus d'ADN/ARN visqueux dans la matrice. Le recours à des détergents et des enzymes reste donc obligatoire afin d'éliminer toutes traces d'acides nucléiques résiduels (Allaire et al., 1997; Cho et al., 2005; Ketchedjian et al., 2005; Wainwright, 1995).

Nos artères ombilicales ont ainsi été traitées par un détergent : le SDS et des enzymes : DNase et RNase. Ces réactifs ont été choisis respectivement pour leur capacité à dissoudre les membranes et à dégrader les acides nucléiques libérés à la suite de la destruction des noyaux engendrée par le SDS. Les résultats d'histologie et de microscopie confocale à balayage laser montrent une acellularisation complète de l'artère. Ces observations sont confirmées par les dosages d'ARN.

La surface luminale de la matrice acellularisée a été recouverte par un film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$. Sa mise en évidence par microscopie confocale et par coloration histologique HES montre un dépôt net, homogène et continu sur la surface luminale de la matrice acellulaire, dépourvue de ses cellules et dont il ne reste plus que le squelette constitué de MEC. Ces résultats confirment ceux de Kerdjoudj *et al.* qui ont mis en évidence le dépôt intégral d'un film MPE de constitution proche du nôtre (Kerdjoudj et al., 2008; Kerdjoudj et al., 2006).

Nous avons montré, par microscopie confocale et dosage d'ARN, que l'ensemencement de CE dans la matrice fonctionnalisée permettait la formation d'une monocouche cellulaire continue de phénotype endothélial, générant un néo-endothélium. Le film favorise donc l'adhésion des cellules à sa surface.

Le procédé d'endothélialisation de prothèse vasculaire a vu le jour sous l'impulsion de Herring (Herring et al., 1978), puis de l'équipe de Nichols (Nichols et al., 1981), donnant ainsi lieu à la réduction du caractère thrombogène et à l'amélioration de la perméabilité des prothèses vasculaires. D'autres revêtements de surface comme l'albumine (Bos et al., 1999), le collagène (Budd et al., 1989), la fibrine (Gosselin et al., 1996), la laminine (Schneider et al., 1992), le sérum (Lamm et al., 2001), la MEC (Ye et al., 2000), la gélatine (Marois et al., 1999) ou des fragments peptidiques (McMillan et al., 2001) constituent des supports pour la

formation d'un néo-endothélium dans des prothèses vasculaires. Cependant, si la rétention des cellules est satisfaisante en condition statique, la quantité de cellules restant adhérentes après application d'une contrainte de cisaillement, reproduisant les contraintes imposées par le sang à l'endothélium, est très faible (Salacinski et al., 2001; Xiao and Shi, 2004). Par ailleurs, les tests réalisés sur les animaux sont peu satisfaisants et mettent en évidence qu'aucun revêtement de surface ne remplit correctement son rôle dès lors que la prothèse est soumise à des contraintes de cisaillement (James et al., 1992; Richardson et al., 1980). C'est dans ces circonstances que notre film MPE se distingue des autres revêtements permettant l'adhésion cellulaire.

Nous avons testé la capacité d'adhésion des cellules sur le film MPE. Pour cela, les constructions ont été placées dans une chambre de cisaillement, réalisée au laboratoire, et reliée à un circuit fermé permettant de faire circuler un milieu de culture à l'intérieur des matrices. Ces dernières ont été soumises pendant une heure à des contraintes de cisaillement de 1Pa. Cette valeur a été choisie car elle correspond aux forces de cisaillement exercées par le sang dans des artères de 3 à 4 mm de diamètre (Samijo et al., 1998).

Le dosage d'ARN et les observations réalisées en microscopie confocale montrent clairement que le film MPE améliore la rétention des CE cultivées sous contraintes de cisaillement de 1Pa.

Le mécanisme d'adhésion cellulaire sur le film MPE n'est pas clairement élucidé. Il semblerait cependant que les interactions électrostatiques et les forces hydrophobes jouent un grand rôle dans l'adhésion cellulaire sur le support (Ren et al., 2010), car ce sont ces forces qui permettent l'adhésion des polycations et des polyanions lors de la construction du film dans les artères. Par ailleurs, la stabilité du film MPE au cours de la culture cellulaire a été mise en évidence par deux thèses précédemment réalisées au laboratoire (thèses C. Boura et H. Kerdjoudj). Le film MPE favorise l'adhésion ferme et durable des cellules sur l'artère ombilicale, même en conditions dynamiques.

L'inocuité des films MPE sur le fonctionnement des cellules endothéliales a été vérifiée. Divers travaux ont montré la biocompatibilité des films MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH avec des types cellulaires bien distincts (Boura et al., 2003). Cependant, ces études se limitent à l'analyse de la viabilité cellulaire et ne mettent pas en évidence l'effet du film sur la physiologie cellulaire. Le rôle du néo-endothélium reconstitué sur la surface interne de l'artère est d'assurer la perméabilité du greffon à long terme. La présence d'un revêtement

endothélial stable et uniforme est un facteur essentiel pour prévenir le caractère thrombogène des substituts vasculaires. En effet, l'endothélium, qui représente l'interface physiologique entre le sang et la paroi vasculaire, se comporte comme un régulateur de la physiologie vasculaire, contrôlant le tonus vasomoteur, la migration et la prolifération des CML, l'inflammation et l'hémostase, en jouant le rôle de balance entre les propriétés pro- et anticoagulantes. Le bon fonctionnement de l'intima est un élément primordial pour assurer la perméabilité du substitut à long terme. Mais qu'en est-il de l'homéostasie cellulaire ?

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au degré d'inflammation provoqué par le film MPE sur les CE. Comme tout matériau exogène, le film est susceptible d'engendrer une inflammation des cellules vasculaires et une activation des cellules endothéliales, favorisant ainsi l'athérogenèse (Cybulsky and Gimbrone, 1991). L'endothélium activé exprime des molécules d'adhésion de surface cellulaire comme la E-sélectine, qui facilitent la fixation des leucocytes sanguins périphériques à la surface endothéliale (Radomski et al., 1990). Nos résultats de qPCR montrent que le film MPE ne provoque qu'une très faible inflammation endothéliale. Celui-ci constitue donc un revêtement de surface performant favorisant l'adhésion cellulaire. Dans la perspective d'une application clinique, il est très important que le potentiel inflammatoire des prothèses et donc par extension du film MPE soit le plus faible possible, de façon à favoriser au mieux son intégration après implantation et à minimiser son impact sur l'évolution de la maladie vasculaire. Il ne faut pas oublier que le remplacement d'un vaisseau, devenu non fonctionnel suite au développement d'une maladie athéromateuse, ne consiste qu'à remédier aux conséquences de la dégénérescence vasculaire. La maladie est systémique et en aucun cas la cause de la maladie n'est supprimée. La maladie est évolutive malgré le remplacement du vaisseau lésé. Plus l'inflammation provoquée par le film sera faible, meilleure sera la tolérance, ce qui constitue donc un réel avantage pour la réalisation d'un substitut vasculaire.

Dans les lésions athéromateuses, la maladie modifie les sources de NO disponible et modifie la répression sur le développement du muscle lisse.

La eNOS est l'enzyme responsable de la production constitutive de NO. Nous avons choisi d'étudier son expression car les vaisseaux atteints par l'athérosclérose manifestent une fonction vasomotrice altérée due à la diminution de la synthèse ou de la biodisponibilité de NO issu de l'endothélium (Cosentino and Luscher, 1995). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de la eNOS lorsque les cellules sont ensemencées sur des matrices recouvertes de film MPE. Ces résultats sont d'autant plus encourageants que le NO

produit contribue à limiter l'agrégation plaquettaire et la prolifération des muscles lisses. Par ailleurs, de nombreuses preuves indiquent que NO joue un rôle crucial pour le bon fonctionnement des vaisseaux car il possède des propriétés anti-inflammatoires en limitant les interactions leucocyte-endothélium. C'est pourquoi la production de NO est au centre des préoccupations de nombreuses équipes d'ingénierie vasculaire. Ainsi, des cellules mésenchymateuses transfectées pour surexprimer eNOS permettraient de minimiser la survenue d'événements thrombotiques (Cayatte et al., 1994; Cooke et al., 1992; Zarbiv et al., 2007). De même, de multiples matériaux relarguant du NO sont en cours de développement comme des polymères synthétiques incorporant des donneurs de NO tels que les diazeniumdiolates et les S-nitrosothiols (Vara et al., 2005).

I.3. Conclusion

Le film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH constitue un revêtement de surface de choix, favorisant l'adhésion et la rétention des CE. Il représente un moyen simple, peu coûteux et rapide pour recréer sur la surface luminale d'une artère un néo-endothélium fonctionnel et résistant aux contraintes de cisaillement.

.

II. Transfert et validation de la technique de recouvrement par des films multicouches de polyélectrolytes sur un vaisseau de référence : la veine saphène humaine

II.1. Résultats expérimentaux

Ce chapitre permet de valider notre concept de film MPE sur un substitut vasculaire de référence : la veine saphène. Cette étude permet de préciser comment et par quels moyens ce substitut de référence pourrait être fonctionnalisé et ponté sur l'animal, et comment sa perméabilité peut être suivie au cours de l'implantation.

II.1.1. Caractérisation *in vitro* de la veine saphène fonctionnalisée

• *Vérification du bon dépôt du film*

Le dépôt du film a été vérifié par une coloration histologique HES a été réalisée sur des coupes tranversales de veines saphènes fonctionnalisées par le film MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$.

Les observations (figure 62) montrent un dépôt homogène et régulier sur toute la surface luminale de la veine. Le film est donc correctement déposé.

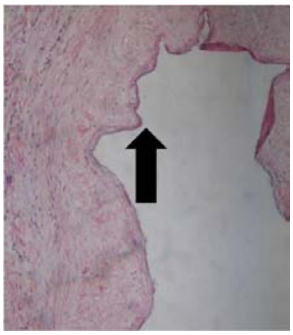


Figure 62 : **Recouvrement de la lumière des veines saphènes par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$**. *Le traitement à l'hématoxyline-éosine-safran colore en rose fuchsia le film multicouche de polyélectrolytes situé sur la paroi de l'artère. Ces coupes histologiques montrent un recouvrement régulier et homogène de toute la surface luminale par le film MPE. La flèche indique le dépôt du film MPE. Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 10 ; n = 3 artères*.

• *Vérification de l'état de la paroi veineuse après dépôt du film MPE*

L'état de la paroi vasculaire a été vérifié par histologie après dépôt du film MPE dans la veine (figure 63). Plusieurs colorations ont été réalisées :

- HES afin d'observer l'aspect général de la paroi ;
- Weigert pour visualiser l'élastine ;
- immunohistochimie afin de mettre en évidence le collagène ;
- Van Kossa pour révéler l'état de minéralisation de la paroi vasculaire (calcification).

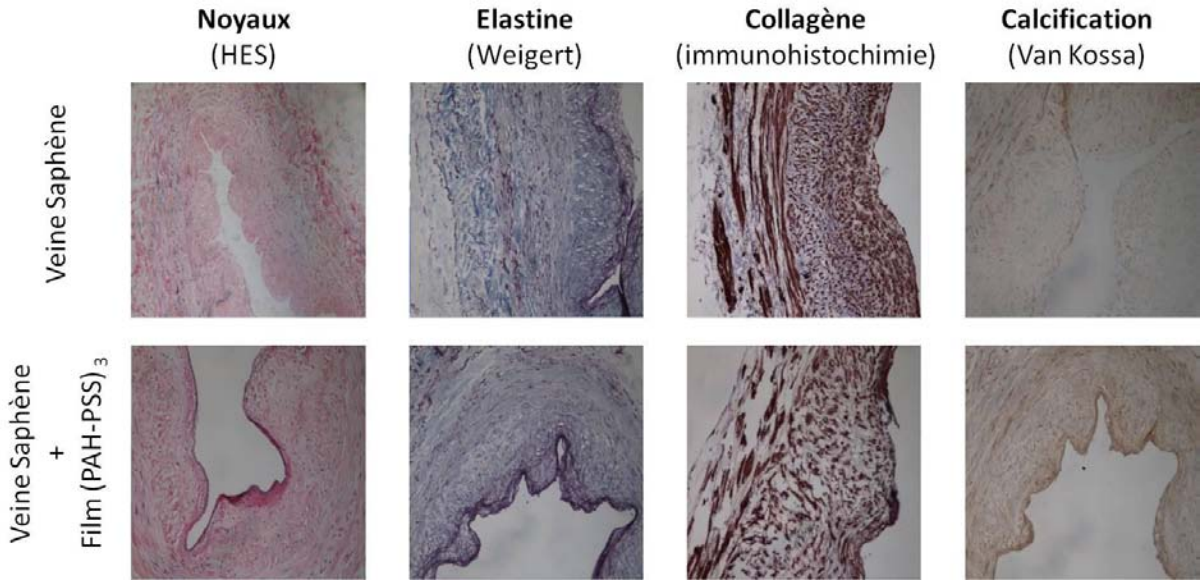


Figure 63 : **Coupes histologiques de veines saphènes fonctionnalisées par un film (PAH-PSS)$_3$.** *Les noyaux ont été mis en évidence par coloration hématoxyline-éosine-safran, l'élastine par la coloration de Weigert, le collagène par immunohistochimie et la calcification par la coloration Van Kossa. La structure de la paroi vasculaire n'est pas perturbée par le dépôt du film MPE et aucune calcification n'est observée. n=3 ; Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 10.*

Outre le bon dépôt du film MPE, les observations histologiques (figure 63) mettent en évidence après dépôt du film MPE une conservation de la structure pariétale de la veine. Le film MPE ne perturbe pas la MEC, que ce soit au niveau du collagène ou de l'élastine, et aucune calcification n'est observée suite à sa fonctionnalisation par le film MPE.

II.1.2. Evaluation *in vivo* de la perméabilité de la veine saphène fonctionnalisée par un film MPE

• *Vérification de la perméabilité après implantation*

Les substituts veineux fonctionnalisés ont été implantés au niveau de la carotide de lapin. Le suivi de la perméabilité est assuré par échographie-Doppler.

La perméabilité a été vérifiée à plusieurs reprises durant les 5 semaines suivant l'implantation. La figure 64 présente un exemple de tracés obtenus par écho-Doppler.

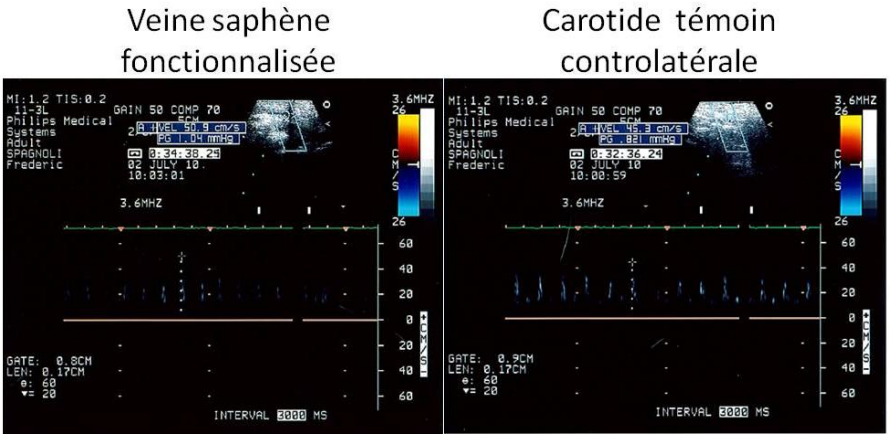


Figure 64 : **Tracé obtenus par écho-Doppler après 5 semaines d'implantation de la veine saphène fonctionnalisée.** *Les écho-Doppler ont été réalisés sur des lapins vigiles maintenus en décubitus dorsal tout au long de l'expérimentation.*

• *Vélocité et diamètre de la veine saphène fonctionnalisée*

La vélocité du flux sanguin et le diamètre de la veine ont été déterminés par écho-Doppler. Les valeurs sont rapportées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : **Vitesse du flux sanguin relevée par écho-Doppler et évolution du diamètre interne de la veine saphène fonctionnalisée par un film MPE.** 3 *lapins ont été implantés avec une veine fonctionnalisée. La carotide native controlatérale sert de témoin*.

	Vitesse du flux sanguin	Diamètre du vaisseau
Substitut	88,8 cm/s	3,4 mm
Carotide native controlatérale	57,2 cm/s	4,1 mm

Le diamètre de la veine saphène après son implantation est proche de celui de la carotide témoin controlatérale.

II.2. Discussion

Dans la partie précédente, nous avons développé un modèle d'étude faisant appel à un vaisseau fonctionnalisé. Dans ce chapitre, notre concept de film MPE d'étude a été validé sur un produit de substitution vasculaire de référence : la veine saphène.

Pour vérifier l'universalité de notre technique ainsi que la capacité des films MPE à fonctionnaliser tous types de vaisseaux, nous avons choisi un modèle humain accessible : la veine saphène.

La veine saphène constitue le substitut naturel de référence le plus utilisé en clinique. Les veines saphènes évaluées dans ce travail ont été fournies par la banque de tissus BioProtec®. Elles proviennent de *stripping* de varices. Ces veines sont utilisées en clinique en tant qu'allogreffes veineuses pour la revascularisation sous-inguinale, en l'absence d'autogreffe veineuse interne homo- ou controlatérale disponible. Ces allogreffes veineuses présentent une excellente compliance, équivalente à celle des autogreffes saphènes. De plus, des tests de résistance à la rupture ont révélé que les propriétés mécaniques de ces veines sont conservées et que les risques d'infection et la fréquence des sténoses étaient relativement faibles (Streichenberger, 2000).

Le film MPE que nous avons choisi est constitué d'un assemblage alternatif de PAH et de PSS, constitué de 6 couches dont la dernière, celle qui sera au contact du sang, est composée de PSS, chargé négativement. Les éléments figurés du sang ayant une charge surfacique négative (Avci-Adali et al., 2010), une répulsion électrostatique forte s'établira entre les cellules sanguines et le film MPE, empêchant ainsi toute adhésion cellulaire sur la surface luminale de la veine et prévenant ainsi la formation de thrombus (Kerdjoudj et al., 2008).

Contrairement au chapitre précédent où nous testions l'adhésion des cellules sur le film MPE, nous avons volontairement choisi de simplifier notre modèle en utilisant un film MPE capable de prévenir la formation de thrombus. En effet, l'objectif de cette étude était de montrer que le dépôt du film pouvait se faire sur différents vaisseaux et que ces vaisseaux fonctionnalisés pouvaient être implantés *in vivo* et répondre convenablement aux sollicitations du flux sanguin et ainsi éviter la thrombose ou l'agrégation cellulaire.

Les résultats d'histologie montrent que le dépôt du film MPE sur la surface endoluminale d'une veine saphène mature est excellent ; il est homogène et régulier sur toute

la surface. Par ailleurs, le film MPE n'interagit pas avec la structure pariétale de la veine, puisqu'aucune perturbation de la matrice ne semble observée consécutivement au dépôt. Les réseaux de collagène sont conservés et aucune calcification inopportune n'est observée sur la paroi. Les veines saphènes ainsi fonctionnalisées ont été implantées en position carotidienne sur le lapin.

Dans notre étude, le lapin blanc de Nouvelle-Zélande a été choisi comme modèle expérimental car le diamètre de sa carotide est similaire à celui des coronaires humaines (Ma et al., 2008). Les essais cliniques ne montrant pas la supériorité de l'anastomose termino-terminale par rapport à l'anastomose termino-latérale (O'Brien et al., 2007), l'implantation du substitut a été réalisée au niveau de la carotide par anastomose termino-latérale entre le greffon et l'artère native. La fixation du greffon sur la carotide native a été réalisée par des points en surjet, permettant une hémostase satisfaisante (Tiwari et al., 2003). Enfin, le greffon a été mis en tension de façon à ce qu'il reste parallèle à la carotide native sans subir ni boucle, ni plicature, afin de minimiser les perturbations du flux dues à la déviation du sang dans le substitut (Cunningham and Gotlieb, 2005).

Le suivi de la perméabilité a été réalisé par écho-Doppler. Elle est supérieure à 5 semaines. Les vitesses de flux sanguin sont normales et comparables à celles observées dans la carotide témoin controlatérale. Il en est de même pour le diamètre de la veine saphène qui demeure constant et comparable à celui du témoin. Des résultats ultérieurs aviseront de l'état des explants, de l'état de calcification et/ou inflammation potentiel, du remodelage pariétal et éventuellement d'une cellularisation de la paroi endoluminale.

II.3. Conclusion

L'ensemble des tests effectués montre que les films MPE peuvent être appliqués sur différents supports (artères ombilicales et veines saphènes). Cette technique est donc applicable en clinique, même si une caractéristation plus précise de ces veines (résistance aux pressions et l'agrégation plaquettaire) serait cependant nécessaire.

Leur résistance à la suture est bonne. L'écho-Doppler montre que ce substitut demeure perméable tout au long de l'expérimentation. La faisabilité de notre technique (dépôt du film et implantabilité) est donc validée sur un modèle couramment utilisé en clinique. L'étape suivante sera donc d'évaluer *in vivo* notre modèle de substitut artériel fonctionnalisé et endothélialisé.

III. Evaluation *in vivo* d'un substitut endothélialisé

Le comportement anti-thrombogénique de notre substitut constitué par une matrice artérielle désendothélialisée, fonctionnalisée et cellularisée a été évalué *in vivo*. Son implantation a été réalisée au niveau de carotides de lapin par pontage termino-latéral.

Notre substitut ainsi que les différentes constructions témoins sont présentés dans le tableau XV.

III.1. Résultats expérimentaux

III.1.1. Evaluation *in vivo* du substitut

L'évaluation *in vivo* a été réalisée à intervalles réguliers par écho-Doppler sur lapin vigile. Cet examen, non invasif et totalement indolore, permet de vérifier la perméabilité du substitut, d'y mesurer la vitesse du sang et ainsi d'en déduire son diamètre.

• *Evaluation de la perméabilité*

La perméabilité de notre substitut et des différentes constructions témoins est rapportée dans le tableau XV.

Tableau XV : **Perméabilité des différentes constructions.**

AOD : Artère ombilicale désendothélialisée, F : Film, C : Cellules ; Ci : Cisaillement

	Présence du Film (PAH-PSS)$_3$-PAH		**Absence du Film (PAH-PSS)$_3$-PAH**	
	Construction	**Perméabilité**	**Construction**	**Perméabilité**
Témoin : Désendothélialisation	AOD+F	< 1 semaine	AOD	< 1 semaine
Témoin : Cellularisation	AOD+F+C	< 2 semaines	AOD+C	< 1 semaine
Substitut	AOD+F+C+Ci	> 3mois		

Au bout d'un court délai après l'implantation, aucun flux sanguin n'est détecté dans les artères témoins, suggérant leurs occlusions précoces. A l'inverse, notre substitut reste perméable jusqu'à 3 mois après son implantation. Un exemple des tracés obtenus pour le substitut, suite aux examens d'écho-Doppler, est présenté dans la figure 65.

-

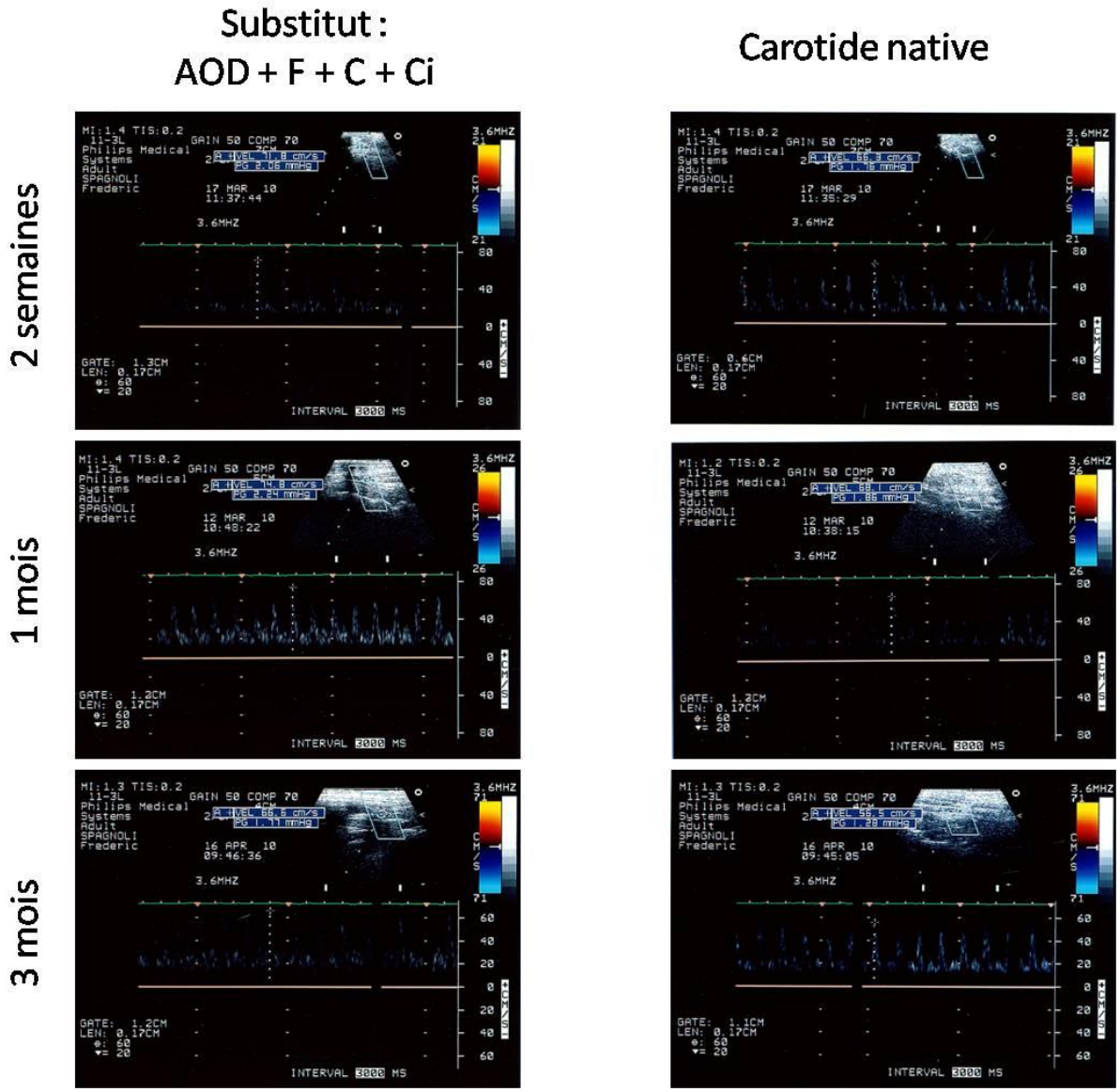


Figure 67 : **Tracés obtenus par écho-Doppler après 2 semaines, 1 mois et 3 mois d'implantation de notre substitut cellularisé (AOD+F+C+Ci) à partir de CE matures.** *Les écho-Doppler ont été réalisés sur des lapins vigiles maintenus en position dorsale tout au long de l'expérimentation.*

• *Mesure de la vitesse du flux sanguin et du diamètre du substitut*

La vitesse du sang dans le substitut ainsi que le diamètre de ce dernier ont été déterminés par écho-Doppler. Les moyennes des différentes valeurs relevées sont rapportées dans le tableau XVI.

Tableau XVI : **Moyennes des vitesses du flux sanguin relevées par écho-Doppler et évolution du diamètre interne du substitut.** *15 lapins ont été implantés avec un substitut (AOD+F+C+Ci). La carotide native controlatérale sert de témoin*.

		1 semaine	3 semaines	5 semaines	7 semaines	9 semaines	11 semaines
Vitesse du flux	Substitut	99 cm/s	69 ± 9 cm/s	59 ± 11 cm/s	55 ± 6 cm/s	61 ± 8 cm/s	83 cm/s
	Carotide native controlatérale	62 ± 15 cm/s	67 ± 9 cm/s	60 ± 11 cm/s	59 ± 9 cm/s	61 ± 6 cm/s	89 ± 9 cm/s
Diamètre	Substitut	3,2 mm	3,9 ± 2 mm	4,3 ± 0,4 mm	4,4 ± 0,3 mm	4,2 ± 0,3 mm	3,5 mm
	Carotide native controlatérale	4,2 ± 0,5 mm	4 ± 0,3 mm	4,3 ± 0,5 mm	4,3 ± 0,3 mm	4,2 ± 0,2 mm	3,5 ± 0,2 mm

La vitesse du flux sanguin est constante tout au long de l'expérimentation et reste comparable aux vitesses observées dans la carotide native.

De même, le diamètre du substitut reste constant tout au long de l'implantation et demeure comparable à celui de la carotide controlatérale témoin.

III.1.2. Evaluation post-explantation

• *Aspect macroscopique*

Le substitut a été explanté à l'issue de 2 semaines et de 3 mois d'implantation. La figure 66 montre l'aspect d'un substitut après 3 mois d'implantation.

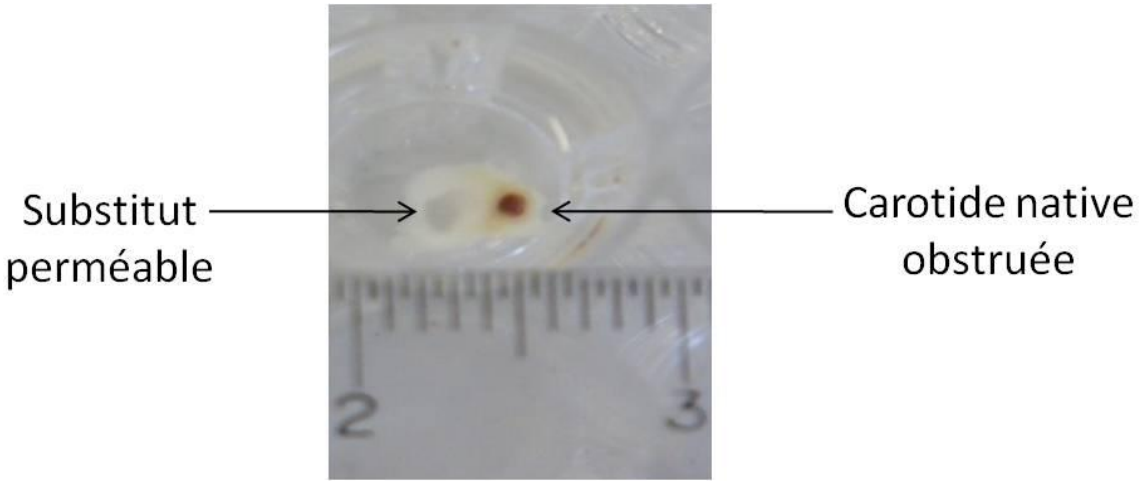


Figure 66 : **Aspect du substitut après 3 mois d'implantation (coupe transversale).**
Le substitut, c'est-à-dire l'artère AOD+F+C+Ci, reste perméable après 3 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. n=5.

Le substitut présente une forme régulière, l'épaisseur de la paroi est constante et aucune dilatation anévrismale n'est observée.

• *Evaluation microscopique de la perméabilité du vaisseau*

L'évaluation histologique a permis de vérifier la perméabilité des substituts, ainsi que de mettre en évidence l'état de la paroi vasculaire.

Après 2 semaines d'implantation, la coloration HES montre la formation de thrombus obstruant la lumière de toutes les constructions témoins, alors que la lumière du substitut reste dégagée (figure 67). Par ailleurs, une très forte réaction inflammatoire adventicielle, absente pour le substitut, est observée pour chacune de ces constructions témoins.

De plus, des noyaux cellulaires longent la lumière artérielle du substitut restée perméable, témoignant ainsi de la présence de cellule sur la surface endoluminale.

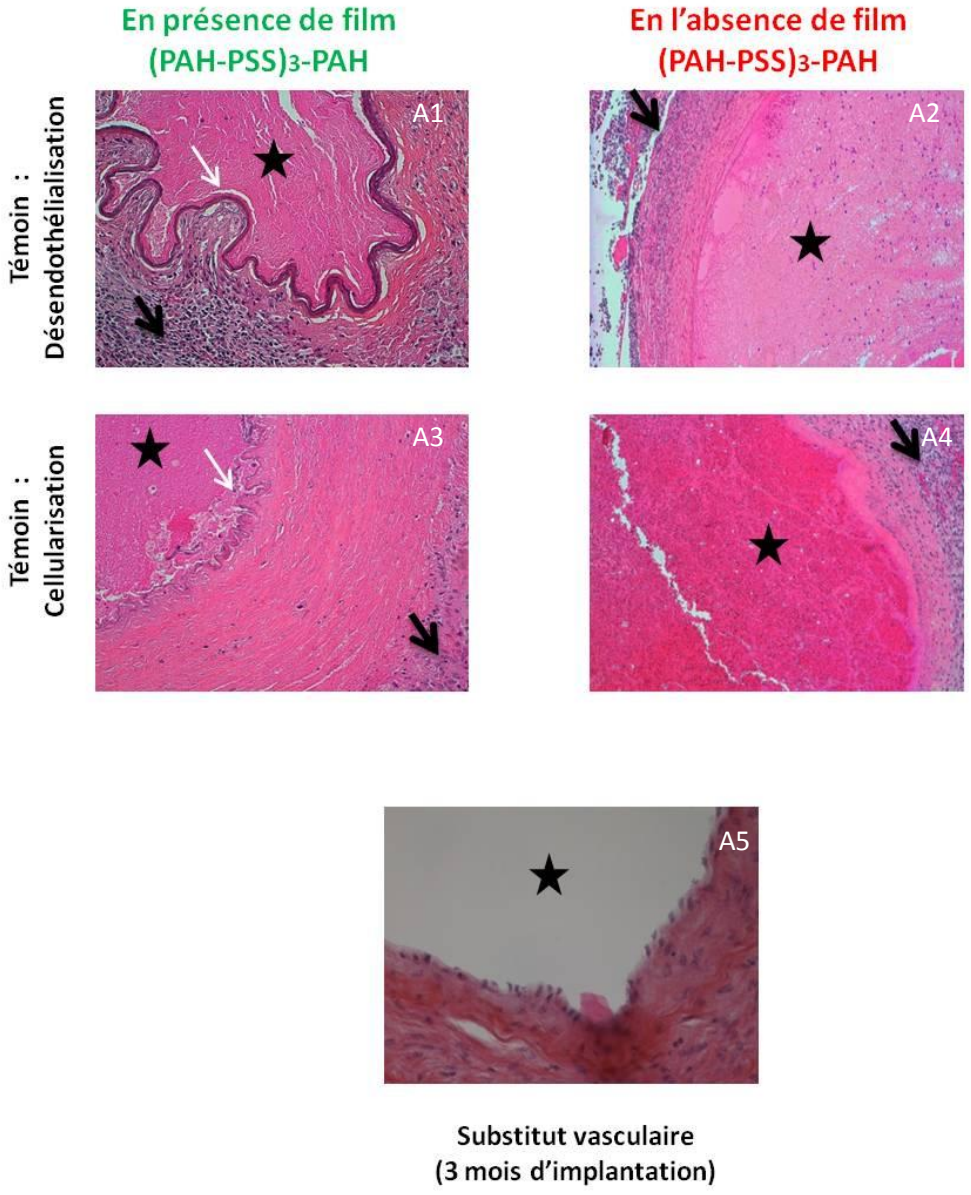


Figure 67 : **Coupes histologiques des différentes constructions après 3 mois d'implantation sur le lapin.** *17 lapins ont été implantés. Après explantation, la coloration à l'hématoxyline-éosine-safran confirme les observations faites en écho-Doppler. La lumière des constructions non endothélialisées (A1 et A2) ainsi que les constructions endothélialisées et non cisaillées (A3 et A4) est obstruée dès 2 semaines d'implantation, et une forte réaction inflammatoire est observée. Le substitut (A5 : AOD+F+C+Ci) reste perméable. L'étoile situe la lumière originelle du vaisseau, la flèche blanche situe le film (PAH-PSS)$_3$-PAH et la flèche noire les cellules inflammatoires. Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 4.*

• *Evaluation du phénotype cellulaire endothélial par microscopie confocale*

Le phénotype des cellules bordant la surface luminale du substitut a été mis en évidence par microscopie confocale à balayage laser. Un marquage endothélial (CD31 et vWF) a été réalisé sur les artères explantées après 2 semaines et 3 mois d'implantation.

La figure 68 montre que les cellules endothéliales implantées ont conservé leur phénotype tout au long de l'expérimentation.

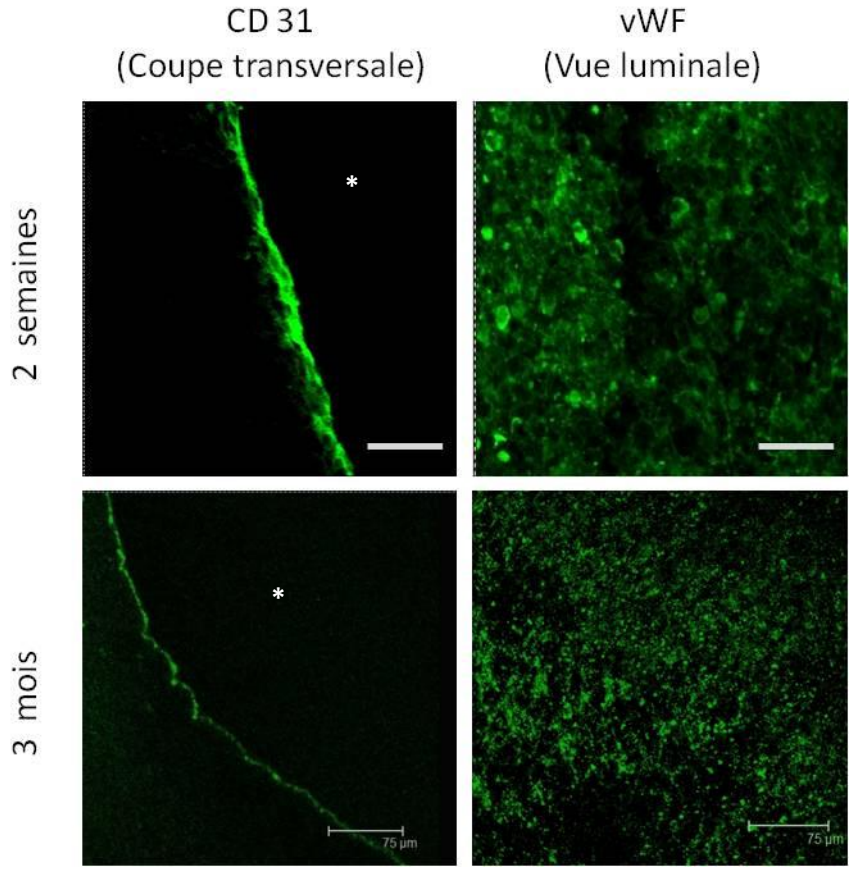


Figure 68 : **Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après 2 semaines et 3 mois d'implantation.** *10 lapins ont été implantés avec le substitut AOD+F+C+Ci. Ces substituts ont été explantés à 2 semaines et 3 mois post-implantation. Le phénotype des cellules bordant la lumière de l'artère a été évalué par immunomarquage du CD 31 (coupe transversale) et du vWF (vue luminale) et visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'astérisque indique la lumière vasculaire. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm.*

Des coupes longitudinales effectuées sur des substituts marqués pour le CD31, permettent d'observer en vue luminale l'alignement des cellules dans le sens du flux (figure 69). Les cellules endothéliales sont toutes orientées unidirectionnellement et alignées dans le sens du flux sanguin.

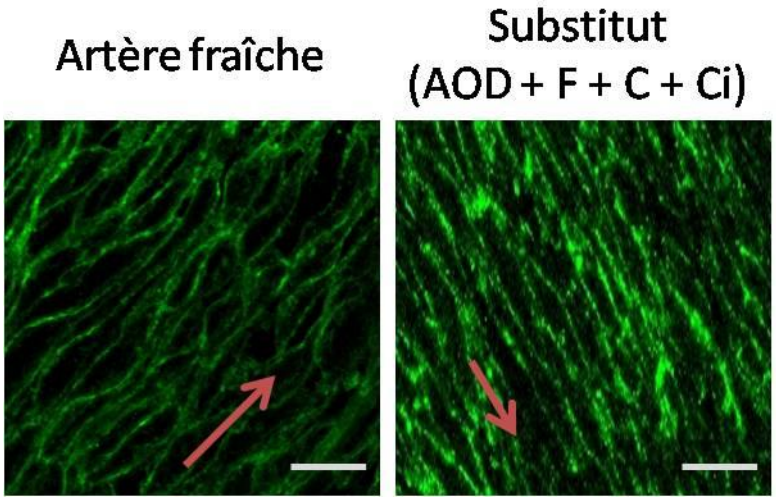


Figure 69 : **Morphologie des cellules endothéliales.** *5 substituts (AOD+F+C+Ci) ont été implantés chez le lapin et explantés à l'issue de 3 mois d'implantation. Le phénotype des cellules bordant la lumière de l'artère a été évalué par immunomarquage du CD 31 et visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). Les vues luminales permettent d'observer l'orientation des cellules dans le sens du flux sanguin. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 18 µm.*

• *Persistance du néo-endothélium*

Des CE ont été ensemencées dans la lumière du substitut avant son implantation sur le lapin. Afin de suivre le devenir cellulaire du néo-endothélium préformé *in vitro*, les CE ont été marquées à la PKH-26 avant leur ensemencement. Ce marquage membranaire permet de suivre les cellules pendant une durée qui peut atteindre 100 jours.

Jusqu'à 2 semaines après leur implantation, les cellules endothéliales forment un marquage régulier et sans discontinuité, suggérant leur persistance (figure 70). Au bout de 3 mois d'implantation, le marquage membranaire détecté est beaucoup plus faible et irrégulier.

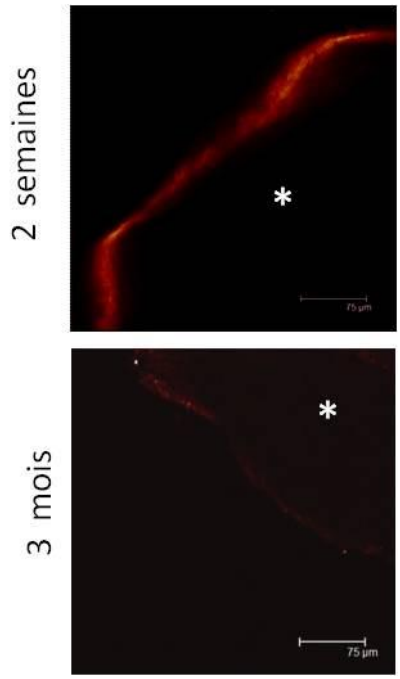


Figure 70 : **Evaluation de la persistance des cellules endothéliales ensemencées dans le substitut au cours de son implantation sur le lapin**. *La membrane des cellules endothéliales a été marquée à la PKH-26 de façon à pouvoir suivre la persistance cellulaire à la suite de l'implantation (8 lapins implantés). La détection a été réalisée en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne) sur des coupes transversales. L'astéristique indique la lumière vasculaire. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm.*

• *Evaluation de la structure de la paroi vasculaire par histologie*

L'évolution de la structure interne de la paroi vasculaire a été évaluée par histologie. Les réseaux de collagène et d'élastine ont été mis en évidence. La calcification éventuelle de la paroi a été recherchée à l'aide d'une coloration au Van Kossa.

La figure 71 présente la structure du substitut après 2 semaines et 3 mois d'implantation sur le lapin. La stucture pariétale de la carotide controlatérale et d'une artère ombilicale fraîche constituent les témoins et permettent de mettre en évidence l'évolution de la paroi du substitut. L'artère ombilicale sert de témoin à temps 0, alors que la carotide de lapin permet d'évaluer l'éventuel remodelage vasculaire du substitut en tenant compte de la nature élastique du vaisseau qu'il remplace.

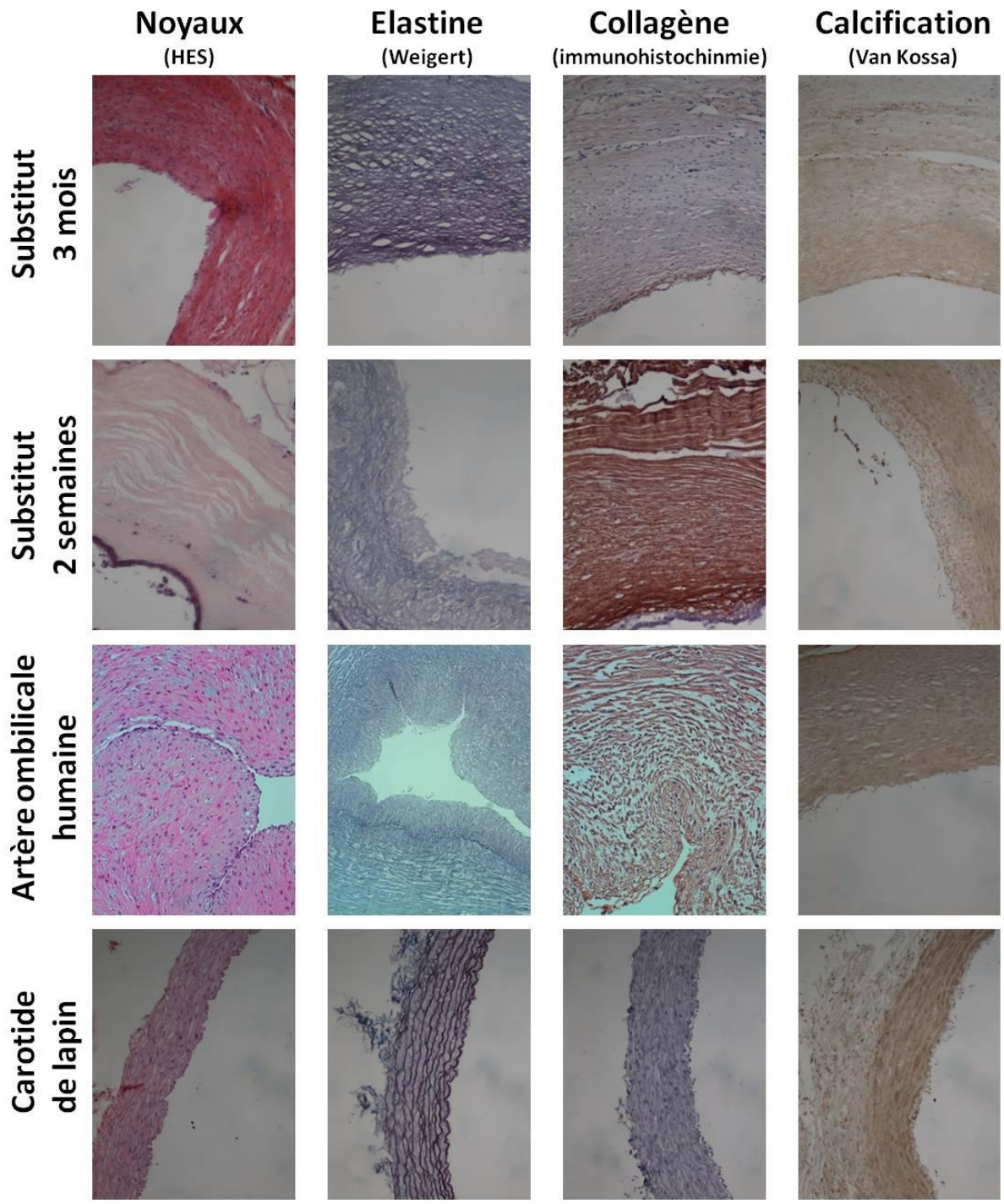


Figure 71 : **Coupes histologiques obtenues après explantation du substitut (AOD+F+C+Ci) implanté sur le lapin après 2 semaines et 3 mois d'implantation.** *Les noyaux ont été mis en évidence par coloration hématoxyline-éosine-safran, l'élastine par la coloration de Weigert, le collagène par immunohistochimie et la calcification par la coloration Van Kossa. 10 lapins ont été implantés. Les réseaux de collagène et d'élastine ne sont pas perturbés et aucune calcification n'est observée. Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 4.*

La structure du substitut semble conservée au cours du temps (figure 71). Aucun changement majeur dans la structuration de la matrice constituant la paroi n'est observé par rapport à une artère ombilicale fraîche. Le réseau de collagène est parfaitement conservé quelque soit la durée d'implantation. La distribution du réseau d'élastine n'a pas changé. La quantité d'élastine reste faible et aucun développement de ce réseau n'est constaté. Aucun remodelage, aucune transition du substitut vers un phénotype plus élastique n'est observé. De plus, le degré de calcification du substitut est comparable à celui observé pour le témoin.

La figure 71 montre une altération du film MPE au cours de l'implantation. A deux semaines d'implantation, le film MPE, mis en évidence en fuchsia par une coloration HES, est nettement visible le long de la lumière du substitut. Il est homogène et régulier tout le long de la paroi. A 3 mois d'implantation, le film MPE n'est plus détectable *via* la coloration hématoxyline-éosine-safran. Pour autant, la présence de CE est constatée le long de la lumière.

La figure 72 présente une coupe HES réalisée sur un substitut implanté 3 mois. La formation de structures concentriques au niveau périvasculaire est observée. Ces structures sont bordées par des cellules et renferment de petites structures anucléées de couleur rose fuchsia qui correspondraient à des globules rouges. Par conséquent, les structures cylindriques correspondraient ainsi à de petits vaisseaux néoformés que l'on pourrait assimiler à des *vasa vasorum*.

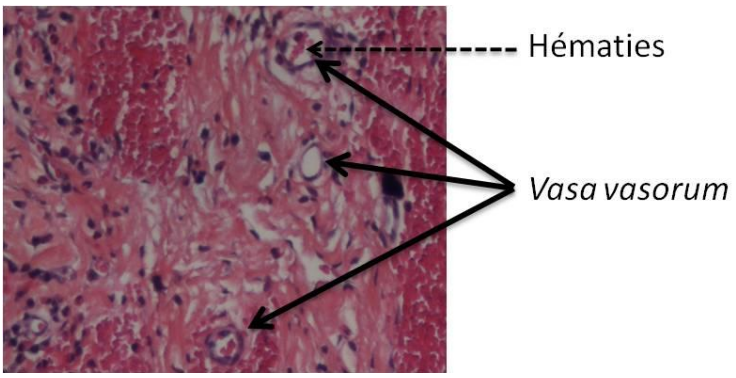


Figure 72 : **Coupe histologique montrant la formation de petits vaisseaux (*vasa vasorum*) au niveau des structures périvasculaires du substitut**. *La coloration hématoxyline-éosine-safran met en évidence la formation de structutres cylindriques renfermant des hématies colorées en rose fuchsia. Microscope inversé ; Olympus IX, Japon ; Objectif X 40.*

III.2. Discussion

Le maintien de la perméabilité des substituts vasculaires de petits calibres est un challenge. Divers recouvrements de surface ont été développés pour maintenir la lumière perméable. Plusieurs tentatives ont été faites en fixant des agents anti-coagulants tels que l'héparine, la colle biologique ou la fibrine (Chlupac et al., 2009). Cependant, aucun ne conduit à des résultats satisfaisants à long terme, principalement parce que l'efficacité de ces différents composants diminue très rapidement (demi-vie faible, dégradation rapide).

Grâce à ses propriétés intrinsèques, la reconstitution d'un endothélium semblable à celui présent dans les vaisseaux natifs sur la surface luminale des substituts vasculaires, constitue une voie prometteuse. En effet, un endothélium viable représente la meilleure surface anti-thrombogénique.

L'ingénierie vasculaire tente de recréer, avant implantation, un néo-endothélium sur des prothèses de petits calibres. En effet, l'autoendothélialisation est très lente chez l'homme, voire quasi inexistante, contrairement à ce qui se produit chez l'animal (Chlupac et al., 2009). Une étude réalisée sur des substituts explantés après le décès de patients montre l'apparition clairsemée de quelques îlots de CE sur des prothèses en Dacron® après 11 ans d'implantation (Shi et al., 1997). La progression de l'endothélialisation est extrêmement lente et se limite surtout aux sites péri-anastomotiques. L'autoendothélialisation obtenue chez l'humain est ainsi clairement insuffisante.

L'endothélialisation apparaît donc nécessaire pour le maintien de la perméabilité vasculaire des substituts de petit calibre. Ce concept a été expérimenté dès 1978 par Herring (Herring et al., 1978). Pour cela des cellules endothéliales de veine ont été ensemencées dans la lumière du substitut peu avant l'opération. Ce procédé permet d'augmenter la perméabilité des greffons, mais l'étude reste très controversée et critiquée, principalement à cause de la faible densité d'ensemencement (Bordenave et al., 1999).

Notre idée de départ fut d'endothélialiser notre matrice avec des cellules endothéliales primaires de lapin. Nous avons tenté d'en extraire à partir de veines jugulaires, de veines caves et d'aortes abdominales. Plusieurs méthodes furent testées parmi lesquelles :

- l'extraction mécanique ;

- la mise en culture d'explant d'intima ;

- l'extraction enzymatique par remplissage du vaisseau avec de la collagénase I et/ou de la trypsine. Il est important de préciser que cette méthode d'extraction nécessite de ligaturer minutieusement un à un tous les petits vaisseaux collatéraux afin d'obtenir un « tuyau d'un seul tenant ».

Seule cette dernière méthode nous a permis d'isoler des cellules endothéliales. Cependant, les cultures obtenues n'étaient pas pures et présentaient une contamination par des CML à hauteur de 30 % minimum en passage 0. Nous avons essayé de purifier ces cellules à l'aide de billes magnétiques. Toutefois ces tentatives ne s'avérèrent pas concluantes, principalement parce que la purification de CE de lapin nécessite, pour des raisons d'espèces, de réaliser un marquage cellulaire indirect, diminuant ainsi le degré de purification de la population de cellules récoltées.

Dans l'impossibilité d'obtenir une culture primaire pure de CE de lapin, notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de cellules endothéliales primaires de veines ombilicales humaines : les HUVEC.

Le challenge principal était de bien faire adhérer les CE pour qu'elles puissent résister lors du rétablissement du flux sanguin. Pour cela, des techniques aussi diverses que la fibrine, l'héparine ou la nanostructuration des surfaces ont été expérimentées (de Mel et al., 2008; Fernandez et al., 2001; Filova et al., 2009). Nous avons choisi d'utiliser des films MPE $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$.

Avant implantation, le substitut désendothélialisé fonctionnalisé par un film MPE et ensemencé avec des CE a été cisaillé de façon à préconditionner les cellules dans le sens du flux sanguin. Un cisaillement de 1 Pa a été imposé aux substituts endothélialisés. Cette valeur correspond aux valeurs moyennes de cisaillement retrouvées dans les artères humaines (Turner et al., 2006). La durée de cisaillement est de 3h comme décrit par l'équipe de Fernandez, en 2001 (Fernandez et al., 2001). Après cisaillement, le substitut a été immédiatement implanté sur le lapin.

La perméabilité des greffons a été évaluée par écho-Doppler. Cet examen non invasif a permis d'estimer la vitesse du sang dans le substitut et ainsi d'en déduire son diamètre. Les résultats montrent une constance dans la vitesse du sang tout au long de l'expérimentation, vitesse qui reste proche de celle détectée dans la carotide témoin controlatérale. Ces mesures

ont été pratiquées sur des lapins vigiles maintenus en position dorsale, le cou en extension, afin d'éviter tout biais de mesure induit par un éventuel anesthésique ou relaxant administré aux lapins. Dans les premières semaines après l'implantation, nous nous sommes particulièrement appliqués à créer une atmosphère sereine et propice à la manipulation des animaux, de façon à permettre une bonne reproductibilité des mesures. L'homogénéité des résultats nous indique que les mesures se sont déroulées dans des conditions satisfaisantes.

Les valeurs moyennes de flux sanguin mesurées dans le greffon (65 cm/s) correspondent à celles observées chez une personne d'environ 60 ans, représentative de la population susceptible de recevoir une greffe vasculaire. Cette observation confirme la validité de notre substitut pour un transfert potentiel de cette technologie chez l'homme

Le diamètre du substitut reste constant au cours de son implantation et proche de celui d'un vaisseau natif. Les valeurs de diamètre du substitut sont en corrélation avec les valeurs de vélocité du flux sanguin mesurées. En effet, plus le diamètre du vaisseau considéré est petit, plus la vitesse d'écoulement est grande, ce qui est en accord avec la relation liant la vélocité, le diamètre et le débit : $Vélocité\ (cm/s) = \frac{\text{Débit } (cm^3)}{\text{Diamètre } (cm^2)}$

Aucune dilatation, anévrisme ou rétrécissement n'est observé.

Les coupes histologiques mettent en évidence la persistance de cellules au niveau de la lumière. Les études en microscopie confocale à balayage laser ont permis de mettre en évidence que ces cellules présentaient un phénotype endothélial et qu'elles étaient parfaitement alignées dans le sens du flux sanguin, preuve que le greffon est positionné correctement sans occasionner de grande perturbation de ce flux.

La formation de néo-vaisseaux à proximité de l'adventice a également pu être observée à l'issue de 3 mois d'implantation. Ces petits *vasa vasorum* démontrent la bonne intégration du substitut dans la vasculature. Les *vasa vasorum* permettent de nourrir et d'oxygéner les cellules vasculaires du substitut, ainsi que d'assurer et de maintenir la fonctionnalité et l'intégrité du greffon (Galili et al., 2004). L'absence de ces petits vaisseaux est une limite majeure en ingénierie vasculaire, pouvant constituer l'une des causes de l'échec des greffes. Ces *vasa vosorum* sont confinés au niveau de l'adventice, comme sur les

carotides natives de lapin (Barker et al., 1992). De nombreuses techniques sont actuellement à l'étude afin de permettre leur développement préalablement à l'implantation des substituts (Rivron et al., 2008). Si leur développement présente un avantage certain, il reste à démontrer que ce processus n'est pas espèce-dépendant.

La problématique majeure liée à l'ensemencement de CE dans le substitut préalablement à l'implantation est de savoir si les cellules détectées après explantation correspondent à celles qui ont été ensemencées préalablement à l'implantation des greffons. Pour répondre à cela, la membrane des CE a été marquée par la PKH-26 avant leur ensemencement. Les observations effectuées en microscopie confocale montrent une persistance des cellules à 2 semaines d'implantation. Le marquage est alors longitudinal, homogène et régulier. Après 3 mois d'implantation, le marqueur membranaire est faiblement détecté, mais témoigne d'une persistance des CE ensemencées.

Dans une étude parue dans *Nature Medicine* en 2001, Kaushal et son équipe se sont intéressés au devenir du néo-endothélium (pré-formé *in vitro*) dans leur substitut après 130 jours implantation (Kaushal et al., 2001). Pour cela, une artère a été pré-endothélialisée avec des cellules endothéliales-*like* marquées avec un traqueur cellulaire, puis implantée sur le mouton. Les analyses ont montré une persistance de ce néo-endothélium. La surface couverte par les cellules pré-implantées est estimée à 80 % à 15 jours d'implantation et seulement 10 % à 130 jours d'implantation. Nos résultats s'inscrivent dans cette problématique, puisque l'intensité de la fluorescence des cellules marquées à la PKH-26 diminue à 3 mois d'implantation. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations :

- une partie des CE implantées a été remplacée par des cellules de l'hôte (le lapin).

Au cours de l'endothélialisation naturelle observée chez l'animal, celle-ci commence par les sites péri-anastomotiques et se poursuit progressivement sur plus de 5 mois vers le centre du substitut (Chlupac et al., 2009). Or, le marquage observé ici est faible, non seulement au niveau des sites péri-anastomotiques, mais aussi au niveau de zones plus centrales du greffon. Quelque soit le site où l'observation est faite, la fluorescence est la même, ce qui tend à minimiser cette hypothèse.

- les CE marquées se sont divisées, ce qui a entraîné la « dilution » progressive du marqueur et la perte de la fluorescence à chaque division cellulaire; les cellules présentes sont donc des cellules filles des cellules ensemencées et non des cellules de l'hôte.

- la notice d'utilisation de la PKH-26 précise une stabilité de ce marqueur jusqu'à 100 jours. *In vitro*, des études mettent en évidence une forte diminution de l'intensité de marquage au bout de 60 jours de culture de cellules marquées (Fox et al., 1999). Or, la durée d'implantation est ici de 92 jours, durée limite de détection de la PKH-26.

Des études sont en cours pour déterminer ce qu'il advient des CE ensemencées. Deux pistes ont été envisagées :

- explanter les greffons à durée intermédiaire, afin d'observer le devenir du marquage ;
- implanter des substituts ensemencés avec des HUVEC transfectées à la GFP (*green fluorescent protein*).

L'originalité de notre travail repose sur l'utilisation de matériaux biologiques d'origine humaine, contrairement à ceux de Kaushal et son équipe (Kaushal et al., 2001) portant sur le mouton. L'utilisation de cordons ombilicaux humains, considérés du point de vue légal comme des « déchets opératoires », constitue une source artérielle et cellulaire facilement disponible et traçable. Par ailleurs, nous avons choisi de développer un substitut possédant une structure matricielle la plus proche possible des vaisseaux à ponter. C'est pourquoi nous avons opté pour le développement d'un modèle à partir d'artères et non de veines. En effet, il a été montré qu'une greffe artérielle est meilleure qu'une greffe veineuse, notamment du fait de ses excellentes caractéristiques mécaniques. L'utilisation de matrices artérielles d'origine humaine constitue donc une avancée majeure vers une application véritablement clinique.

Nos greffons ont été recouverts de film MPE. Ce film MPE n'est plus détectable histologiquement après 3 mois d'implantation. Des études réalisées au laboratoire sur des films $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$, construits avec des solutions de polyélectrolytes marquées avec des fluorochromes, ont montré une persistance du film MPE, même après 3 mois d'implantation (Kerdjoudj et al., 2008). Il semblerait cependant que la structure du film soit perturbée et que sa stabilité se détériore au cours du temps. Des études histologiques en collaboration avec le CIT de Bordeaux sont actuellement en cours afin de déterminer l'impact de la dégradation du film sur les organes vitaux majeurs du lapin (cœur, foie, rate, rein et ganglion lymphatique axillaire).

La conservation des réseaux de collagène et d'élastine ainsi que l'absence de calcification et de réaction inflammatoire montrent que la structure du substitut est

satisfaisante et qu'aucune atteinte structurelle majeure n'entâche ni son fonctionnement, ni sa perméabilité. Par ailleurs, l'absence de minéralisation témoigne de la bonne tolérance du greffon. L'intégrité de la MEC semble ainsi conservée.

Aucun signe histologique et clinique de rejet n'a été observé. Les lapins restent en bonne santé pendant toute la durée de l'expérimentation. Une prise de poids normale comprise entre 5 et 10 % a été observée pendant leur séjour de 3 mois à l'animalerie et la plaie cicatrise normalement. L'absence de rejet observée dans notre expérimentation est à mettre en perspective avec les observations faites par une équipe américaine à la fin des années 1970. Cette équipe californienne implanta sur 58 chats des segments d'artère ombilicale humaine de 3 à 5 cm de long (Mehdorn, 1978). La majorité de ces artères restèrent perméable malgré la différence d'espèce. A l'époque, la bonne acceptation de ces greffes surprit les auteurs mais aucune explication ne fut avancée. L'origine de cette observation trouve sans doute son explication dans le stade d'immaturité précoce du tissu dont les artères sont issues.

Enfin, il est important de préciser que la résistance à la suture des greffons est excellente. Le greffon ne se déchire pas. De même, la résistance aux infections est bonne.

III.3. Conclusion

L'évaluation *in vivo* de nos substituts a montré que les films MPE constituaient un excellent outil permettant l'endothélialisation des substituts vasculaires de petit calibre. Le cisaillement du néo-endothélium avant son implantation permet sa stabilisation et favorise sa persistance après implantation, propriétés qui sont responsables de la bonne perméabilité à long terme et du maintien du diamètre du substitut sans signe ni de sténose, ni de dissection ou de dilatation. La persistance du néo-endothélium préformé et cisaillé pré-implantation ainsi que la formation de *vasa vasorum* en fait un substitut prometteur pour de futures applications cliniques.

Cette étude était fondamentale pour valider notre protocole d'adhésion/rétention des CE. Comme nous l'avions annoncé précédemment, le but de notre travail est de fabriquer un greffon vasculaire autologue. L'étape suivante sera de mettre en place un substitut endothélialisé à partir de cellules souches circulantes.

IV. Endothélialisation de la matrice artérielle par des cellules progénitrices endothéliales : évaluation *in vitro* et *in vivo*

IV.1. Résultats expérimentaux

Des artères ombilicales désendothélialisées et fonctionnalisées par des films MPE ont été ensemencées avec des EPC de lapin. Deux méthodologies distinctes ont été employées :

- isolement des EPC et différenciation *in vitro* en CE-*like*. Après amplification, les CE-*like* en passage 3 sont ensemencées dans la lumière des artères fonctionnalisées par le film MPE ;

- isolement des cellules mononucléées et ensemencement des cellules obtenues directement dans la lumière de la matrice fonctionnalisée, afin d'obtenir une différenciation *in situ* des EPC en CE-*like* sur la surface luminale de la matrice recouverte par un film MPE.

La première méthode consistant à ensemencer des cellules endothéliales-*like* (CE-*like*), provenant de la différenciation *in vitro* des EPC, est la méthode la plus optimisée. C'est pourquoi, les résultats présentés ci-dessous portent essentiellement sur les artères ensemencées avec des CE-*like*.

IV.1.1. Caractérisation *in vitro*

IV.1.1.1. Cellularisation à l'aide de cellules endothéliales-*like*

a. Evaluation du recouvrement cellulaire

• *Evaluation histologique de l'adhésion cellulaire*

L'adhésion des cellules ensemencées dans la lumière de l'artère a été évaluée par coloration HES. La figure 73 montre la présence d'une monocouche de cellules sur la surface luminale de l'artère désendothélialisée recouverte de film MPE. Cette monocouche cellulaire est régulière, uniforme et nucléée.

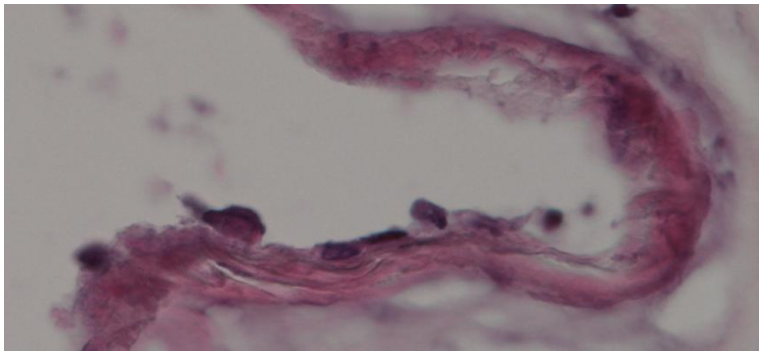


Figure 73 : **Coupes histologiques des artères désendothélialisées recouvertes de film MPE et ensemencées avec des CE-*like*.** *Après inclusion et coupe transversale, les artères ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran afin de visualiser les cellules présentes sur la surface luminale. Des cellules bordant la lumière artérielle sont observées. n = 3 artère ; Microscope inversé Olympus IX, Japon ; Objectif X 40.*

• *Evaluation du phénotype cellulaire par microscopie confocale*

Le phénotype des cellules ayant adhéré sur la surface luminale a été caractérisé. L'expression du CD31 et du vWF a été étudiée par marquage immunologique et visualisé en microscopie confocale à balayage laser.

La figure 74 montre l'expression du CD31 et du vWF par les cellules présentes sur la surface luminale de l'artère. Les cellules semblent donc de phénotype endothélial. La régularité et l'homogénéité du marquage confirment une endothélialisation régulière de l'artère.

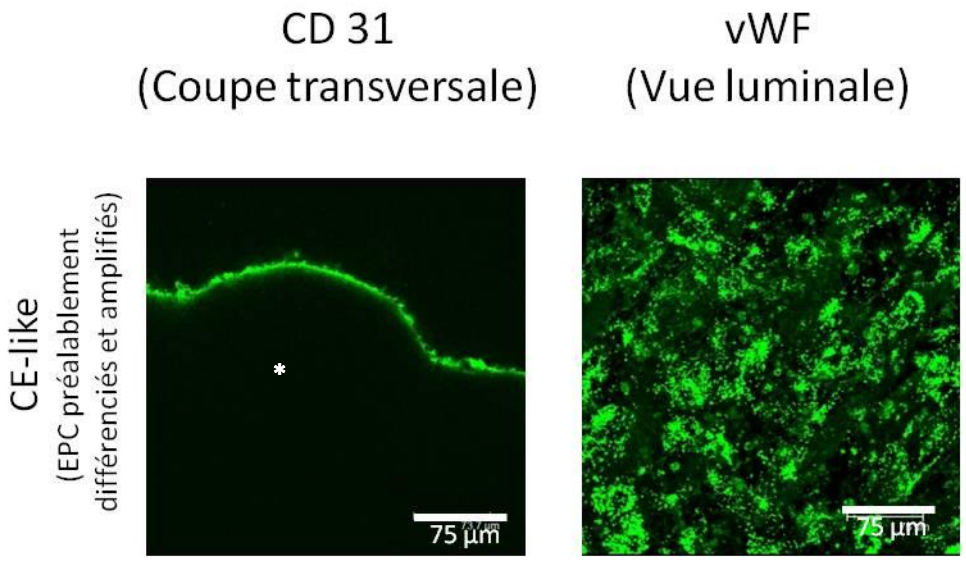


Figure 74 : **Observation en microscopie confocale du phénotype cellulaire des CE-*like* ensemencées dans les artères désendothélialisées fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes.** *Le phénotype des cellules longeant la lumière de l'artère a été évalué par immunomarquage du CD 31 et du vWF et visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'étoile indique la lumière vasculaire. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3 artères.*

b. Evaluation de la rétention des cellulles endothéliales-*like* en condition dynamique

Après une semaine de culture, les artères endothélialisées par des CE-*like* ont été soumises à cisaillement de 1Pa pendant 1h, afin d'évaluer la rétention cellulaire sur l'artère ombilicale recouverte du film MPE. Les vaisseaux ont ensuite été analysés en microscopie confocale *via* les immunomarquages du CD31 et du vWF.

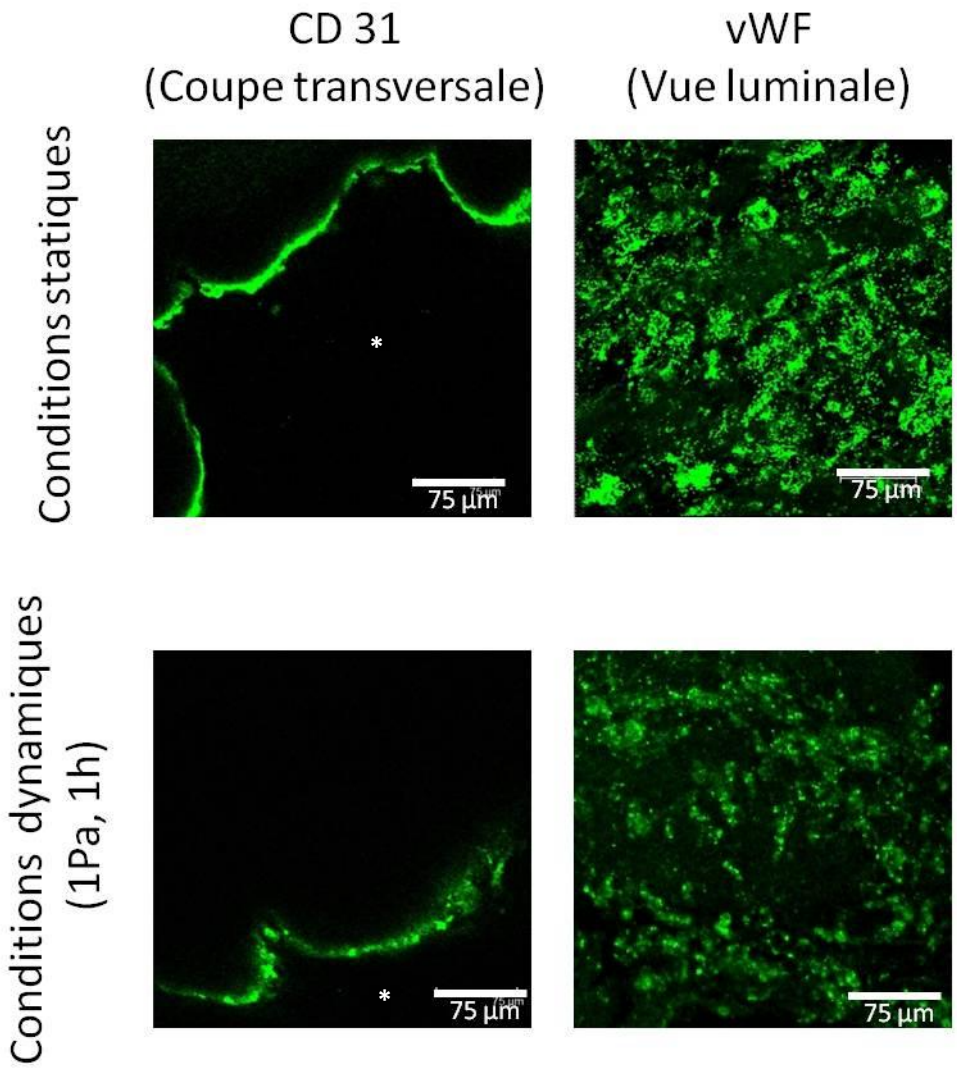


Figure 75 : **Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après cisaillement.** *Les substituts ont été endothélialisés avec des CE-like en P3. Le phénotype endothélial des cellules a été évalué par immunomarquage du CD 31 et du vWF et visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'étoile situe la lumière vasculaire. Objectif X 40, ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3.*

Les observations du CD31 effectuées en coupe transversale montrent un signal linéaire et continu (figure 75), comparable au signal observé pour le témoin en condition statique. De même, l'expression du vWF présente un signal homogène et régulier (figure 75) comparable à celui observé pour le témoin statique. Par ailleurs, les immunomarquages du CD31 et du vWF obtenus pour le substitut cisaillé sont comparables à ceux observés pour une artère fraîche (figure 53).

IV.1.1.2. Cellularisation à l'aide de cellules mononucléées

Dans une deuxième étape, des cellules mononucléées (provenant directement de la séparation sur gradient de densité) ont été ensemencées dans la lumière de la matrice préalablement désendothélialisée et fonctionnalisée par un film MPE. Le phénotype des cellules ayant adhéré sur la surface luminale a été analysé par immunomarquage du CD31 et du vWF visualisé en microscopie confocale à balayage laser.

La figure 76 montre que les cellules ayant adhéré sur la surface luminale expriment les marqueurs endothéliaux. Cependant, le marquage est irrégulier. Le tapis endothélial formé par n'est pas continu et présente des « spots » dépourvus de cellules. La surface endoluminale recouverte par les EPC différenciés en CE-*like* est de l'ordre de 70 % de la surface totale.

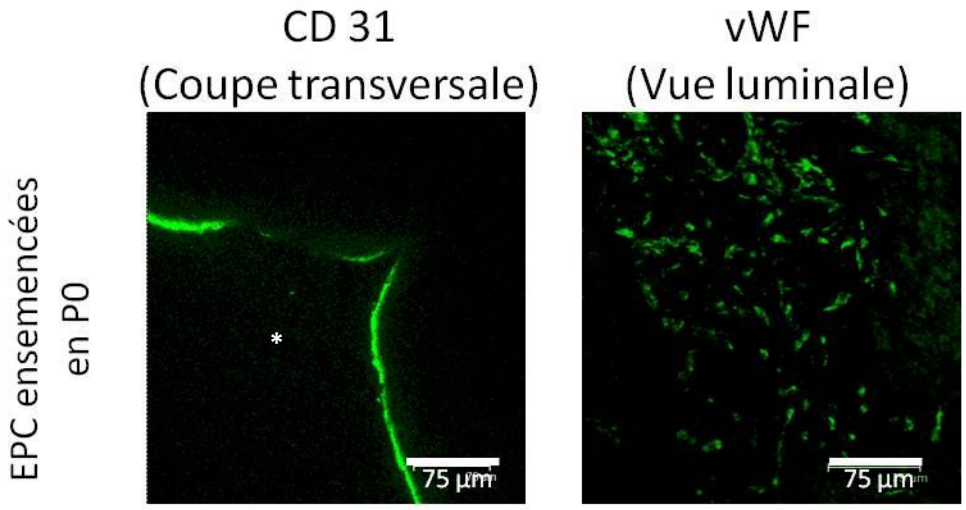


Figure 76 : **Observation en microscopie confocale du phénotype des cellules ensemencées dans les artères désendothélialisées fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes.** *Le phénotype des cellules longeant la lumière de l'artère a été évalué par immunomarquage du CD 31 et du vWF visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'étoile situe la lumière de l'artère. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm ; n = 3 artères.*

L'endothélialisation n'étant pas satisfaisante pour les substituts ensemencés directement avec des cellules mononucléées, une modification du protocole est nécessaire et a été programmée, mais ne fera pas l'objet de ce travail. C'est pourquoi seuls les substituts cellularisés avec des CE-*like* seront soumis à évaluation *in vivo*.

IV.1.2. Caractérisation *in vivo*

La perméabilité du substitut « cisaillé » obtenu à partir de CE-*like* a été évaluée *in vivo*. Pour cela, il a été implanté au niveau de la carotide de lapin de la même façon que décrit pour le substitut à base de CE matures.

• *Evaluation de la perméabilité par écho-Doppler*

Dans la limite du temps imparti pour réaliser ce travail, les substituts ont été implantés 1 mois. Les substituts à base de CE-*like* sont perméables à 1 mois après leur implantation. Un exemple de tracé obtenu en écho-Doppler est donné en figure 77.

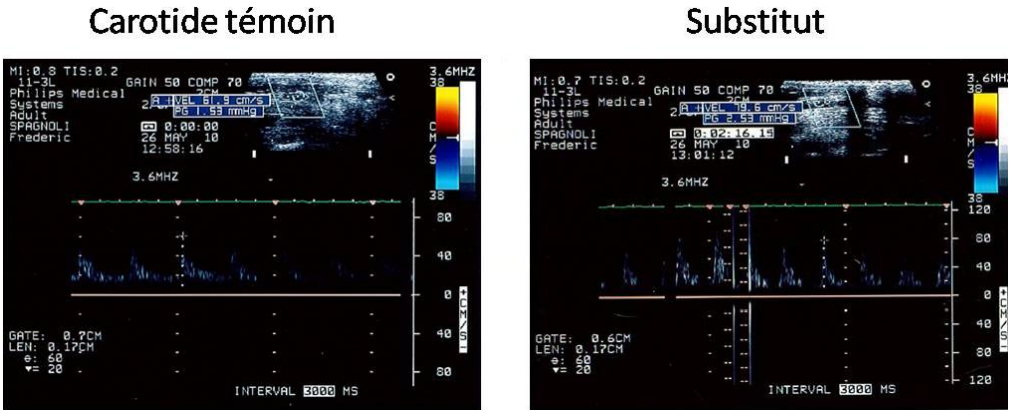


Figure 77 : **Tracés obtenus par écho-Doppler après 4 semaines d'implantation.** *Les écho-Doppler ont été réalisés sur des lapins vigiles maintenus en position dorsale à chaque mesure.*

• *Evaluation de la vitesse et du diamètre du substitut en présence de CE-like*

Le tableau XVII présente les valeurs de vitesse du flux sanguin relevées par écho-Doppler, ainsi que le diamètre des vaisseaux. La vitesse du flux sanguin dans le substitut reste proche de celle observée pour la carotide témoin controlatérale. De même, le diamètre du substitut et de la carotide témoin sont du même ordre de grandeur. Ceci suggère qu'il n'y a pas eu apparition de thrombus.

Tableau XVII : **Vitesse du flux sanguin et diamètre interne du substitut à 4 semaines d'implantation.** *La vitesse du sang et le diamètre des vaisseaux ont été déterminés par écho-Doppler. La carotide native controlatérale sert de témoin.*

	Vitesse du flux sanguin	Diamètre du vaisseau
Substitut	79,6 cm/s	3,6 mm
Carotide native controlatérale	62 cm/s	4,1 mm

IV.1.3. Caractérisation post-explantation

Après un mois d'implantation, l'animal a été sacrifié et le substitut, ensemencé avec des CE-*like,* prélevé et analysé.

• *Aspect macroscopique du substitut ensemencé avec des CE-like*

Après explantation, le greffon présente une structure circulaire régulière (figure 78). La lumière demeure parfaitement dégagée et aucun thrombus ne semble formé. Par ailleurs, la paroi du substitut ne présente aucun signe de dilatation ou de dissection.

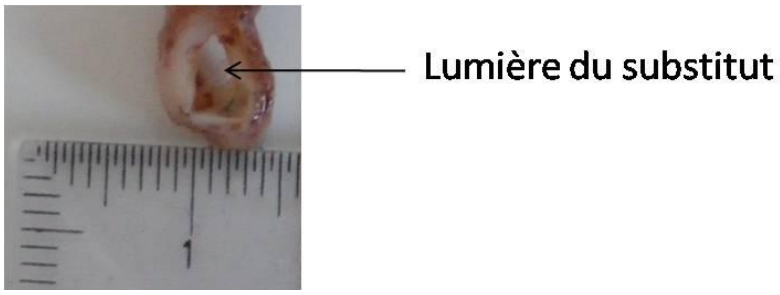


Figure 78 : **Aspect macroscopique du substitut cellularisé avec des CE-*like* après 4 semaines d'implantation (coupe transversale).** *Le substitut en présence de CE-like demeure perméable à 4 semaines d'implantation au niveau d'une carotide de lapin.*

• *Caractérisation du phénotype cellulaire du substitut ensemencé avec des CE-like*

Le phénotype des cellules bordant la lumière du substitut a été analysé par microscopie confocale. La figure 79 montre ainsi la présence de marqueurs typiquement endothéliaux. En effet, le marqueur CD31 est clairement détecté. Il forme un liseré continu sur toute la surface endoluminale. Les cellules bordant la lumière sont donc des cellules de phénotype endothélial. Le vWF, quant à lui, est détecté mais son expression n'est pas homogène sur toute la surface de l'artère.

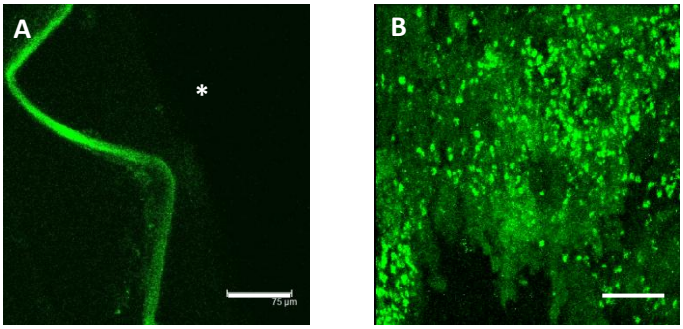


Figure 79 : **Evaluation du phénotype des cellules présentes sur la surface luminale du substitut après 4 semaines d'implantation.** *Les substituts ont été explantés 4 semaines après leur implantation. Le phénotype endothélial des cellules longeant la lumière a été évalué par immunomarquage du CD 31 (A) et vWF (B) et visualisé en microscopie confocale à balayage laser (AOBS, sp2, Leica, Allemagne). L'étoile indique la lumière vasculaire. Objectif X 40 ; ouverture numérique 0,8 ; barre d'échelle = 75 µm.*

IV.2. Discussion

Une approche alternative pour la conception de vaisseaux de petit calibre est d'utiliser une matrice naturelle décellularisée ou biodégradable endothélialisée. L'endothélialisation des substituts vasculaires constitue un enjeu majeur pour le maintien de la perméabilité à long terme de tels substituts. Le développement d'un néoendothélium sur la surface luminale de ces prothèses constitue une avancée technologique majeure dans le domaine de l'ingénierie vasculaire.

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'il était possible de créer un substitut vasculaire de petit calibre perméable à long terme (3 mois), grâce à la reconstitution d'un néo-endothélium. L'obtention d'une monocouche endothéliale homogène est permise par l'ensemencement de CE matures à l'intérieur de la lumière. Ce qui serait souhaitable dans le cadre d'une application clinique, c'est l'endothélialisation d'une prothèse par des cellules matures autologues. Ceci sous-tend :

- le prélèvement, chez le patient d'au moins un vaisseau en bon état, de façon à permettre l'isolement de CE pour endothélialiser la greffe ;

- l'amplification *in vitro* de CE matures, avec l'inconvénient que cette étape est souvent associée à un risque de dédifférenciation et de perte de phénotype.

Ces deux arguments, d'importance majeure, nous ont poussés à optimiser le « *process* » d'endothélialisation de notre substitut, et plus particulièrement à développer une autre source cellulaire autologue capable de générer un néo-endothélium.

Nous nous sommes ainsi orientés vers les cellules progénitrices endothéliales. Deux raisons importantes ont guidé notre choix :

- disponibles dans le sang périphérique, les EPC constituent une source cellulaire facilement disponible ;

- les EPC se différencient plus rapidement en CE sur un support recouvert de film MPE (Berthelemy et al., 2008).

Deux approches ont été envisagées. Tout d'abord, les EPC ont été isolés, différenciés et amplifiés *in vitro* en CE-*like* avant leur ensemencement dans la lumière de la matrice recouverte de film MPE. Les résultats d'histologie et de microscopie confocale ont montré la formation d'un néo-endothélium homogène sur toute la surface luminale.

En parallèle, nous avons tenté de raccourcir le délai imputé à la phase d'expansion *in vitro* des cellules, de façon à permettre le développement rapide d'une prothèse endothélialisée. Pour cela après leur isolement, les cellules mononucléées ont été directement ensemencées dans la matrice artérielle recouverte du film MPE.

Le principal challenge a ainsi été d'adapter la concentration cellulaire afin d'ensemencer suffisamment de progéniteurs pour permettre le bon développement d'un endothélium. Par ailleurs, il a été nécessaire d'optimiser le temps d'agitation des prothèses immédiatement après endothélialisation pour répartir de façon homogène les EPC sur leur surface. Une prothèse endothélialisée a ainsi été obtenue dès 3 semaines après la mise en place des cellules. Les analyses effectuées montrent la formation d'un néo-endothélium dans la lumière, même si l'optimisation et l'amélioration de la méthode restent requises pour obtenir une monocouche régulière directement à partir de l'ensemencement des EPC dans la lumière du substitut.

La résistance du néo-endothélium après application de contraintes de cisaillement a été évaluée. Grâce à la présence du film MPE, l'intégrité du néo-endothélium est maintenue, même au cours d'un cisaillement reproduisant les contraintes physiologiques imposées par le sang le long d'un endothélium natif des vaisseaux.

La fonctionnalité du substitut a été évaluée *in vivo* sur le lapin, dans les mêmes conditions que décrites dans le chapitre précédent, à l'exception de la durée d'implantation. Les substituts à base de CE-*like* ont été implantés 1 mois, non pas pour des raisons restrictives liées à l'occlusion des substituts au-delà de cette durée, mais principalement pour des contraintes de temps.

La perméabilité est ainsi maintenue pendant 1 mois post-implantation et le diamètre du substitut est conservé : absence de sténose, de dissection ou de dilatation. De plus, la présence de cellules de type endothélial est confirmée par microscopie confocale.

L'endothélialisation de substituts décellularisés a été beaucoup décrite dans la

littérature. Il semblerait ainsi que l'endothélialisation de prothèses par des CE-*like* provenant d'EPC constitue une voie de recherche pleine de promesses.

Diverses techniques ont été développées pour permettre la rétention des cellules endothéliales-*like*. Parmi celles-ci, la transfection des EPC par le gène A20 responsable de la transcription de eNOS, semble favoriser la perméabilité des greffons (Zhu et al., 2008). Cependant cette technologie impose une manipulation génétique des cellules. L'inocuité du transgène étant difficile à démontrer, le devenir de cette étude reste plus qu'incertaine pour une application clinique.

Ranjan et son équipe ont développé un substitut synthétique endothélialisé avec des EPC (Ranjan et al., 2009). Cependant, leur étude se limite à l'évaluation *in vitro* des prothèses développées.

Il en est de même pour de nombreuses autres études de ce type qui se bornent à des évaluations *in vitro* n'intégrant pas les paramètres physiologiques et les autres stimuli rencontrés *in vivo* (Berard et al., 2009; Ranjan et al., 2009; Thebaud et al., 2010).

D'autres équipes proposent de recouvrir la surface endoluminale de prothèses avec des substances permettant l'endothélialisation *in situ* du substitut après implantation (Chong et al., 2010; Miyazu et al., 2010; Yin et al., 2008; Yin et al., 2009). Malgré les résultats prometteurs, ces substituts ne sont pas fonctionnels au moment de l'implantation et un risque important de thrombose précoce subsiste.

L'originalité de notre substitut repose sur l'utilisation conjuguée d'un revêtement de surface doué d'une capacité de rétention cellulaire élevée et d'un préconditionnement des CE-*like* au flux sanguin. Le substitut ainsi obtenu est fonctionnel, d'où un risque de thrombose limité. L'avantage majeur est qu'il est d'origine autologue et prêt à être implanté.

De plus, notre technique possède l'avantage de recourir à des traitements simples, peu coûteux et très efficaces pour la promotion de l'endothélialisation luminale. Enfin, l'implantation de notre substitut sur l'animal a permis de montrer la validité de notre concept dans des conditions physiologiques.

IV.3. Conclusion

Nous avons démontré qu'il était possible d'endothélialiser des prothèses d'origine naturelle de faible diamètre et fonctionnalisées par des films MPE, par des CE-*like* provenant de la différenciation d'EPC de sang périphérique, pouvant être d'origine autologue. Les expérimentations menées *in vitro* sont confirmées par les expérimentations animales. Les expérimentations *in vivo* démontrent la perméabilité du substitut que nous avons conçu.

Ces résultats très encourageants ouvrent de nombreuses perspectives pour l'ingénierie des vaisseaux de petits calibres (banque de prothèse).

Conclusions et Perspectives

Les maladies vasculaires représentent l'une des premières causes de mortalité dans les pays occidentaux. Parmi ces pathologies, l'athérosclérose, dont l'étiologie n'est pas encore totalement élucidée, est une maladie systémique touchant l'ensemble de l'arbre vasculaire et conduisant *in fine* à l'obstruction des vaisseaux. A l'heure actuelle, les traitements disponibles ne permettent que de remédier aux manifestations symptomatiques, mais n'enrayent aucunement le développement lent et progressif de la maladie. Le remplacement d'un vaisseau lésé par un greffon vasculaire constitue aujourd'hui un acte chirurgical de dernier recours, dans lequel le choix du substitut se base sur la nature du vaisseau à remplacer. Mais, quelque soit la nature du vaisseau, sa substitution par un vaisseau autologue est généralement la meilleure solution. Cependant, ce genre de greffe est impossible pour plus d'un tiers des patients.

Pour palier l'absence de disponibilité des vaisseaux autologues, un grand choix de prothèses vasculaires est disponible. Pourtant, aucune n'est adaptée au remplacement des vaisseaux de petits calibres, alors que l'augmentation de la fréquence des pathologies cardiovasculaires associée aux limites des thérapies curatives actuelles engendrera au cours des prochaines décennies, des besoins importants en substituts vasculaires pour le remplacement d'artères de faibles calibres.

Dans ce travail, nous avons développé un substitut vasculaire de petit diamètre endothélialisé et préconditionné par cisaillement. Trois éléments originaux et bien distincts entrent dans la conception de ce substitut :

- une matrice naturelle choisie pour sa disponibilité et ses bonnes propriétés mécaniques : les artères ombilicales ;

- un revêtement de surface retenu pour sa capacité à permettre une forte adhésion cellulaire : le films MPE $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH ;

- une source cellulaire préférée pour son phénotype endothélial : les cellules endothéliales matures et les cellules progénitrices endothéliales.

Le cahier des charges du substitut vasculaire idéal de petit calibre est strict et contraignant. Les expertises menées dans ce travail ont montré que nos substituts répondaient à ces critères d'exigence. La formation et la persistance du néoendothélium, permises par le recouvrement préalable de la surface endoluminale par des films MPE, ont contribué d'une

façon majeure, au maintien de la perméabilité vasculaire. Le diamètre interne vasculaire reste constant et la composition de la paroi montre la persistance de l'endothélium à la suite de l'implantation *in vivo*.

En accord avec les recommandations édictées par le *Collège National de Chirurgie et de Médecine Vasculaire* et au vu de sa bonne bonne résistance à la suture et au sepsis, le substitut que nous avons développé constitue donc une avancée majeure pour l'ingénierie tissulaire des vaisseaux de petits calibres.

Nos résultats ouvrent de très larges perspectives dans le domaine des allogreffes vasculaires, d'autant plus que nous avons démontré qu'il était possible d'endothélialiser la surface luminale avec des progéniteurs endothéliaux circulants.

Afin d'envisager un transfert de technologie de notre concept en milieu hospitalier, il est indispensable de mieux caractériser les cellules (CE mais aussi CML) qui constituent le greffon après implantation, ainsi que de déterminer le devenir du film MPE. De plus, une expérimentation animale plus codifiée sur un échantillon plus important d'animaux est absolument nécessaire. En outre, comme l'exige la réglementation relative aux autorisations de mise sur le marché (AMM) des produits de thérapie innovante, il convient de réaliser des tests précliniques sur de plus gros animaux, tels que le porc ou le mouton.

Par ailleurs, le besoin clinique de prothèses de grande longueur (30 cm) pour la revascularisation des artères sous-inguinales nécessite l'adaptation de notre technique d'endothélialisation à des prothèses de longeur plus importante, principalement en terme d'oxygénation et de diffusion des nutriments.

De plus, l'utilisation d'une matrice à base d'artère ombilicale humaine, permettant de proposer aux cliniciens un greffon vasculaire naturel, réactif et non immunogène, requiert la mise en place de banques de tissus adaptées à la conservation des artères ombilicales, à l'instar de la banque de tissus BioProtec®. Les banques de tissus mises en place devront être soumises à des autorisations délivrées par l'Afssaps, autorité de tutelle, et répondre à des obligations de moyens techniques et humains principalement décrits par l'arrêté du 29 décembre 1998.

Enfin, l'endothélialisation de ce type de substitut vasculaire avec des cellules progénitrices de sang périphérique humain ou de sang de cordons ombilicaux constitue une étape indispensable à toute application clinique future.

Références

Bibliographiques

Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. 1987. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. J Vasc Surg 5(2):376-382.

Advincula R, Aust E, Meyer W, Knoll W. 1996. In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy. Langmuir 12(15):3536-3540.

Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. Circulation 107(16):2134-2139.

Aird WC. 2003. Endothelial cell heterogeneity. Crit Care Med 31(4 Suppl):S221-230.

Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. J Exp Med 185(1):111-120.

Alison MR, Leiman G, Kew MC. 2000. Metastasis in an axillary lymph node in hepatocellular carcinoma:a case report. World J Gastroenterol 6(5):770-772.

Allaire E, Bruneval P, Mandet C, Becquemin JP, Michel JB. 1997. The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. Surgery 122(1):73-81.

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

Arnulf G. 1987. [Long-term results of Jean Kunlin's first venous autograft. Apropos of the report of M. J. Descotes et al.]. Chirurgie 113(7-8):751-752.

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

Asai J, Takenaka H, Kusano KF, Ii M, Luedemann C, Curry C, Eaton E, Iwakura A, Tsutsumi Y, Hamada H, Kishimoto S, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. 2006. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. Circulation 113(20):2413-2424.

Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. 2006. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. Stem Cells 24(7):1728-1737.

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

Bachoud-Levi A, Bourdet C, Brugieres P, Nguyen JP, Grandmougin T, Haddad B, Jeny R, Bartolomeo P, Boisse MF, Barba GD, Degos JD, Ergis AM, Lefaucheur JP, Lisovoski F, Pailhous E, Remy P, Palfi S, Defer GL, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. 2000. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. Exp Neurol 161(1):194-202.

Bader A, Steinhoff G, Strobl K, Schilling T, Brandes G, Mertsching H, Tsikas D, Froelich J, Haverich A. 2000. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. Transplantation 70(1):7-14.

Baguneid M, Murray D, Salacinski HJ, Fuller B, Hamilton G, Walker M, Seifalian AM. 2004. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. Biotechnol Appl Biochem 39(Pt 2):151-157.

Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. Blood 103(3):921-926.

Bailey AS, Fleming WH. 2003. Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. Exp Hematol 31(11):987-993.

Bar H, Wende P, Watson L, Denger S, van Eys G, Kreuzer J, Jahn L. 2002. Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries. Basic Res Cardiol 97(1):9-16.

Barker SG, Causton BE, Baskerville PA, Gent S, Martin JF. 1992. The vasa vasorum of the rabbit carotid artery. J Anat 180 (Pt 2):225-231.

Berard X, Remy-Zolghadri M, Bourget C, Turner N, Bareille R, Daculsi R, Bordenave L. 2009. Capability of human umbilical cord blood progenitor-derived endothelial cells to form an efficient lining on a polyester vascular graft in vitro. Acta Biomater 5(4):1147-1157.

Berglund JD, Galis ZS. 2003. Designer blood vessels and therapeutic revascularization. Br J Pharmacol 140(4):627-636.

Bernacki SH, Wall ME, Loboa EG. 2008. Isolation of human mesenchymal stem cells from bone and adipose tissue. Methods Cell Biol 86:257-278.

Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stolz JF, Lacolley P, Voegel JC, Menu P. 2008. Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers. Advanced Materials 20(14):2674 - 2678.

Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, Stoltz JF, Voegel JC, Menu P. 2009. O2 level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells. PLoS One 4(5):e5514.

Berthod F, Damour O. 1997. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. Br J Dermatol 136(6):809-816.

Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R. 2000. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces : suitable materials, structure and properties. Macromolecules Rapid Communication 21:319-348.

Bodine DM, Seidel NE, Gale MS, Nienhuis AW, Orlic D. 1994. Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. Blood 84(5):1482-1491.

Boneu B. 1997. [Disseminated intravascular coagulation. Etiology, diagnosis]. Rev Prat 47(2):215-218.

Bonnet J. 2005. Atherosclerosis. EMC:436-458.

Bordenave L, Chaudet B, Bareille R, Fernandez P, Amedee J. 1999. In vitro assessment of endothelial cell adhesion mechanism on vascular patches. J Mater Sci Mater Med 10(12):807-810.

Bos GW, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. 1999. Endothelialization of crosslinked albumin-heparin gels. Thromb Haemost 82(6):1757-1763.

Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, Stoltz JF. 2003. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. Biomaterials 24(20):3521-3530.

Boura C, Muller S, Voegel JC, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. 2005. Behaviour of endothelial cells seeded on thin polyelectrolyte multilayered films: a new biological scaffold. Clin Hemorheol Microcirc 33(3):269-275.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 64(2):278-294.

Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. 1998. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. Clin Orthop Relat Res(355 Suppl):S247-256.

Budd JS, Bell PR, James RF. 1989. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. Br J Surg 76(12):1259-1261.

Callow AD. 1988. Problems in the construction of a small diameter graft. Int Angiol 7(3):246-253.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 98(8):2396-2402.

Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. 1999. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. Circ Res 85(12):1173-1178.

Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 9(5):641-650.

Caruso F, Donath E, Möhwald H. 1998a. Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Forster resonance energy transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-labeled particles in aqueous solution Journal of Physical Chemistry B 102:2011-2016

Caruso F, Furlong DN, Ariga K, Ichinose I, Kunitake T. 1998b. Characterization of polyelectrolyte-protein multilayer films by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and Fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy. Langmuir 14(16):4559-4565.

Caruso F, Lichtenfeld H, Donath E, Möhwald H. 1999. Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. Macromolecules 32(7):2317-2328.

Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. 1994. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb 14(5):753-759.

Chakfé N. 2004. Substituts vasculaires. Annales de Chirurgie 129(5):301-309.

Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. 2004. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. Clin Sci (Lond) 107(3):273-280.

Chiavegato A, Roelofs M, Franch R, Castellucci E, Sarinella F, Sartore S. 1999. Differential expression of SM22 isoforms in myofibroblasts and smooth muscle cells from rabbit bladder. J Muscle Res Cell Motil 20(2):133-146.

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

Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, Hwang KK, Oh S, Choi YJ, Chae IH, Oh BH, Choi YS, Walsh K, Park YB. 2003. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. Circulation 108(23):2918-2925.

Cho SW, Lim SH, Kim IK, Hong YS, Kim SS, Yoo KJ, Park HY, Jang Y, Chang BC, Choi CY, Hwang KC, Kim BS. 2005. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. Ann Surg 241(3):506-515.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162(1):156-159.

Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc 1(2):581-585.

Chong MS, Teoh SH, Teh EY, Zhang ZY, Lee CN, Koh S, Choolani M, Chan J. 2010. Beyond Cell Capture: Antibody Conjugation Improves Hemocompatibility for Vascular Tissue Engineering Applications. Tissue Eng Part A.

Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, Gabbiani G. 1999. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. Circ Res 85(1):99-107.

Clarke DR, Lust RM, Sun YS, Black KS, Ollerenshaw JD. 2001. Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. Ann Thorac Surg 71(5 Suppl):S433-436.

Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. 1988. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. J Cell Biol 107(5):1939-1945.

Cochin D, Laschewsky A. 1999. Layer-by-layer self-assembly of hydrophobically modified polyelectrolytes Macromolecular Chemistry and Physics 200:609-615

Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. 2002. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. J Biol Chem 277(5):3101-3108.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A 97(7):3213-3218.

Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. 2002. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng Phys 24(3):173-183.

Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. 1992. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 90(3):1168-1172.

Cooper CL, Dubin PL, Kayitmazer AB, Turksen S. 2005. Polyelectrolyte-protein complexes. Current Opinion in Colloid & Interface Science 10(1-2):52-78.

Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Soligo D, Bossolasco P, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. 2002. Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. Exp Neurol 177(2):443-452.

Cosentino F, Luscher TF. 1995. Maintenance of vascular integrity: role of nitric oxide and other bradykinin mediators. Eur Heart J 16 Suppl K:4-12.

Couet F, Mantovani D. 2008. Experimental validation of a new approach for the development of mechano-compatible composite scaffolds for vascular tissue engineering. J Mater Sci Mater Med 19(7):2551-2554.

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

Coulombel L. 2003. [Adult stem cells: seing is not being]. Med Sci (Paris) 19(6-7):683-694.

Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, Kris M, Grous J, Picozzi V, Rausch G, et al. 1991. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. N Engl J Med 325(3):164-170.

Cunningham KS, Gotlieb AI. 2005. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. Lab Invest 85(1):9-23.

Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science 251(4995):788-791.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res 14(7):1115-1122.

Dalsing MC, Kevorkian M, Raper B, Nixon C, Lalka SG, Cikrit DF, Unthank JL, Herring MB. 1989. An experimental collagen-impregnated Dacron graft: potential for endothelial seeding. Ann Vasc Surg 3(2):127-133.

Davies PF. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. Physiol Rev 75(3):519-560.

Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N, Barakat AI. 1997. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. Annu Rev Physiol 59:527-549.

de Mel A, Bolvin C, Edirisinghe M, Hamilton G, Seifalian AM. 2008. Development of cardiovascular bypass grafts: endothelialization and applications of nanotechnology. Expert Rev Cardiovasc Ther 6(9):1259-1277.

Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. 2003. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. Circulation 107(9):1247-1249.

Decher G. 1997a. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposite. Science 227:1232-1237.

Decher G. 1997b. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. Science 227:1232-1237.

Decher G, Schlenoff JB. 2003. Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials. Weinheim: Vch Verlagsgesellschaft Mbh.

Dela Paz NG, D'Amore PA. 2009. Arterial versus venous endothelial cells. Cell Tissue Res 335(1):5-16.

Delcorte A, Bertrand P, Arys X, Jonas A, Wischerhoff E, Mayer B, Laschewsky A. 1996. ToF-SIMS study of alternate polyelectrolyte thin films: Chemical surface characterization and molecular secondary ions sampling depth. Surface Science 366(1):149-165.

Delcorte A, Bertrand P, Wischerhoff E, Laschewsky A. 1997. Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces. Langmuir 13:5125-5136

Denis CV. 2002. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. Int J Hematol 75(1):3-8.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 107(2):275-281.

Dimmeler S, Vasa-Nicotera M. 2003. Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity? J Am Coll Cardiol 42(12):2081-2082.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science 321(5893):1218-1221.

Dong C, Crawford LE, Goldschmidt-Clermont PJ. 2005. Endothelial progenitor obsolescence and atherosclerotic inflammation. J Am Coll Cardiol 45(9):1458-1460.

Edwards WS, Holdefer WF, Mohtashemi M. 1966. The importance of proper caliber of lumen in femoral-popliteal artery reconstruction. Surg Gynecol Obstet 122(1):37-40.

Erdodi F, Barany M, Barany K. 1987. Myosin light chain isoforms and their phosphorylation in arterial smooth muscle. Circ Res 61(6):898-903.

Favaloro RG. 1968. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. Ann Thorac Surg 5(4):334-339.

Fernandez P, Bareille R, Conrad V, Midy D, Bordenave L. 2001. Evaluation of an in vitro endothelialized vascular graft under pulsatile shear stress with a novel radiolabeling procedure. Biomaterials 22(7):649-658.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279(5356):1528-1530.

Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. 2005. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. Biomaterials 26(13):1457-1466.

Filip S, Mokry J, Karbanova J, Vavrova J, English D. 2004. Local environmental factors determine hematopoietic differentiation of neural stem cells. Stem Cells Dev 13(1):113-120.

Filova E, Brynda E, Riedel T, Bacakova L, Chlupac J, Lisa V, Houska M, Dyr JE. 2009. Vascular endothelial cells on two-and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings. J Biomed Mater Res A 90(1):55-69.

Fischlein T, Zilla P, Meinhart J, Deutsch M. 1992. Clinical lining of prosthetic femoropopliteal bypass grafts with cultured autologous endothelial cells. Transplant Proc 24(6):3043.

Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ, Tucker WK, Fry DL. 1972. Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. Circ Res 30(1):23-33.

Fox D, Kouris GJ, Blumofe KA, Heilizer TJ, Husak V, Greisler HP. 1999. Optimizing fluorescent labeling of endothelial cells for tracking during long-term studies of autologous transplantation. J Surg Res 86(1):9-16.

Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 16(3):381-390.

Gaffney J, West D, Arnold F, Sattar A, Kumar S. 1985. Differences in the uptake of modified low density lipoproteins by tissue cultured endothelial cells. J Cell Sci 79:317-325.

Galili O, Herrmann J, Woodrum J, Sattler KJ, Lerman LO, Lerman A. 2004. Adventitial vasa vasorum heterogeneity among different vascular beds. J Vasc Surg 40(3):529-535.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 95(10):3106-3112.

George J, Goldstein E, Abashidze A, Wexler D, Hamed S, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. 2005. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. Cardiovasc Res 68(2):299-306.

Gillum RF. 1995. The epidemiology of stroke in Native Americans. Stroke 26(3):514-521.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. 1987. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. N Engl J Med 316(22):1371-1375.

Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. 2000. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. Artif Organs 24(3):217-223.

Gomes D, Louedec L, Plissonnier D, Dauge MC, Henin D, Osborne-Pellegrin M, Michel JB. 2001. Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. J Vasc Surg 34(4):707-715.

Gosselin C, Vorp DA, Warty V, Severyn DA, Dick EK, Borovetz HS, Greisler HP. 1996. ePTFE coating with fibrin glue, FGF-1, and heparin: effect on retention of seeded endothelial cells. J Surg Res 60(2):327-332.

Groot E, de Groot PG, Fijnheer R, Lenting PJ. 2007. The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. Curr Opin Hematol 14(3):284-289.

Guven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. 2006. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 48(8):1579-1587.

Haegerstrand A, Bengtsson L, Gillis C. 1993. Serum proteins provide a matrix for cultured endothelial cells on expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. Scand J Thorac Cardiovasc Surg 27(1):21-26.

Hanjaya-Putra D, Gerecht S. 2009. Vascular engineering using human embryonic stem cells. Biotechnol Prog 25(1):2-9.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science 318(5858):1920-1923.

Hasegawa Y, Ueda Y, Watanabe M, Morita F. 1992. Studies on amino acid sequences of two isoforms of 17-kDa essential light chain of smooth muscle myosin from porcine aorta media. J Biochem 111(6):798-803.

Haubitz M, Woywodt A. 2004. Circulating endothelial cells and vasculitis. Intern Med 43(8):660-667.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 13(1):69-80.

He H, Matsuda T. 2002. Arterial replacement with compliant hierarchic hybrid vascular graft: biomechanical adaptation and failure. Tissue Eng 8(2):213-224.

He H, Shirota T, Yasui H, Matsuda T. 2003. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. J Thorac Cardiovasc Surg 126(2):455-464.

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood 102(4):1340-1346.

Helper DJ, Lash JA, Hathaway DR. 1988. Distribution of isoelectric variants of the 17,000-dalton myosin light chain in mammalian smooth muscle. J Biol Chem 263(30):15748-15753.

Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, Marzi I. 2004. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. Shock 21(1):13-16.

Herring M, Gardner A, Glover J. 1978. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. Surgery 84(4):498-504.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med 348(7):593-600.

Hirai J, Matsuda T. 1996. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: tissue regeneration process. Cell Transplant 5(1):93-105.

Hoogeveen NG, Cohen Stuart MA, Fleer GJ, Bohmer MR. 1996. Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. Langmuir 12(15):3675 -3681.

Huang NF, Lee RJ, Li S. 2007. Chemical and physical regulation of stem cells and progenitor cells: potential for cardiovascular tissue engineering. Tissue Eng 13(8):1809-1823.

Huynh T, Abraham G, Murray J, Brockbank K, Hagen PO, Sullivan S. 1999. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. Nat Biotechnol 17(11):1083-1086.

Ii M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. 2005. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. Circulation 111(9):1114-1120.

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica 88(8):845-852.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood 104(9):2752-2760.

Itoh H, Aso Y, Furuse M, Noishiki Y, Miyata T. 2001. A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold. Artif Organs 25(3):213-217.

Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. 2006. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. Circulation 113(12):1605-1614.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 52(11):2745-2756.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 64(2):295-312.

Jakab K, Norotte C, Damon B, Marga F, Neagu A, Besch-Williford CL, Kachurin A, Church KH, Park H, Mironov V, Markwald R, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G. 2008. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. Tissue Eng Part A 14(3):413-421.

James NL, Schindhelm K, Slowiaczek P, Milthorpe B, Graham AR, Munro VF, Johnson G, Steele JG. 1992. In vivo patency of endothelial cell-lined expanded polytetrafluoroethylene prostheses in an ovine model. Artif Organs 16(4):346-353.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418(6893):41-49.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 238(1):265-272.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum 46(12):3349-3360.

Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. 1989. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. J Vasc Surg 9(4):535-541.

Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C, Sumpio BE. 2005. Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. J Vasc Surg 41(2):349-354.

Kamm KE, Stull JT. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. Annu Rev Pharmacol Toxicol 25:593-620.

Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE, Jr. 2001. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat Med 7(9):1035-1040.

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. 2001. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation 103(5):634-637.

Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, Lacolley P, Stoltz JF, Voegel JC, Menu P. 2008. Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. J Am Coll Cardiol 52(19):1589-1597.

Kerdjoudj H, Boura C, Marchal L, Dumas D, Schaff P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. 2006. Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering. Biomed Mater Eng 16(4 Suppl):S123-129.

Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfinbarger L, Jr., Hopkins R. 2005. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. Ann Thorac Surg 79(3):888-896; discussion 896.

Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. 2004. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. Eur J Vasc Endovasc Surg 27(4):357-362.

Kobashi T, Matsuda T. 1999a. Fabrication of branched hybrid vascular prostheses. Tissue Eng 5(6):515-524.

Kobashi T, Matsuda T. 1999b. Fabrication of compliant hybrid grafts supported with elastomeric meshes. Cell Transplant 8(5):477-488.

Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. 2004. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(8):1442-1447.

Konig G, McAllister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, Fiorillo A, Avila H, Wystrychowski W, Zagalski K, Maruszewski M, Jones AL, Cierpka L, de la Fuente LM, L'Heureux N. 2009. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. Biomaterials 30(8):1542-1550.

Kotov NA. 1999. Layer-by-layer self-assembly: The contribution of hydrophobic interactions
Nanostructured Materials 12:789-796

Krenning G, Dankers PY, Drouven JW, Waanders F, Franssen CF, van Luyn MJ, Harmsen MC, Popa ER. 2009. Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 296(6):F1314-1322.

Krenning G, Dankers PY, Jovanovic D, van Luyn MJ, Harmsen MC. 2007. Efficient differentiation of CD14+ monocytic cells into endothelial cells on degradable biomaterials. Biomaterials 28(8):1470-1479.

Krenning G, van der Strate B, Schipper M, Gallego YvSX, Fernandes B, van Luyn M, Harmsen M. 2008. CD34(+) Cells Augment Endothelial Cell Differentiation of CD14(+) Endothelial Progenitor Cells in vitro. J Cell Mol Med.

L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NA, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G, Robbins RC, McAllister TN. 2006. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. Nat Med 12(3):361-365.

L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. 2007. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. N Engl J Med 357(14):1451-1453.

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J 12(1):47-56.

Ladam G, Schaad P, Voegel J-C, Schaaf P, Decher G, Cuisinier FJG. 2000. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. Langmuir 16(3):1249-1255.

Lamm P, Juchem G, Milz S, Schuffenhauer M, Reichart B. 2001. Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations. Circulation 104(12 Suppl 1):I108-114.

Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Blevins WE. 1990. Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog. J Invest Surg 3(3):217-227.

Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Sandusky GE. 1992. Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. J Surg Res 53(2):175-181.

Lantz GC, Badylak SF, Hiles MC, Coffey AC, Geddes LA, Kokini K, Sandusky GE, Morff RJ. 1993. Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. J Invest Surg 6(3):297-310.

Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Bohm M, Kindermann W, Nickenig G. 2005. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 12(4):407-414.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. 2004. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation 109(2):220-226.

Lavik E, Langer R. 2004. Tissue engineering: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 65(1):1-8.

Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. 1999. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. J Immunol 162(5):2990-2996.

Legrand JC, Van der Auwera P, Bailly A, Daubresse JC, Renaux J, Wastiaux F. 1987. Circulating inhibitor of factor VIII during treatment with teicoplanin and rifampicin. J Antimicrob Chemother 19(6):850-852.

Leidner J, Wong EW, MacGregor DC, Wilson GJ. 1983. A novel process for the manufacturing of porous grafts: process description and product evaluation. J Biomed Mater Res 17(2):229-247.

Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. 2005. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. Eur Heart J 26(12):1196-1204.

Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Contemi AM, de Ritis DG, Giannico MB, Rebuzzi AG, Leone G, Crea F. 2006. Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction. Int J Cardiol 111(2):202-208.

Leyland-Jones B. 2003. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. Lancet Oncol 4(8):459-460.

Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. 1996. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. Circ Res 78(2):188-195.

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. 2003. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. Blood 102(8):2728-2730.

Long MW. 2001. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. Blood Cells Mol Dis 27(3):677-690.

Lopez-Soler RI, Brennan MP, Goyal A, Wang Y, Fong P, Tellides G, Sinusas A, Dardik A, Breuer C. 2007. Development of a mouse model for evaluation of small diameter vascular grafts. J Surg Res 139(1):1-6.

Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. 1998. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation 98(25):2800-2804.

Lvov Y, Ariga K, Onda M, Ichinose I, Kunitake T. 1999. A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 146(1-3):337-346.

Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC. 1985. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. J Thorac Cardiovasc Surg 89(2):248-258.

Ma X, Hibbert B, White D, Seymour R, Whitman SC, O'Brien ER. 2008. Contribution of recipient-derived cells in allograft neointima formation and the response to stent implantation. PLoS One 3(3):e1894.

Marois Y, Sigot-Luizard MF, Guidoin R. 1999. Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment. ASAIO J 45(4):272-280.

Martin ND, Schaner PJ, Tulenko TN, Shapiro IM, Dimatteo CA, Williams TK, Hager ES, DiMuzio PJ. 2005. In vivo behavior of decellularized vein allograft. J Surg Res 129(1):17-23.

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. Blood 105(1):199-206.

Masuda H, Kikuchi Y, Nemoto T, Bukhari A, Togawa T, Kamiya A. 1982. Ultrastructural changes in the endothelial surface of the canine carotid artery induced by wall shear stress load. Biorheology 19(1/2):197-205.

Matsuda Y, Hasegawa K. 1999. [Development of new anti-atherosclerotic drugs based on the phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells]. Nippon Yakurigaku Zasshi 114 Suppl 1:60P-65P.

McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, Zagalski K, Fiorillo A, Avila H, Manglano X, Antonelli J, Kocher A, Zembala M, Cierpka L, de la Fuente LM, L'Heureux N. 2009. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. Lancet 373(9673):1440-1446.

McCulloch EA, Till JE. 1960. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. Radiat Res 13:115-125.

McMillan R, Meeks B, Bensebaa F, Deslandes Y, Sheardown H. 2001. Cell adhesion peptide modification of gold-coated polyurethanes for vascular endothelial cell adhesion. J Biomed Mater Res 54(2):272-283.

Mehdorn HM. 1978. Human umbilical artery as a source of small-diameter vascular grafts. Graft materials in vascular surgery:297-319.

Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. 2006. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. Atherosclerosis 187(2):423-432.

Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. 2007. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 55(4):247-259.

Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. 2004. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. Circulation 109(21):2572-2580.

Miwa H, Matsuda T. 1994. An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses. J Vasc Surg 19(4):658-667.

Miwa H, Matsuda T, Tani N, Kondo K, Iida F. 1993. An in vitro endothelialized compliant vascular graft minimizes anastomotic hyperplasia. ASAIO J 39(3):M501-505.

Miyazu K, Kawahara D, Ohtake H, Watanabe G, Matsuda T. 2010. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at in situ capture of endothelial progenitor cell. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 94(1):53-63.

Moby V, Kadi A, de Isla N, Stoltz JF, Menu P. 2008. Polyelectrolyte multilayer films: effect of the initial anchoring layer on the cell growth. Biomed Mater Eng 18(4-5):199-204.

Muller-Ehmsen J, Scheid C, Grundmann F, Hirsch I, Turan G, Tossios P, Mehlhorn U, Schwinger RH. 2005. The mobilization of CD34 positive mononuclear cells after myocardial infarction is abolished by revascularization of the culprit vessel. Int J Cardiol 103(1):7-11.

Murohara T. 2001. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. Trends Cardiovasc Med 11(8):303-307.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. 2000. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest 105(11):1527-1536.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. 2002. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. Arthritis Rheum 46(3):704-713.

Nichols WK, Gospodarowicz D, Kessler TR, Olsen DB. 1981. Increased adherence of vascular endothelial cells to Biomer precoated with extracellular matrix. Trans Am Soc Artif Intern Organs 27:208-212.

Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanawala A, Sanzgiri S, Langer R. 2001. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. J Vasc Surg 33(3):628-638.

Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. 1999. Functional arteries grown in vitro. Science 284(5413):489-493.

Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. 2009. Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. J Cell Physiol 221(2):367-377.

Noel D, Djouad F, Jorgense C. 2002. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. Curr Opin Investig Drugs 3(7):1000-1004.

Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. Biomaterials 30(30):5910-5917.

O'Brien TP, Walsh MT, Kavanagh EG, Finn SP, Grace PA, McGloughlin TM. 2007. Surgical feasibility study of a novel polytetrafluoroethylene graft design for the treatment of peripheral arterial disease. Ann Vasc Surg 21(5):611-617.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. 2001a. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci 938:221-229; discussion 229-230.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. 2001b. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci U S A 98(18):10344-10349.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells 22(3):377-384.

Ott MJ, Ballermann BJ. 1995. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress. Surgery 117(3):334-339.

Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS. 2006. Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. Am J Physiol Renal Physiol 291(1):F176-185.

Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Muller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. 2002. Identification of the hemangioblast in postnatal life. Blood 100(9):3203-3208.

Petrakis NL, Davis M, Lucia SP. 1961. The in vivo differentiation of human leukocytes into histiocytes, fibroblasts and fat cells in subcutaneous diffusion chambers. Blood 17:109-118.

Picart C. 2008. Polyelectrolyte multilayer films: from physico-chemical properties to the control of cellular processes. Curr Med Chem 15(7):685-697.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411):143-147.

Pries AR, Kuebler WM. 2006. Normal endothelium. Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1):1-40.

Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276(5309):71-74.

Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. 2007. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(1):H522-529.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. 2002. Chimerism of the transplanted heart. N Engl J Med 346(1):5-15.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A 87(13):5193-5197.

Ramsden JJ, Lvov YM, Decher G. 1995. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. Thin Solid Films 254(1-2):246-251.

Ranjan AK, Kumar U, Hardikar AA, Poddar P, Nair PD. 2009. Human blood vessel-derived endothelial progenitors for endothelialization of small diameter vascular prosthesis. PLoS One 4(11):e7718.

Ratcliffe A. 2000. Tissue engineering of vascular grafts. Matrix Biol 19(4):353-357.

Ray G, Davids N. 1970. Shear stress analysis of blood-endothelial surface in inlet section of artery with plugging. J Biomech 3(1):99-110.

Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, Mahenthiran J, March KL. 2004. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. J Am Coll Cardiol 43(12):2314-2318.

Ren K, Fourel L, Rouviere CG, Albiges-Rizo C, Picart C. 2010. Manipulation of the adhesive behaviour of skeletal muscle cells on soft and stiff polyelectrolyte multilayers. Acta Biomater.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood 98(9):2615-2625.

Richardson JV, Wright CB, Hiratzka LF. 1980. The role of endothelium in the patency of small venous substitutes. J Surg Res 28(6):556-562.

Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. Nature 386(6626):671-674.

Rivron NC, Liu JJ, Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk CA. 2008. Engineering vascularised tissues in vitro. Eur Cell Mater 15:27-40.

Roberts I. 2004. Mesenchymal stem cells. Vox Sang 87 Suppl 2:38-41.

Robertson RP. 2000. Successful islet transplantation for patients with diabetes--fact or fantasy? N Engl J Med 343(4):289-290.

Rocha V, Chastang C, Souillet G, Pasquini R, Plouvier E, Nagler A, Locatelli F, Saarinen U, Cornu G, Bernaudin F, Gluckman E. 1998. Related cord blood transplants: the Eurocord experience from 78 transplants. Eurocord Transplant group. Bone Marrow Transplant 21 Suppl 3:S59-62.

Roelofs M, Faggian L, Pampinella F, Paulon T, Franch R, Chiavegato A, Sartore S. 1998. Transforming growth factor beta1 involvement in the conversion of fibroblasts to smooth muscle cells in the rabbit bladder serosa. Histochem J 30(6):393-404.

Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, Guelly C, Strunk D. 2007. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. Stem Cells 25(7):1746-1752.

Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. 2006. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. Stem Cells 24(2):357-367.

Roll S, Muller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, Willich SN. 2008. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. BMC Surg 8:22.

Rosenberg D.M. GBA, Rosenberg N., Lewis M.R. and Dale W.A. 1970. Experience with modified bovine carotid arteries in arterial surgery. Surgery 68:1064–1072.

Rosenberg N, Martinez A, Sawyer PN, Wesolowski SA, Postlethwait RW, Dillon ML, Jr. 1966. Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. Ann Surg 164(2):247-256.

Ross R, Everett NB, Tyler R. 1970. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. J Cell Biol 44(3):645-654.

Rotmans JI, Heyligers JM, Stroes ES, Pasterkamp G. 2006. Endothelial progenitor cell-seeded grafts: rash and risky. Can J Cardiol 22(13):1113-1116.

Rubner WBSaMF. 1997. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. Macromolecules 30(9):2717–2725.

Sahni SK. 2007. Endothelial cell infection and hemostasis. Thromb Res 119(5):531-549.

Sakalihasan N, Heyeres A, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. 1993. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. Eur J Vasc Surg 7(6):633-637.

Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. 2005. Abdominal aortic aneurysm. Lancet 365(9470):1577-1589.

Salacinski HJ, Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM. 2001. Cellular engineering of vascular bypass grafts: role of chemical coatings for enhancing endothelial cell attachment. Med Biol Eng Comput 39(6):609-618.

Samijo SK, Willigers JM, Barkhuysen R, Kitslaar PJ, Reneman RS, Brands PJ, Hoeks AP. 1998. Wall shear stress in the human common carotid artery as function of age and gender. Cardiovasc Res 39(2):515-522.

Sank A, Rostami K, Weaver F, Ertl D, Yellin A, Nimni M, Tuan TL. 1992. New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts. Am J Surg 164(3):199-204.

Sawyer PN, Adamson R, Butt K, Fitzgerald J, Haque S, Landi J, Malik L, Mistry F, Ramasamy N, Reddy K, Stanczewski B, Kirschenbaum D. 1980. Long-term function of NCGT vascular conduits in a multicenter trial: evaluation of physical chemical parameters. Biomater Med Devices Artif Organs 8(4):345-367.

Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. 2004. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. J Vasc Surg 40(1):146-153.

Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. 2000. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. J Clin Invest 106(4):571-578.

Schneider A, Melmed RN, Schwalb H, Karck M, Vlodavsky I, Uretzky G. 1992. An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts. J Vasc Surg 15(4):649-656.

Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, Salacinski HJ. 2002. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. Artif Organs 26(4):307-320.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376(6535):62-66.

Shantsila E, Watson T, Tse HF, Lip GY. 2008. New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. J Am Coll Cardiol 51(6):669-671.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 343(4):230-238.

Shi Q, Wu MH, Onuki Y, Ghali R, Hunter GC, Johansen KH, Sauvage LR. 1997. Endothelium on the flow surface of human aortic Dacron vascular grafts. J Vasc Surg 25(4):736-742.

Shimada T, Nishibe T, Miura H, Hazama K, Kato H, Kudo F, Murashita T, Okuda Y. 2004. Improved healing of small-caliber, long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin. Surg Today 34(12):1025-1030.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. Circulation 103(23):2776-2779.

Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, Stamp A, Taylor G, Moran AM, Landis W, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 1999. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. Ann Thorac Surg 68(6):2298-2304; discussion 2305.

Silkworth JB, McLean B, Stehbens WE. 1975. The effect of hypercholesterolemia on aortic endothelium studied en face. Atherosclerosis 22(3):335-348.

Simmons PJ, Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 78(1):55-62.

Smadja DM, Gaussem P. 2009. [Characterization of endothelial progenitor cells and putative strategies to improve their expansion.]. J Soc Biol 203(2):197-207.

Sobue K, Sellers JR. 1991. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. J Biol Chem 266(19):12115-12118.

Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, Muller M, Schulz S, Kirchhoff N, Doerries C, Horvath T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser U. 2007. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. Circulation 116(2):163-173.

Sourij H, Strunk D, Rohde E, Wascher TC. 2007. Association of circulating endothelial progenitor cell growth in patients with Type 2 diabetes with type of glucose-lowering treatment. Diabet Med 24(8):926-927.

Sparks SR, Tripathy U, Broudy A, Bergan JJ, Kumins NH, Owens EL. 2002. Small-caliber mesothelial cell-layered polytetraflouroethylene vascular grafts in New Zealand white rabbits. Ann Vasc Surg 16(1):73-76.

Stansby G, Berwanger C, Shukla N, Hamilton G. 1994a. Endothelial cell seeding of vascular grafts: status and prospects. Cardiovasc Surg 2(5):543-548.

Stansby G, Berwanger C, Shukla N, Schmitz-Rixen T, Hamilton G. 1994b. Endothelial seeding of compliant polyurethane vascular graft material. Br J Surg 81(9):1286-1289.

Stehbens WE. 1965. Endothelial Cell Mitosis and Permeability. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 50:90-92.

Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. 2005. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. Atherosclerosis 181(2):305-310.

Stoclet JC, Laflamme K, Auger FA, Germain L. 2004. [Human blood vessels created with tissue engineering]. Med Sci (Paris) 20(6-7):675-678.

Streichenberger R. 2000. Allogreffes veineuses conservées à 4°C dans les pontages sous-inguinaux : résultats à long terme dans 170 cas. Ann Chir Vasc 14:553-560.

Sukhishvili SA, Granick S. 2002. Layered, erasable polymer multilayers formed by hydrogen-bonded sequential self-assembly. Macromolecules 35(1):301-310.

Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. 1999. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. Brain Pathol 9(3):499-513.

Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc 2(12):3081-3089.

Tamura N, Nakamura T, Terai H, Iwakura A, Nomura S, Shimizu Y, Komeda M. 2003. A new acellular vascular prosthesis as a scaffold for host tissue regeneration. Int J Artif Organs 26(9):783-792.

Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. 2000. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. Eur J Vasc Endovasc Surg 19(4):381-386.

Teebken OE, Haverich A. 2002. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg 23(6):475-485.

Thebaud NB, Bareille R, Daculsi R, Bourget C, Remy M, Kerdjoudj H, Menu P, Bordenave L. 2010. Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor-derived endothelial cells to remain functional under shear stress in vitro. Acta Biomater 6(4):1437-1445.

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology 31(1):235-240.

Thompson MM. 2003. Controlling the expansion of abdominal aortic aneurysms. Br J Surg 90(8):897-898.

Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. 2002. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. Curr Probl Surg 39(2):110-230.

Thomson GJ, Vohra R, Walker MG. 1989. Cell seeding for small diameter ePTFE vascular grafts: a comparison between adult human endothelial and mesothelial cells. Ann Vasc Surg 3(2):140-145.

Thum T, Bauersachs J. 2005. Endothelial progenitor cells as potential drug targets. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 5(4):277-286.

Thum T, Fleissner F, Klink I, Tsikas D, Jakob M, Bauersachs J, Stichtenoth DO. 2007a. Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I. J Clin Endocrinol Metab 92(11):4172-4179.

Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker SD, Poole-Wilson PA, Borlak J, Ertl G, Bauersachs J. 2007b. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. Circ Res 100(3):434-443.

Tiwari A, Cheng KS, Salacinski H, Hamilton G, Seifalian AM. 2003. Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch. Eur J Vasc Endovasc Surg 25(4):287-295.

Tiwari A, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. 2001. Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. Eur J Vasc Endovasc Surg 21(3):193-201.

Tiwari A, Salacinski HJ, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM. 2002. Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach. FASEB J 16(8):791-796.

Tsukagoshi T, Yenidunya MO, Sasaki E, Suse T, Hosaka Y. 1999. Experimental vascular graft using small-caliber fascia-wrapped fibrocollagenous tube: short-term evaluation. J Reconstr Microsurg 15(2):127-131.

Turner NJ, Murphy MO, Kielty CM, Shuttleworth CA, Black RA, Humphries MJ, Walker MG, Canfield AE. 2006. Alpha2(VIII) collagen substrata enhance endothelial cell retention under acute shear stress flow via an alpha2beta1 integrin-dependent mechanism: an in vitro and in vivo study. Circulation 114(8):820-829.

Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K. 1987. Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84(24):9049-9053.

Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells functional characterization. Trends Cardiovasc Med 14(8):318-322.

van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. 1996. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. J Cell Biol 134(2):401-411.

van Wachem PB, Vreriks CM, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. 1987. The influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers. J Biomed Mater Res 21(6):701-718.

Vandekerckhove J, Weber K. 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. J Mol Biol 126(4):783-802.

Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, Bordenave L, Hamilton G, Seifalian AM. 2005. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. Pathol Biol (Paris) 53(10):599-612.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res 89(1):E1-7.

Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. 1979. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. Surgery 85(3):253-256.

Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Walker MG. 1991. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. Br J Surg 78(4):417-420.

Voorhees AB Jr JA, Blakemore AH. 1952. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. Ann Surg 135:332-336.

Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Schoen FJ, Bianco R, Kruth HS, Zand R, Levy RJ. 1997. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms. Circulation 95(2):479-488.

Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. 1997. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med 216(3):456-463.

Wainwright DJ. 1995. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. Burns 21(4):243-248.

Wall RT, Counts RB, Harker LA, Striker GE. 1980. Binding and release of factor VIII/von Willebrand's factor by human endothelial cells. Br J Haematol 46(2):287-298.

Walluscheck KP, Steinhoff G, Kelm S, Haverich A. 1996. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. Eur J Vasc Endovasc Surg 12(3):321-330.

Walpoth BH, Rogulenko R, Tikhvinskaia E, Gogolewski S, Schaffner T, Hess OM, Althaus U. 1998. Improvement of patency rate in heparin-coated small synthetic vascular grafts. Circulation 98(19 Suppl):II319-323; discussion II324.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 269(43):26988-26995.

Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Yin FC. 2000. Contractility affects stress fiber remodeling and reorientation of endothelial cells subjected to cyclic mechanical stretching. Ann Biomed Eng 28(10):1165-1171.

Wang LY, Wang ZQ, Zhang X, Shen JC. 1997. A new approach for the fabrication of an alternating multilayer film of poly(4-vinylpyridine) and poly(acrylic acid) based on hydrogen bonding
Macromolecular Rapid Communications
18:509-514.

Wang XN, Chen CZ, Yang M, Gu YJ. 2007. Implantation of decellularized small-caliber vascular xenografts with and without surface heparin treatment. Artif Organs 31(2):99-104.

Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ. 2007. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. Catheter Cardiovasc Interv 70(7):983-998.

Watanabe K. 1980. Microarterial prostheses of expanded polytetrafluoroethylene. J Microsurg 2(1):11-21.

Weinberg CB, Bell E. 1986. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. Science 231(4736):397-400.

Werner M, Kaloutsi V, Walter K, Buhr T, Bernhards J, Georgii A. 1992. Immunohistochemical examination of routinely processed bone marrow biopsies. Pathol Res Pract 188(6):707-713.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 105(15):5856-5861.

White CR, Frangos JA. 2007. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362(1484):1459-1467.

Winder SJ, Sutherland C, Walsh MP. 1992. A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon. Biochem J 288 (Pt 3):733-739.

Woods T, Gratzer PF. 2005. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. Biomaterials 26(35):7339-7349.

WorldHealthOrganisationTechnicalReportSeries. 1958. Classification of atherosclerotic lesions ; report of a study group 57(143):1-20.

Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. 2002. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. Nephrol Dial Transplant 17(10):1728-1730.

Xiao L, Shi D. 2004. Role of precoating in artificial vessel endothelialization. Chin J Traumatol 7(5):312-316.

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. 2003. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. Circulation 107(9):1322-1328.

Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. 2003. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. Carcinogenesis 24(6):1021-1029.

Ye Q, Zund G, Jockenhoevel S, Schoeberlein A, Hoerstrup SP, Grunenfelder J, Benedikt P, Turina M. 2000. Scaffold precoating with human autologous extracellular matrix for improved cell attachment in cardiovascular tissue engineering. ASAIO J 46(6):730-733.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 90(12):5002-5012.

Yin M, Yuan Y, Liu C, Wang J. 2008. [Immobilization of CD34 antibodies onto ethylene-vinyl acetate copolymer coatings and in vitro cell attachments]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 25(5):1130-1134.

Yin M, Yuan Y, Liu C, Wang J. 2009. Combinatorial coating of adhesive polypeptide and anti-CD34 antibody for improved endothelial cell adhesion and proliferation. J Mater Sci Mater Med 20(7):1513-1523.

Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood 109(5):1801-1809.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. J Bone Joint Surg Am 80(12):1745-1757.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. J Orthop Res 16(4):406-413.

Yu H, Dai W, Yang Z, Kirkman P, Weaver FA, Eton D, Rowe VL. 2003. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. J Vasc Surg 38(3):557-563.

Yue X, van der Lei B, Schakenraad JM, van Oene GH, Kuit JH, Feijen J, Wildevuur CR. 1988. Smooth muscle cell seeding in biodegradable grafts in rats: a new method to enhance the process of arterial wall regeneration. Surgery 103(2):206-212.

Zarbiv G, Preis M, Ben-Yosef Y, Flugelman MY. 2007. Engineering blood vessels by gene and cell therapy. Expert Opin Biol Ther 7(8):1183-1191.

Zhu C, Ying D, Mi J, Li L, Zeng W, Hou C, Sun J, Yuan W, Wen C, Zhang W. 2008. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix. Biomaterials 29(17):2628-2636.

Zilla P, Fasol R, Preiss P, Kadletz M, Deutsch M, Schima H, Tsangaris S, Groscurth P. 1989. Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. Surgery 105(4):515-522.

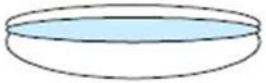
Annexes

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT DE VEINES

bioprotec
BANQUE DE TISSUS

RECUEIL DE LA VEINE









PRELEVEMENT DE SANG



Remplir les tubes au maximum
Seule l'étiquette « code donneur Bioprotec » doit être collée sur les tubes.



1 RINCER la veine

dans une cupule de sérum physiologique.

2 EXAMINER et SELECTIONNER la veine

Choisir les segments veineux rectilignes de longueur supérieure à 15 cm et de section comprise entre 4 mm et 8mm.

3 REPERER le sens du flux

par une boucle ou un clip du coté de la crosse.

4 INTRODUIRE la veine dans le flacon

Respecter les règles d'asepsie.

5 FERMER le scellé

6 IDENTIFIER le flacon

Renseigner l'étiquette à l'aide du marqueur indélébile.
Coller une étiquette code donneur.

7 Remettre le flacon dans l'emballage secondaire

8 IDENTIFIER avec les étiquettes code donneur les tubes de sang et l'emballage secondaire.

9 Coller une étiquette Code donneur sur les feuillets et conservez celui destiné à vos enregistrements.

TRACABILITE

Pour que le prélèvement soit validé lors de sa réception à Bioprotec il est indispensable :
que la fiche de prélèvement soit :
signée par le patient et le chirurgien,
identifiée par un code donneur
que les indications portées sur le flacon corroborent celles portées sur la fiche.

STOCKAGE DES VEINES PRELEVEES

Les veines sont recueillies dans un flacon primaire protégé par un conditionnement secondaire. Le Kit contenant les flacons de prélèvement est stocké dans une armoire réfrigérée contrôlée à **+2°C /+8°C**

La durée de validité de la solution de recueil (2 mois à partir de sa fabrication) est indiquée sur le flacon et sur le kit.

TRANSFERT DES VEINES PRELEVEES A BIOPROTEC

Lorsque le kit est plein ou lorsque sa limite de validité est atteinte, il est confié à un transporteur missionné par Bioprotec.
Celui ci se présente au centre de prélèvement avec un conteneur permettant le maintien de la température de **+2°C /+8°C**

Les fiches de prélèvement sont laissées dans le kit.

TRANSFERT DES TUBES A SANG AU LABORATOIRE DE PROXIMITE

Les prélèvements sanguins d'un même donneur, identifiés par le code donneur sont placés dans une pochette plastique fournie dans le kit. Ils sont transférés au laboratoire d'analyses médicales associé à l'établissement préleveur pour y être centrifugés dans les meilleurs délais.

Dans cette attente les tubes sont stockés à **+2°C /+8°C**

Les prélèvements de sang ne seront validés par Bioprotec que si la traçabilité est complète et si la quantité et la qualité des prélèvements de sang permettent la bonne réalisation des contrôles sérologiques.

BIOPROTEC 51 rue Audibert & Lavirotte 69008 LYON
Tel : 04 72 78 53 10 Fax : 04 78 01 79 18

BIOPROTEC

LETTRE D'INFORMATION DU DONNEUR

Madame, Monsieur,

Vous allez être opéré(e) de varices. Il sera peut être nécessaire de retirer complètement votre veine Saphène. **Vous pouvez donner votre veine**, car après sélection puis transformation, un segment de celle-ci pourra peut-être être conservé puis greffé (pontage) à des patients présentant une artérite grave (gangrène...) des membres inférieurs ou à des insuffisants rénaux dialysés. Il pourra également servir à la recherche pour améliorer la préparation des greffons.

Bioprotec, banque de tissus humains française, participe à la promotion du don de veines en sollicitant, par l'intermédiaire de votre chirurgien, votre accord pour le recueil de votre veine saphène.

Bioprotec engage sa responsabilité sur le strict respect de l'éthique et des règles sanitaires édictées par le Code de la Santé Publique :

- Le don est gratuit, anonyme (le bénéficiaire n'a pas connaissance de l'identité du donneur) et sans publicité.

- L'identité du donneur peut être, en cas de sélection d'un segment de veine, enregistrée sur ordinateur par la banque de tissus, laquelle a déclaré cette activité auprès de la commission Nationale Informatique et Libertés *.

- Un entretien sera réalisé par le chirurgien pour déterminer si les données concernant le donneur sont compatibles avec la sécurisation du don.

- Un prélèvement sanguin sera réalisé afin de permettre, en cas d'obtention d'un greffon à partir du don, de réaliser les examens obligatoires de dépistage d'infections transmissibles**. Les résultats de ces examens sont confidentiels, conservés par la banque de tissus et transmis, en cas de non-conformité, au chirurgien, chargé d'en donner la signification au donneur.

Ces opérations sont nécessaires à la sécurisation de votre veine.

Vous êtes libre de ne pas accepter de faire ce don, ce qui n'aura aucune conséquence sur les relations que vous aurez avec vos médecins et sur la qualité des soins que vous recevrez.

Votre décision permettra de faciliter le traitement chirurgical d'autres patients.
Votre chirurgien et **Bioprotec** vous en remercient par avance.

Vous pouvez confirmer votre accord pour ce don en apposant votre signature dans le cadre ci-dessous et en remplissant avec votre chirurgien la fiche de prélèvement jointe.

DONNEUR Sexe M☐ F☐

Nom :

Prénom :

Né(e) le / / Code postal du domicile :

Signature du donneur :

Fait le : / /

CODE DONNEUR

** Conformément aux dispositions de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous conservez un droit d'accès et de rectification de ces informations par l'intermédiaire de votre chirurgien.*

***Recherches de Syphilis, virus HIV, HTLV, Hépatites B et C.*

Liasse blanche à retourner à BIOPROTEC — *Liasse rose à conserver par l'établissement de soins*

Maj0802 BIOPROTEC- 51, rue Audibert et Lavirotte – 69008 LYON- Tél. : 04-72-78-53-10 – Fax : 04-78-01-79-18

BIOPROTEC	FICHE DE PRELEVEMENT DE VEINES
Si la réponse est oui ou anormal préciser sur la ligne correspondante	Selon le modèle de fiche de recueil de résidus opératoires établi par l'Agence de la Biomédecine

Données concernant le donneur destinées à la banque de tissus.

- ***Appartenance à un groupe à risque de transmission de VIH, de HTLV ou d'Hépatite B ou C.*** oui☐ non☐

  Partenaires sexuels multiples homo ou hétérosexuels, concernant le donneur ou son partenaire régulier.
  Toxicomanie par voie intraveineuse concernant le donneur ou son partenaire régulier.
  Accident d'exposition à du sang ou dérivés susceptibles d'être contaminés.
  Séjour en milieu carcéral.

- ***Risque de transmission d'encéphalopathie subaiguë spongiforme.*** oui☐ non☐

  Traitement par hormones hypophysaires (notamment de croissance) extractives.
  Greffe de dure-mère d'origine humaine.
  Antécédents chirurgicaux intéressant le système nerveux central.
  Démence ou maladie neurologique pouvant évoquer une encéphalopathie subaiguë spongiforme.
  Antécédents familiaux entrant dans le cadre des encéphalopathies subaiguës spongiformes.

- ***Infection généralisée active.*** oui☐ non☐

  Infection ou suspicion d'infection par une maladie virale (notamment hépatites virales,VIH,HTLV,rage)
  Tuberculose active, lèpre.
  Mycose ou infection bactérienne systémique, maladie parasitaire.

- ***Autre pathologie authentifiée.*** oui☐ non☐

  Hémopathie maligne.
  Cancer.
  Maladie de système (auto-immune).

- ***Traitements connus.*** oui☐ non☐

  Stéroïdes au long cours (>90j)
  Irradiation, Chimiothérapie.
  Transfusion sanguine Si oui année .....

- ***Pathologie locale (aux membres inférieurs).*** oui☐ non☐

  Antécédents d'irradiation ou de pathologie locale connue.
  Infection bactérienne pouvant contaminer le tissu à prélever.

- ***Examen lors du prélèvement.*** anormal ☐ normal ☐

  Adénopathies multiples, hépato-splénomégalie.
  Ictère.
  Pathologie au niveau de la zone à prélever.
  Traces de piqûres pouvant évoquer une toxicomanie intraveineuse.

- ***Antécédents de vaccination pour l'hépatite B.*** Si oui année ..... oui☐ non☐

DONNEUR Sexe M☐ F☐ Nom :	Patient prévenu du recueil de tissus : Oui ☐ Non ☐ Par :
Prénom : Né(e) le / / Code postal du domicile :	Date de prélèvement de la veine : / / Date de prélèvement du sang : / /
Signature du donneur : Fait le : / /	Etablissement : Nom du Médecin Signature
CODE DONNEUR	

Liasse blanche à retourner à BIOPROTEC *Liasse rose à conserver par l'établissement de soins*

Maj0802 *BIOPROTEC- 51, rue Audibert et Lavirotte – 69008 LYON– Tél. : 04-72-78-53-10 – Fax : 04-78-01-79-18*

Liste

Des

Travaux

Publications scientifiques

E. Paternotte, N. Salmon, P. Labrude, J.F. Stoltz, J.C. Voegel, P. Menu. Innovation in small caliber vascular grafts patency: polyelectrolytes multilayer films advance endothelial cells retention under shear stress. Original article. En rédaction.

E. Paternotte*, N. Salmon*, B. Lehalle, J.F. Stoltz, P. Labrude, P. Menu. Vascular occlusive diseases: What current status and future prospects for tissue engineering of stents and vascular substitutes? Review. En rédaction.

E. Paternotte[*], N. Salmon[*], V. Decot, J.F. Stoltz, P. Menu, P. Labrude. Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. Original article. Biomed. Mater. Eng., 2009.

C. Gaucher-Di Stasio, **E. Paternotte**, C. Prin-Mathieu, B.J. Reeder, G. Poitevin, P. Labrude, J.F. Stoltz, C.E. Cooper, P. Menu. The importance of the effect of shear stress on endothelial cells in determining the performance of hemoglobin based oxygen carriers. Original article. Biomaterials, 2009.

E. Paternotte, C. Gaucher, P. Labrude, J.F. Stoltz, P. Menu. Behaviour of endothelial cell face to hypoxia. Review. Biomed. Mater. Eng., 2008.

[*] : ces deux auteurs ont contribué de façon égale au travail.

Communications affichées

H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, **E. Paternotte**, C. Gaucher, J.C. Voegel, P. Menu. Polyelectrolyte films and vascular tissue engineering. 2ème colloque de l'ITMO technologies pour la santé/Collège de France, Paris, juin 2010.

E. Paternotte, D. Rouxel, B. Vincent, R.Hadji, H. Kerdjoudj and P. Menu. A new piezoelectric polymer nanocomposites for therapeutic applications: build-up and cytotoxic evaluation. First Cross Border Conference on NanoSciences and Materials for Health A tribute to Patrick ALNOT, Pont à Mousson, Juin 2010.

E. Paternotte, B. Vincent, R. Hadji, N. Salmon, P. Menu, D. Rouxel. Brillouin spectroscopy as a tool for analysis of nanoscale films covering biological tissue. First Cross Border Conference on NanoSciences and Materials for Health A tribute to Patrick ALNOT, Pont à Mousson, Juin 2010.

H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, **E. Paternotte,** J.F. Stoltz, J.C. Voegel, P. Menu. Nouvelle génération de substituts vasculaires naturels. 26e Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Paris, Avril 2009.

E. Paternotte, H. Kerdjoudj, J.F. Stoltz, P. Schaaf, J.C. Voegel, P. Menu. Effect of the polyelectrolyte multilayer film on endothelial cell retention in the luminal surface of the arteries after shear stress application. Regenerative medicine, Advancing next generation therapies, 13th Annual Hilton Head Workshop, Hilton Head Island, South Carolina,USA, Mars 2009.

E. Paternotte, C. Gaucher, N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, N. Salmon, J.F. Stoltz, P. Labrude, P. Menu. Influence d'une faible concentration en dioxygène sur le comportement de cellules endothéliales humaines. 4ème journée Claude Huriet de la recherche biomédicale, Nancy, France, décembre 2008.

E. Paternotte, C. Gaucher, N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, N. Salmon, J.F. Stoltz, P. Labrude, P. Menu. Comportement des cellules endothéliales cultivées sous une atmosphère à faible concentration en dioxygène. 13ème congrès annuel AFC Cytométrie, Nancy, France, octobre 2008.

H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, **E. Paternotte**, P. Schaaf, J.F. Stoltz, P. Lacolley, J.C. Voegel, P. Menu. Human umbilical reendothelization engineered by polyelectrolyte multilayer build ups: a tool for adult arteries revascularization. Société japonaise pour la promotion de la Science (JSPS), Strasbourg, France, novembre 2007.

E. Paternotte, C. Gaucher, J.F. Stoltz, P. Menu. Behaviour of endothelial cell face to moderate hypoxia. 4ème Colloque International Bioingénierie & Biothérapies, Nancy, France, septembre 2007.

Communications orales

E. Paternotte, B. Vincent, R. Hadji, N. Salmon, P. Menu, D. Rouxel. Brillouin spectroscopy as a tool for analysis of nanoscale films covering biological tissue. First Cross Border Conference on NanoSciences and Materials for Health A tribute to Patrick ALNOT, Pont à Mousson, Juin 2010.

E. Paternotte, C. Gaucher, H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, J.F. Stoltz, P. Labrude, P. Menu. Comportement des cellules endothéliales soumises à une hypoxie modérée. 13ème congrès annuel AFC Cytométrie 2008, Nancy, France, octobre 2008.

Résumé :

Les taux élevés de mortalité et de morbidité associés aux maladies vasculaires en font des pathologies dont les conséquences physiopathologiques, chirurgicales et socio-économiques sont d'une importance majeure pour le système de santé. Malgré leurs avantages, la disponibilité limitée des vaisseaux autologues a conduit au développement de prothèses synthétiques. Cependant, leur surface hautement thrombogène limite leur utilisation dans la substitution des vaisseaux de petit calibre (< 6 mm). De ce fait, à cause de leur obstruction précoce, la reconstitution d'une surface luminale proche de l'endothélium natif est incontournable. Pourtant, les revêtements de surface actuellement disponibles possèdent de médiocres qualités de rétention des néo-endothélium lorsqu'ils sont soumis à des contraintes de cisaillement physiologiques. Dans ce travail, nous proposons un substitut vasculaire de petit calibre endothélialisé réalisé à partir de trois éléments : 1) une matrice préparée à partir d'une artère ombilicale désendothélialisée, 2) un recouvrement de surface innovant constitué du film multicouche de polyélectrolytes (MPE) $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$, et 3) un néo-endothélium constitué de cellules endothéliales matures ou progénitrices. Les études *in vitro* menées sur ces substituts ont montré que la formation, la rétention sous contraintes de cisaillement et la fonctionnalité du néoendothélium élaboré sur la surface luminale étaient améliorées par le film MPE. L'implantation du substitut par pontage termino-latéral sur le lapin a montré que le cahier des charges imputé aux substituts de petit calibre était rempli, principalement en termes de perméabilité et de diamètre, mais aussi de résistance à la suture et aux infections. En conclusion, le film MPE favorise le développement d'un substitut vasculaire de petit diamètre perméable à « long » terme et qui pourrait répondre aux exigences des chirurgiens.

Mots clés : ingénierie vasculaire, substitut vasculaire de petit calibre, film multicouche de polyélectrolytes, cellules endothéliales matures, progéniteurs endothéliaux, contraintes de cisaillement, pontage carotidien.

Abstract :

Vascular diseases with their high rate of mortality and morbidity belong to the pathologies involving important socio-economic factors for health system. Despite the advantages of autografts, the limited availability of autologous vessels has led to the development of synthetic prostheses. However, their high thrombogenic surface limits their use as small calibre vascular substitutes (< 6 mm). To prevent narrowing of small diameter vascular grafts, the reconstruction of a luminal surface close to the native endothelium is essential. However, the retention of the neo-endothelium subjected to shear stress is poor on the coatings currently available. In this work, we developed a small calibre endothelialized vascular substitute thanks to three elements: 1) a natural matrix prepared from umbilical artery, 2) an innovative coating based on the polyelectrolytes multilayer film (PEM) $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$, and 3) used for cell culture of mature or progenitor endothelial cells. *In vitro* studies have shown that the formation, the retention under shear stress and the endothelial function of the neoendothelium on the luminal surface were improved by PEM film. The anastomosis of this substitute on rabbits has shown that the specifications essential to small calibre vascular grafts were reached, mainly in terms of permeability and diameter but also of resistance to suture and infections. In conclusion, PEM films helped us to develop a small diameter vascular substitute with long term patency.

Key words : vascular engineering, small calibre vascular graft, polyelectrolytes multilayer films, endothelial cells, progenitor endothelial cells, shear stress, vascular by-pass.