



HAL
open science

Nouvelles approches dans la conception d'un substitut vasculaire de petit diamètre d'origine fœtale et premières évaluations de pontage artériel chez le gros animal

Adrien Fayon

► **To cite this version:**

Adrien Fayon. Nouvelles approches dans la conception d'un substitut vasculaire de petit diamètre d'origine fœtale et premières évaluations de pontage artériel chez le gros animal. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0284 . tel-03833506

HAL Id: tel-03833506

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03833506v1>

Submitted on 23 Feb 2023

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Adrien FAYON**

Nouvelles approches dans la conception d'un substitut vasculaire de petit diamètre d'origine fœtale et premières évaluations de pontage artériel chez le gros animal

Jeudi 16 décembre 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme. Laurence BORDENAVE PU-PH, Université de Bordeaux
M. Nicolas BLANCHEMAIN PU, Université de Lille

Examineurs :

Mme. Caroline GAUCHER MCU, Université de Lorraine, Nancy
Mme. Laure MAGNAN PhD, Directrice scientifique, Oxford
M. Philippe MENASCHE PU-PH, Université Paris Descartes
M. Pablo MAUREIRA PU-PH, CHRU Nancy

Directeur de thèse

M. Patrick MENU PU, Université de Lorraine, Nancy

Co-directrice de thèse

Mme. Reine EL OMAR MCU, Université de Lorraine, Nancy

Membre invité :

M. Marc PONCOT MCU, Université de Lorraine, Nancy

UMR 7365-CNRS – Université de Lorraine. Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour leur implication dans l'évaluation de mon travail de thèse. Merci au Pr. Laurence Bordenave et au Pr. Nicolas Blanchemain pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs. Merci au Dr. Caroline Gaucher et au Pr. Philippe Menasché pour avoir suivi et s'être impliqués dans mon parcours de thèse en intégrant mon CSI, vos analyses et remarques pertinentes m'ont fortement aidé. Merci au Pr. Pablo Maureira avec qui j'ai pu travailler au cours de ma thèse dans le cadre des expérimentations *in vivo*. Merci au Dr. Laure Magnan qui m'a beaucoup aidé et qui m'a notamment permis de me projeter dans l'après -thèse. Enfin merci au Dr. Marc Poncot qui m'a accompagné dans mes premiers pas dans le monde de la mécanique.

Je remercie ma famille et mes amis pour m'avoir soutenu au cours de ces 3 années qui n'ont finalement pas été si compliquées ! Merci aux personnes qui m'ont fait comme je suis, qui m'ont guidé et permis d'avancer ! Merci à Marine de m'avoir nourri au cours de cette période, je ne sais pas si j'y serais arrivé en ne mangeant que des pâtes au gruyère !

Tant qu'à parler nourriture, je remercie le RU du CROUS pour ses délicieux sandwiches « Fermiers ». Ma thèse n'aurait pas pu aboutir sans vous !

Merci aux membres de l'Institut Jean Lamour qui m'ont accueilli et accompagné tout au long des manip de mécanique ! Merci à Isabelle Royaud, Marc Ponçot et Cyril Noirel !

Merci à Manuela Tavian, sans qui je n'aurais peut-être jamais fait de thèse. Merci de m'avoir accompagné au cours de mes premiers pas dans le monde de la recherche. Tu as su m'apprendre des tonnes de choses, et avec toi j'ai pu m'entraîner à toujours être plus rigoureux. Merci Laurent Vallat, les mots encourageants que tu as eu à mon égard ont su me donner confiance en mes capacités, ce dont j'ai eu besoin dans les années qui ont suivi !

Merci aux jeunes et aux moins jeunes qui nous ont précédé ou qui nous suivront ! Je pense notamment à Émilie, Paul, Marion, Fatouma, Madhia et Sté pour m'avoir permis de m'intégrer dans le groupe à mon arrivée au laboratoire ! J'ai eu grand besoin d'amis et vous avez su me faire une place... Merci Petite Pédestre ! Merci.

Merci à la team du bureau, pour m'avoir fait rire, avoir supporté mes blagues, mes moments de craquages, et mes achats compulsifs entre autres... Merci Valentine, Allan, Ragote, Jordan. Pour les autres je vous remercie de ne pas m'avoir trop jugé au cours de ces années de thèse, et d'avoir supporté les tirs de Nerf sans trop rien dire, bravo pour les esquives et merci Justine, Meriem, Laura, Alexandre, Maroua, ...

Merci à l'autre équipe de jeunes plutôt présents dans les moments où il fallait lever le coude ! Café ou plus épicé qu'importe, l'important étant de ne pas boire tout seul ! Merci à Quentin, Anne, Lauralie, Océane, Kevin, Roméo, Serge, Romain, Jean-Malo, ... !

Merci à ma Khey, le soutien en général c'est top mais le plus efficace pour tenir le coup c'est de savoir que y en a d'autres qui sont dans la même galère ! J'espère que j'ai été un aussi bon collègue de thèse pour toi que tu l'as été pour moi ! Par contre faut pas déconner, on ne sabrera plus JAMAIS le champagne, une expérience de champagne shower ça suffit pour toute une vie ! Merci Cha' !

Ghislaine et Naceur, je vous mets dans le même panier car vous étiez dans le même bureau et je vous remercie pour votre accueil, et le soutien que vous m'avez apporté !

Cécile, merci pour ton sourire, tes discussions, ta bienveillance ! Je pense que tous les laboratoires gagneraient à avoir une Cécile ! Les conditions de travail se verraient grandement améliorées !

Merci David pour tes conseils d'ELISA, on a fini par trouver à peu près le problème ! Et pour avoir été là pour moi dans les moments où j'avais besoin de parler, de manip, ou d'autres ! Dans le même esprit je voudrais remercier Lydia, Meriem, Marie-Hélène, Huguette, Fred, Pascal, JB, et Dominique pour leur support psychologique ou matériel au cours de mes 3 années de thèse ! Ça a été un plaisir de travailler aux côtés de personnes telles que vous.

Astrid, Christelle et Laurent, merci pour votre accueil, votre coaching, et votre disponibilité pour répondre à mes questions ! Je mets une mention spéciale à Laurent pour sa patience (tant avec moi, qu'en règle générale) pour les (trop ?) nombreuses questions auxquelles il a bien voulu m'apporter des réponses ainsi que pour sa bienveillance !

Merci Vanessa, merci d'avoir été là pour soutenir ma chef, merci d'être son amie, et merci pour la gentillesse dont tu as fait preuve envers moi. Même si nos interactions n'ont pas été très nombreuses elles ont toujours été dans le bon sens, merci pour ton aide, ton soutien et ton amitié !

Merci à la direction du laboratoire, Jean-Yves Jouzeau et Bruno Charpentier notamment pour vos mots d'encouragement après ma première présentation devant le laboratoire.

Je remercie également le personnel de l'École de Chirurgie de Nancy ainsi que l'équipe de chirurgiens cardiovasculaires du CHRU pour leur travail, leur implication ainsi que pour la pédagogie qu'ils ont su montrer !

Merci au duo Gigi / Christophe ! Vous êtes de super personnes, vraies et bienveillantes. Tout le monde a besoin de collègues tels que vous !

Merci à l'ensemble des membres du Conseil de l'ED BioSE pour votre accueil ainsi que pour les riches discussions auxquelles j'ai pu participer en votre compagnie.

Merci Hadrien pour tes conseils, ta disponibilité et ton accessibilité ! J'ai appris beaucoup de tes interventions et de tes idées, et merci pour ta bienveillance à l'égard des doctorants.

Merci Monsieur Menu pour m'avoir apporté votre expertise, vos conseils et votre soutien. J'espère que mon encadrement ne vous a pas paru interminable avant la retraite, et que vous en garderez de bons souvenirs.

ADVERTISING : Merci Chef, tu as été incroyable du début jusqu'à la fin de ma thèse, un modèle d'implication, de support et de pédagogie. Tu as toujours fait ton maximum pour m'aider, et je t'en serais toujours reconnaissant. Sans toi ma thèse n'aurait peut-être pas été supportable. En plus de tout cela tu es devenue une amie incroyable, et je suis heureux d'avoir pu partager ma thèse avec toi. Ce n'est peut-être pas l'endroit adéquat pour écrire une dizaine de pages sur les qualités que je te trouve, et j'ai déjà eu la chance de pouvoir m'exprimer à ce sujet. Après un an, ces quelques mots qui se terminaient par « merveilleuse mère » semblent déjà être de doux euphémismes...
Merci pour tout Reine.

A toutes les personnes citées : ça a réellement été un plaisir de travailler à vos côtés, même si le moral ne peut pas toujours être là, vos sourires, et votre soutien m'ont permis d'avancer et de réaliser mon projet de thèse.

N'oubliez jamais de sourire... on ne sait jamais, la personne en face de vous peut en avoir besoin. Merci à tous.

Merci Déborah, être dans la même équipe que toi m'a permis de devenir une meilleure version de moi-même.

"If you're going through hell, keep going."

Winston Churchill

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| PREAMBULE ET PROBLEMATIQUE | 1 |
| ÉTAT DE L'ART | 4 |
| I. Le système vasculaire et ses pathologies | 4 |
| A. Le système vasculaire | 4 |
| B. Composition de la paroi artérielle | 5 |
| C. Les pathologies associées et leurs thérapies | 7 |
| 1. Les principales maladies cardiovasculaires | 7 |
| a. L'anévrisme | 7 |
| b. L'athérosclérose | 8 |
| 2. Les méthodes thérapeutiques dans le cas d'une athérosclérose de l'artère coronaire | 10 |
| a. La prévention, au cœur de la politique de santé globale | 10 |
| b. Les traitements | 10 |
| i. Dans les cas modérés | 10 |
| ii. Dans les cas extrêmes | 11 |
| L'endartériectomie | 11 |
| L'angioplastie | 12 |
| Le pontage vasculaire autologue, le cas du pontage coronaire | 13 |
| 3. Autres contextes nécessitant un pontage vasculaire de petit diamètre | 15 |
| a. Le cas de l'insuffisance rénale chronique : le shunt artérioveineux | 15 |
| b. Le cas de pontage vasculaire dans un contexte pédiatrique | 16 |
| II. L'ingénierie tissulaire vasculaire | 16 |
| A. Les différents types d'échafaudages investigués | 19 |
| 1. Les scaffolds vasculaires synthétiques | 20 |
| 2. Les scaffolds vasculaires naturels | 21 |
| 3. Les scaffolds vasculaires biosynthétiques | 21 |
| B. Les différentes cellules utilisées en ingénierie vasculaire | 22 |
| C. Les différents types d'apport au microenvironnement | 23 |
| D. Les différentes méthodes d'assemblage proposées. | 24 |
| E. La cellularisation de la surface luminale, différentes approches | 26 |
| III. L'étude des propriétés mécaniques des substituts vasculaires | 27 |
| A. Comportement mécanique des vaisseaux sanguins | 28 |
| 1. La non-linéarité | 28 |
| 2. L'anisotropie | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3. | La viscoélasticité | 29 |
| 4. | La compliance et l'élastance | 30 |
| B. | Caractérisation des vaisseaux sanguins et substituts | 30 |
| 1. | La norme ANSI/ISO 7198:2016 : Implants cardiovasculaires et systèmes extracorporels — Prothèses vasculaires — Greffons vasculaires tubulaires et pièces vasculaires | 30 |
| 2. | Les principaux tests mécaniques retrouvés dans la littérature | 30 |
| a. | Test de pression à l'éclatement | 30 |
| b. | La compression, ou traction, uniaxiale incrémentée. | 31 |
| c. | Tests cycliques, l'analyse mécanique dynamique (DMA) | 31 |
| IV. | L'évaluation préclinique des substituts vasculaires | 32 |
| A. | But et mise en œuvre | 32 |
| B. | Les différents modèles animaux en ingénierie tissulaire vasculaire | 33 |
| 1. | Les modèles « petit animal » | 35 |
| a. | Les modèles murins | 35 |
| b. | Le modèle lagomorphe | 35 |
| 2. | Les modèles « gros animal » | 36 |
| a. | Le modèle primate non humain | 36 |
| b. | Le modèle ovin | 36 |
| c. | Le modèle canin | 37 |
| d. | Le modèle porcin | 37 |
| 3. | Les futures alternatives ? | 37 |
| V. | Notre greffon SMILING | 38 |
| A. | Les fondements (la philosophie) du greffon SMILING | 38 |
| B. | Le cordon ombilical humain | 39 |
| C. | Le matériel ombilical, composants de notre greffon SMILING | 40 |
| 1. | Les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton | 40 |
| 2. | L'artère ombilicale | 43 |
| 3. | La gelée de Wharton | 44 |
| D. | Les résultats antérieurs de l'équipe | 45 |
| | OBJECTIFS DE MA THESE | 46 |
| | MATERIELS ET METHODES | 49 |
| A. | Les études <i>in vitro</i> | 49 |
| 1. | Les composants du greffon vasculaire | 49 |
| a. | La récupération des cordons ombilicaux humains | 49 |

| | | |
|------|---|----|
| b. | Dissection des cordons ombilicaux et extraction des différents composants du greffon vasculaire | |
| | 49 | |
| c. | Contrôle qualité des artères ombilicales par observation histologique | 50 |
| d. | Contrôle qualité des hCSM-GW par cytométrie en flux | 51 |
| e. | La préparation de la MEC-GW | 52 |
| f. | L'extraction de la MEC-GW en acide acétique 0,5 M | 52 |
| 2. | La caractérisation de la MEC-GW extraite en acide acétique | 53 |
| a. | Analyse du contenu en ADN | 53 |
| i. | Extraction d'ADN, dosage et migration sur gel d'agarose | 53 |
| b. | L'analyse du contenu protéique | 54 |
| i. | Analyse protéomique | 54 |
| ii. | Quantification de différentes protéines d'intérêt | 55 |
| | Dosage des protéines totales : le dosage BCA | 55 |
| | Dosage du collagène : le dosage de Bradford amélioré | 56 |
| | Dosage des glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés | 56 |
| c. | Le dépôt de la MEC-GW, méthodes d'obtention (dip coating) et d'observation. | 57 |
| i. | Observation du dépôt par marquage fluorescent de la MEC-GW | 57 |
| ii. | Observation du dépôt par microscopie à force atomique (AFM) | 58 |
| d. | L'étude de la cytocompatibilité du coating de la MEC-GW | 58 |
| i. | L'activité métabolique des hCSM-GW | 58 |
| ii. | La prolifération cellulaire | 59 |
| iii. | La cytotoxicité de la MEC | 59 |
| e. | Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW | 60 |
| f. | Étude de l'effet de l'application du coating de MEC-GW sur la surface luminale du greffon | 60 |
| 3. | Le projet MHUFIN ou la fonctionnalisation de la MEC-GW | 61 |
| a. | Ajout d'une composante anticoagulante | 61 |
| i. | Incorporation directe de l'héparine | 61 |
| ii. | Validation du dépôt de la MEC héparinée | 61 |
| iii. | Cytocompatibilité de la MEC héparinée | 62 |
| iv. | Étude du relargage de l'héparine active par le coating de MEC-GW héparinée | 62 |
| v. | Test de thrombogénicité du coating de MEC-GW héparinée | 63 |
| b. | Ajout d'une composante immunomodulatrice | 63 |
| i. | Optimisation du sécrétome anti-inflammatoire des hCSM-GW | 63 |
| | Traitements pro-inflammatoires des hCSM-GW | 63 |
| | Analyse du milieu par Multiplex (LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1, BioLegend 740808) | 64 |
| | Analyse du milieu par la méthode ELISA | 64 |

| | | |
|------|--|-----------|
| ii. | Production et caractérisation d'un pool de secrétome anti-inflammatoire suite au traitement des cellules par Mix 2 | 65 |
| | Production du pool de secrétome anti-inflammatoire d'hCSM-GW | 65 |
| | Caractérisation du pool de secrétome anti-inflammatoire d'hCSM-GW | 66 |
| 4. | La production du greffon SMILING | 66 |
| 5. | La caractérisation du greffon vasculaire | 68 |
| a. | Suivi histologique de la paroi vasculaire au cours de la production du greffon | 68 |
| b. | Analyse de la thrombogénicité du greffon au cours de sa fabrication | 68 |
| c. | Analyse des propriétés mécaniques du greffon au cours de sa fabrication | 69 |
| i. | Test de pression à l'éclatement | 69 |
| ii. | Test d'étirement à la rupture | 70 |
| iii. | Test de compression en DMA (Dynamic Mechanical analysis) | 71 |
| B. | L'évaluation <i>in vivo</i> de notre greffon vasculaire | 72 |
| 1. | Les points limites de l'étude | 72 |
| 2. | La préparation préopératoire | 72 |
| 3. | Les différents protocoles chirurgicaux effectués | 73 |
| a. | Pontage de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) <i>via</i> l'artère mammaire | 73 |
| b. | Remplacement d'un segment de l'artère fémorale | 74 |
| c. | Remplacement d'un segment de l'artère carotide | 74 |
| 4. | Le suivi post-opératoire | 74 |
| 5. | Analyses histologiques | 75 |
| a. | Colorations hématoxyline-éosine (HE) et hématoxyline-éosine-safran | 75 |
| b. | Marquage immunohistologique des macrophages porcins | 76 |
| C. | Tests statistiques | 77 |
| | RESULTATS | 78 |
| A. | Les études <i>in vitro</i> | 78 |
| 1. | Les composants du greffon vasculaire | 78 |
| a. | Le scaffold | 78 |
| b. | La composante cellulaire, caractérisation par cytométrie de flux | 80 |
| 2. | La caractérisation de la MEC-GW extraite en acide acétique | 81 |
| a. | L'analyse du contenu en acides nucléiques | 81 |
| b. | L'analyse du contenu protéique | 82 |
| i. | Analyse protéomique | 82 |
| ii. | Quantification de différentes protéines d'intérêt | 84 |
| c. | Le dépôt de la MEC-GW | 86 |
| | Observation indirecte par fluorescence | 86 |
| | Observation directe par AFM | 87 |

| | | |
|------|---|-----|
| d. | Cytocompatibilité | 88 |
| e. | Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW | 90 |
| f. | Étude de l'effet de l'application du coating de MEC-GW sur la surface luminale du greffon | 92 |
| 3. | La fonctionnalisation de la MEC-GW | 94 |
| a. | Ajout d'une composante anticoagulante pour le contexte vasculaire | 95 |
| i. | Validation du dépôt des MEC-GW héparinées | 95 |
| ii. | Cytocompatibilité du coating de la MEC-GW héparinée | 96 |
| iii. | Étude du relargage de l'héparine par le coating de MEC-GW héparinée | 98 |
| iv. | Évaluation de l'hémocompatibilité du coating de MEC-GW héparinée | 100 |
| b. | Ajout d'une composante immunomodulatrice | 101 |
| i. | Analyse du sécrétome anti-inflammatoire des hCSM-GW, choix du meilleur traitement | 101 |
| ii. | Analyse du pool de sécrétome anti-inflammatoire produit en plus grande quantité | 107 |
| 4. | Caractérisation du greffon vasculaire développé par ingénierie tissulaire | 109 |
| a. | Optimisation de l'étape de cellularisation | 109 |
| b. | Analyse de l'hémocompatibilité du greffon au cours de sa fabrication | 111 |
| c. | Analyse des propriétés mécaniques du greffon au cours de sa fabrication | 113 |
| i. | Test de pression à l'éclatement | 113 |
| ii. | Test d'étirement longitudinal à la rupture | 114 |
| iii. | Test DMA en compression | 115 |
| B. | L'étude <i>in vivo</i> | 116 |
| 1. | Pontages mammo-coronaires | 117 |
| 2. | Pontages fémoraux | 117 |
| a. | Nicolas, 2 semaines d'implantation | 117 |
| i. | Perméabilité du greffon à l'implantation | 118 |
| ii. | Suivi sanguin de l'animal | 119 |
| iii. | Perméabilité du greffon à l'explantation | 120 |
| iv. | Analyse histologique du substitut récupéré après 2 semaines d'implantation | 121 |
| b. | Implantation de 7 semaines | 121 |
| i. | Le greffon implanté | 121 |
| ii. | Perméabilité du greffon à l'implantation | 122 |
| iii. | Suivi sanguin des animaux | 122 |
| iv. | Suivi de la perméabilité par échographie Doppler | 124 |
| v. | Récupération, imagerie et histologie | 125 |
| 3. | Pontages carotidiens | 126 |
| a. | Perméabilité du greffon à l'implantation | 126 |
| b. | Suivi sanguin des animaux | 127 |
| c. | Suivi de la perméabilité par échographie Doppler | 128 |
| d. | Récupération, imagerie et histologie | 129 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 131 |
| I. L'étude de la MEC-GW | 131 |
| A. La caractérisation du biomatériau | 131 |
| B. La fonctionnalisation de la MEC-GW | 134 |
| II. L'étude <i>in vitro</i> du greffon vasculaire | 136 |
| III. L'étude <i>in vivo</i> du greffon vasculaire | 140 |
| CONCLUSION | 144 |
| BIBLIOGRAPHIE | 148 |
| ANNEXES | 170 |

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Schéma général du système vasculaire | 4 |
| Figure 2. Structure de l'artère, disposition des différentes tuniques vasculaires. | 5 |
| Figure 3. Illustration d'un anévrisme cérébral (27) à gauche et d'un anévrisme coronarien à droite (28). | 8 |
| Figure 4. Développement de la plaque d'athérome au sein d'une artère obstruant progressivement la lumière interne du vaisseau touché. | 9 |
| Figure 5. Schéma de la composition d'une plaque athéromateuse (33). | 10 |
| Figure 6. Étapes de la procédure suivie lors d'une endartériectomie (40). | 11 |
| Figure 7. Principes de la technique d'angioplastie, avec mise en place d'une endoprothèse métallique (41). | 12 |
| Figure 8. Schéma de mise en place des différents vaisseaux autologues lors d'un pontage coronarien (49). | 13 |
| Figure 9. Schéma d'une hémodialyse effectuée via une fistule artério-veineuse prothétique. | 15 |
| Figure 10. Triade de l'Ingénierie Tissulaire ainsi que les différents matériaux utilisés comme échafaudage (64). | 17 |
| Figure 11. Les différentes méthodes d'assemblage retrouvées dans la fabrication de substituts vasculaires testés in vivo (102). | 25 |
| Figure 12. Courbe du diamètre artériel en fonction de la pression appliquée : le comportement non linéaire des vaisseaux sanguins. | 28 |
| Figure 13. Contraintes appliquées aux vaisseaux sanguins. | 29 |
| Figure 14. La règle des 3 R, principes fondamentaux de l'expérimentation animale. | 33 |
| Figure 15. Développement du cordon ombilical humain, des premiers stades fœtaux, jusqu'au terme de la grossesse. | 39 |
| Figure 16. Description des différents composants du cordon ombilical | 39 |
| Figure 17. Effets des CSM sur les différentes cellules du système immunitaire. | 41 |
| Figure 18. Mise en place des échantillons artériels entre les mors afin de réaliser les expériences d'étirement à la rupture. | 70 |
| Figure 19. Mise en place des échantillons dans le cadre d'une analyse mécanique dynamique (DMA). | 71 |
| Figure 20. Étude histologique de l'intégrité de la paroi vasculaire au cours du temps selon le milieu de conservation utilisé par coloration hématoxyline-éosine. | 78 |
| Figure 21. Coloration hématoxyline-éosine sur coupe d'artères ombilicales avant et après application du protocole de décellularisation. | 79 |
| Figure 22. Exemple de la caractérisation des hCSM-GW par cytométrie en flux selon la combinaison de marqueurs spécifiques établit par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire : | 80 |
| Figure 23. Analyse du contenu en acides nucléiques du tissu natif de la GW en comparaison à celui retrouvé dans MEC-GW après extraction en acide acétique 0,5 M. | 81 |
| Figure 24. Profils Nano HPLC des différentes MEC-GW composant le pool de caractérisation | 83 |
| Figure 25. Analyse en composantes principales selon deux axes reflétant les différences entre les différents réplicats des chacune de MEC-GW. | 83 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 26. Analyses quantitatives de la MEC-GW, selon les différentes MEC-GW composant le pool (en haut), puis graphique représentant les résultats globaux (en bas).</i> | 84 |
| <i>Figure 27. Observations en microscopie à fluorescence du dépôt obtenu avec la MEC-GW.</i> | 86 |
| <i>Figure 28. Analyse en microscopie à force atomique du dépôt de la MEC-GW sur lamelle de verre traitée.</i> | 87 |
| <i>Figure 29. Étude de la cytocompatibilité du coating de la MEC-GW extraite en acide acétique sur une période de 12 jours de culture.</i> | 88 |
| <i>Figure 30. Thrombogénicité du coating de la MEC-GW.</i> | 90 |
| <i>Figure 31. Suivi optique de la prolifération cellulaire à la surface luminale d'artère ombilicale humaine selon la présence ou non d'un coating de MEC-GW.</i> | 92 |
| <i>Figure 32. Observation en macroscopie à fluorescence, à J7 du recouvrement luminal d'artères ombilicales humaines selon l'application préalable ou non d'un coating de MEC-GW.</i> | 94 |
| <i>Figure 33. Observations au microscope à épifluorescence du dépôt obtenu selon le dosage d'héparine (0 ; 0,05 ; 2,5 ; et 5 UI/mL) appliqué à la MEC-GW.</i> | 95 |
| <i>Figure 34. Étude de la cytocompatibilité du dépôt de MEC-GW à différentes concentrations d'héparine sur une période de 12 jours de culture.</i> | 96 |
| <i>Figure 35. Analyse de la cinétique de relargage de l'héparine suite au dépôt de MEC-GW héparinée à 2,5 UI/mL.</i> | 99 |
| <i>Figure 36. Cinétique de la thrombogénicité du coating de la MEC-GW en fonction de la concentration en héparine.</i> | 100 |
| <i>Figure 37. Analyse de la sécrétion d'IL-33 et d'IL-10 selon le traitement appliqué aux hCSM-GW.</i> | 102 |
| <i>Figure 38. Analyses de la sécrétion des cytokines d'intérêt par les hCSM-GW (en pg/mL en fonction de la quantité d'ADN) selon les traitements retenus Mix 1 et Mix 2 à 24 h et 48 h.</i> | 104 |
| <i>Figure 39. Analyse de la sécrétion des cytokines d'intérêt par les hCSM-GW (en pg/mL en fonction de la quantité d'ADN). Comparaison des conditions 24 h et 48 h pour le Mix 1 et Mix 2.</i> | 105 |
| <i>Figure 40. Concentrations en MCP-1 et IL-6 du pool de sécrétome anti-inflammatoire produit pour les essais de fonctionnalisation de la MEC-GW.</i> | 107 |
| <i>Figure 41. Suivi de la cellularisation à la surface luminale du greffon par observation en microscopie à épifluorescence de la surface luminale de la prolifération cellulaire via le marquage Dil.</i> | 109 |
| <i>Figure 42. Suivi de la thrombogénicité de greffon au cours de sa production.</i> | 111 |
| <i>Figure 43. Impact de la décellularisation sur la résistance à la pression interne de l'artère ombilicale humaine.</i> | 113 |
| <i>Figure 44. Test d'étirement à la rupture : Impact des différentes étapes appliquées au cours du protocole de fabrication du substitut vasculaire sur les propriétés mécaniques de l'artère ombilicale humaine.</i> | 114 |
| <i>Figure 45. Analyse mécanique dynamique : Impact des différentes étapes appliquées au cours du protocole de fabrication du substitut vasculaire sur le facteur d'amortissement de l'artère ombilicale humaine.</i> | 115 |
| <i>Figure 46. Observation du site d'implantation avant et après la greffe vasculaire, suivi de la validation de la circulation sanguine par échographie Doppler.</i> | 118 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 47. Suivi de la numération sanguine de l'animal sur une période de 14 jours après implantation vasculaire.</i> | 119 |
| <i>Figure 48. Échographie Doppler du greffon vasculaire après 2 semaines d'implantation.</i> | 120 |
| <i>Figure 49. Observation histologique de la paroi vasculaire du substitut après 2 semaines d'implantation fémorale par coloration à l'hématoxyline-éosine.</i> | 121 |
| <i>Figure 50. Observation histologique du greffon vasculaire implanté par coloration en hématoxyline-éosine.</i> | 121 |
| <i>Figure 51. Contrôle de la perméabilité du greffon vasculaire par angiographie post-implantation.</i> | 122 |
| <i>Figure 52. Numération sanguine au cours de la période de greffe vasculaire.</i> | 123 |
| <i>Figure 53. Contrôle de la perméabilité du greffon au cours de la période de greffe (J9) par une méthode non invasive : l'échographie Doppler</i> | 124 |
| <i>Figure 54. Analyse histologique par coloration en hématoxyline éosine de l'échantillon récupéré après 50 jours de greffe vasculaire.</i> | 125 |
| <i>Figure 55. Implantation du greffon vasculaire.</i> | 126 |
| <i>Figure 56. Numération sanguine des animaux implantés selon le modèle de pontage carotide.</i> | 127 |
| <i>Figure 57. Suivi de la perméabilité de greffon par échographie Doppler.</i> | 128 |
| <i>Figure 58. Planche histologique d'un greffon après 6 semaines d'implantation.</i> | 129 |

Liste des abréviations

ACBS : Animalerie centrale du campus Brabois Santé

AFM : Microscopie à force atomique

ANR : Agence nationale de la recherche

BCA : Dosage protéique par la méthode à l'acide bicinchronique

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

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CML : Cellule musculaire lisse

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

Dil : 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetraméthylindocarbocyanine Perchlorate

DMB : 1,9-diméthylméthylène bleu

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiothreitol

EC : Cellule endothéliale

ePTFE : Polytetrafluoroéthylène expansé

FMO : Fluorescences moins une

GB : Globule blanc

GR : Globule rouge

GW : Gelée de Wharton

HBSS : Solution saline tamponnée de Hank

HCl : Acide chlorhydrique

HE : Hématoxyline-éosine

HES : Hématoxyline-éosine-safran

HPS : Tampon salin HEPES

hiPSC: Cellules pluripotentes humaines reprogrammées

HUVEC : Cellule endothéliale de la veine ombilicale humaine

IAA : Iodoacetamide

IDO : Indolamine 2, 3-dioxygénase

IGF-1 : Facteur de croissance insulino-like

IVA : Artère interventriculaire antérieure

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Lipoprotéine de faible densité

MCV : Maladies cardiovasculaires

MEC : Matrice extracellulaire

MTT : 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-
2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NFS : Numération de la formulation
sanguine

NO : Monoxyde d'azote

NS : Non stimulé

PBS : Phosphate-buffered saline

PCL : Poly- ϵ -caprolactone

PGA : Acide polyglycolique

PLA : Acide polylactique

RPM : Rotations par minute

TEVG : Greffon produit par ingénierie
vasculaire

SD : Écart type

SDS : Dodecylsulfate de sodium

SEM : Erreur standard de la moyenne

SVF : Sérum de veau fœtal

TA : Température ambiante

Préambule et problématique

A l'heure actuelle, les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité dans le monde représentant près d'un tiers de l'ensemble des décès (32 %). Chaque année ce nombre ne cesse d'augmenter et pourrait atteindre jusqu'à 23,3 millions de décès dans le monde en 2030 (1). En terme économique, la prise en charge de ces maladies en France a représenté 15 milliards d'euros en 2013 (2). Parmi ces pathologies, les cardiopathies coronariennes, les artériopathies obstructives des membres inférieurs, les anévrismes de l'aorte abdominale ainsi que les maladies cérébrovasculaires sont les principales contributrices de ces décès et dépenses...

Une grande partie de ces MCV est principalement due à une athérosclérose, maladie inflammatoire impliquant la paroi vasculaire. Cette maladie chronique consistant en la progression d'une plaque graisseuse, nommée plaque d'athérome, est caractérisée par l'accumulation progressive de cellules spumeuses dans la couche endothéliale du vaisseau sanguin (3). Cette plaque devient sténosante et subit une calcification au cours du temps, responsable d'une obstruction induisant une ischémie partielle des tissus irrigués en aval. La rupture de cette plaque d'athérome peut provoquer le déclenchement d'une thrombose (4). Selon la localisation de la plaque d'athérome dans l'arbre vasculaire, l'athérosclérose peut causer des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux ou toutes autres artériopathies obstructives (5).

L'accélération du développement de l'athérosclérose est principalement due à des facteurs environnementaux comme l'âge, la sédentarité, le cholestérol, le tabagisme, etc. (3). Ainsi les premiers traitements dans les cas les plus légers consistent à réguler le régime alimentaire du patient afin de ralentir sa progression. Des traitements médicamenteux sont également indiqués, comme la prise de statine ou de bêtabloquants (6). A partir d'un certain seuil d'obstruction de la lumière artérielle par cette plaque, des interventions cliniques sont possibles afin de rétablir une circulation sanguine correcte. La première intervention envisagée est l'angioplastie, consistant en l'insert d'un ballonnet dans la lumière de l'artère dans le but de comprimer la plaque et rétablir ainsi une circulation sanguine appropriée ; à cela peut s'ajouter la pose d'un stent dans le but de maintenir la lumière artérielle ouverte (7). Bien que d'une clinique

courante, les effets de ces actes ne sont que rarement pérennes et nécessitent très souvent une nouvelle intervention suite à une resténose (rétrécissement de la lumière du vaisseau localisée sur le site traité) (8). Le pontage vasculaire reste alors l'un des traitements les plus efficaces assurant une revascularisation efficace à long terme. Il s'agit d'un contournement de la région obstruée (en anglais : bypass) à l'aide de vaisseaux autologues ou synthétiques selon le contexte artériel (gros, moyen ou petit calibre). Dans le cas d'un bypass à l'aide d'un vaisseau autologue, l'intervention nécessaire est très invasive et implique d'extraire un vaisseau autologue (artère mammaire ou veine saphène) afin de l'utiliser pour créer une dérivation de la circulation sanguine, permettant ainsi de contourner l'obstruction artérielle (9).

Les artères et les veines autologues sont privilégiées pour les greffes vasculaires, mais leur utilisation est limitée par leur faible disponibilité et leur qualité variable (présence de varices), ainsi que par les complications liées à leur prélèvement (infections, lésions tissulaires, récupération à long terme...) (10). Ces limitations constituent un véritable obstacle à l'utilisation de vaisseaux autologues, et un véritable problème de santé publique dans le contexte des vaisseaux sanguins de faible diamètre pour lequel aucun substitut adéquat n'est encore proposé. Les greffons vasculaires de petit calibre sont donc devenus l'un des domaines les plus étudiés et les plus difficiles à construire en médecine régénérative.

Les premiers substituts développés en recherche sont des greffons vasculaires produits à l'aide de matériaux synthétiques comme le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) ou le polyester (polytéréphtalate d'éthylène, Dacron). Ceux-ci se sont avérés utilisables dans le cadre de pontage de vaisseaux sanguin de gros diamètre (>6 mm) mais sont cause de thromboses dans le cadre de remplacement de vaisseaux de petit diamètre (<6 mm), comme dans le cas de artères coronaires (11,12) qui est l'une des finalités de ce travail. Cette restriction est principalement due à l'absence d'une couche cellulaire à la surface luminale du greffon jouant un rôle d'interface avec la circulation sanguine. L'absence de la composante cellulaire est responsable de l'adhésion de protéines sanguines à la paroi du substitut induisant l'activation des mécanismes de coagulation (13,14). De plus, les greffons synthétiques étant inertes, ils ne montrent aucune possibilité ni de croissance, ni d'adaptation au microenvironnement impactant la vasomotion (15).

C'est dans ce contexte qu'est né le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire, une approche multidisciplinaire ayant pour but de produire un greffon vasculaire utilisable dans le cadre de remplacement de vaisseaux de petit diamètre. Ces greffons peuvent être complètement fabriqués à partir de matériaux naturels, ou hybrides, par combinaison de produits synthétiques et de biomatériaux. Ils peuvent être fonctionnalisés à l'aide de différents types cellulaires ou de molécules antiagrégantes. Plusieurs équipes travaillent à l'heure actuelle sur un substitut utilisable dans ce contexte, et de multiples méthodes de fabrication sont étudiées pour produire des substituts autologues, allogènes ou encore xénogènes. Certains de ces substituts, après avoir été étudiés en contexte préclinique, ont également été testés en clinique.

Mon projet de thèse s'inscrit dans ce domaine d'ingénierie tissulaire vasculaire et a pour objectif de construire un greffon vasculaire de petit diamètre, à partir d'éléments naturels, d'origine humaine, provenant exclusivement de cordons ombilicaux. Dans le but de proposer le substitut vasculaire le plus abouti possible, ses composants ont d'abord été optimisés indépendamment, puis des études d'assemblage ont également été menées afin de maximiser leurs interactions. Après cette période de maturation du projet, des études *in vivo* chez le porc ont été réalisées dans différents contextes de pontages artériels et le comportement du greffon a été analysé.

État de l'art

I. Le système vasculaire et ses pathologies

A. Le système vasculaire

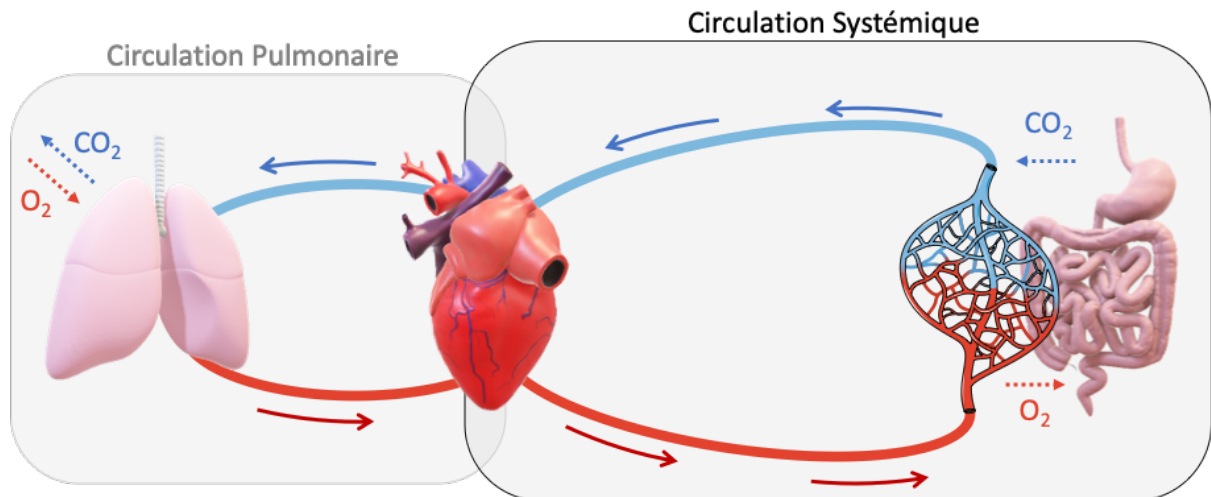


Figure 1. Schéma général du système vasculaire

Depuis que l'Homme a remarqué la corrélation entre la mort et le saignement, le sang et plus généralement le système vasculaire a suscité beaucoup d'intérêt. La découverte précoce de l'importance de ce système dans l'histoire de l'humanité a mené les hommes à y rechercher des réponses. De nombreuses spéculations ont été faites au cours du temps sur le rôle du sang ainsi que sur son origine. Ce n'est qu'au XIII^{ème} siècle que la première description correcte de la circulation pulmonaire est écrite par Ibn al-Nafis, un médecin théologien exerçant au Caire (16). Depuis cette description, la connaissance de l'appareil circulatoire a grandement évolué mais de nombreux aspects de ce système nous sont encore inconnus.

Sans entrer dans les détails, on peut schématiquement représenter le système vasculaire comme un système complexe ayant pour but de faire circuler le sang au sein de l'organisme apportant ainsi oxygène et nutriments aux différents organes tout en les débarrassant des divers déchets produits (Figure 1). Ce système permet également le transport d'une multitude d'hormones et autres productions cellulaires

atteignant leur cellules cibles via la circulation sanguine, jusqu'au transport de cellules souches, et abrite une grande partie du système immunitaire (17). Chez les mammifères, la circulation sanguine est assurée par des conduits et une pompe qui sont respectivement les vaisseaux sanguins et le cœur. Elle est divisée en deux circulations complémentaires : la circulation systémique visant à acheminer le sang oxygéné aux différents organes, et la circulation pulmonaire responsable des échanges gazeux, afin de subvenir aux besoins en oxygène du corps et le débarrasser du CO₂ (18).

B. Composition de la paroi artérielle

Le système vasculaire est constitué de 2 types de vaisseaux : artère et veine dont la composition pariétale se différencie selon la fonction et la situation du vaisseau, mais présente en commun une surface luminale colonisée par des cellules endothéliales.

Dans cet exposé, nous nous concentrerons uniquement sur l'architecture histologique de l'artère qui est au cœur de notre travail.

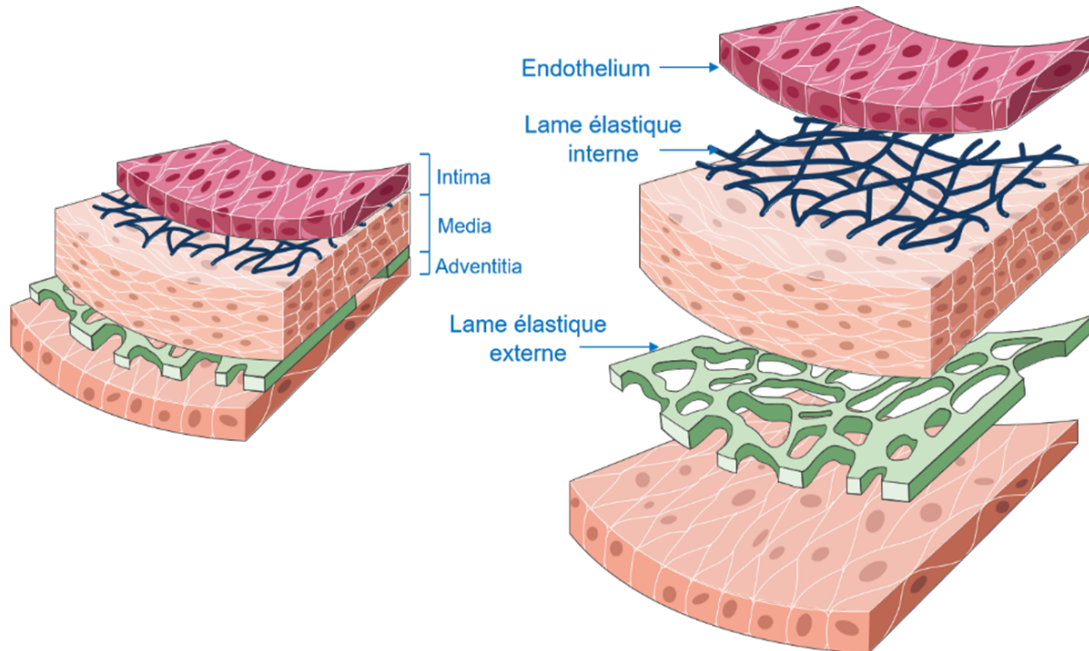


Figure 2. Structure de l'artère, disposition des différentes tuniques vasculaires.

Les vaisseaux sanguins sont en grande majorité composés de trois couches histologiques, ou « tuniques », contenant des proportions différentes de cellules propres aux vaisseaux (fibroblastes, cellules musculaires lisses et endothéliales),

d'élastine et de collagène (19). Ainsi, en partant de la lumière du vaisseau jusqu'à sa périphérie, nous retrouvons dans l'ordre : la *tunica intima*, la *tunica media* et la *tunica adventitia* (Figure 2). Toutes trois jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie, ainsi que dans la réponse du vaisseau aux différents stimuli nerveux et/ou mécaniques.

La tunique au contact direct avec le sang est l'intima, c'est une surface hémocompatible représentant, dans le corps humain, entre 3000 et 6000m² (20). Elle est la plus fine tunique composant la paroi artérielle et est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) nommée « endothélium ». Ces CE reposent sur une lame basale et jouent un rôle majeur dans différents mécanismes comme la coagulation, l'inflammation, ... Dans le cas des artères musculaires, cette structure est bordée par une lame élastique nommée « limitante élastique interne » qui assure la flexibilité de l'endothélium(19).

La média est la deuxième tunique, la plus épaisse des trois, et est composée principalement de cellules musculaires lisses (CML), de collagène, ainsi que de fibres élastiques disposées en faisceaux longitudinaux ou transversaux. La proportion de ces différents composants varie selon le type d'artère (musculaires ou élastiques) et confère à l'artère une capacité accrue aux variations de diamètre afin d'assurer au mieux la distribution du sang aux différents organes dans le cas des artères musculaires (situées aux abords des organes) ; ou plutôt une résistance accrue aux déformations face aux fortes pressions sanguines appliquées (situées près du cœur) dans le cas des artères élastiques vouées à distribuer le sang aux artères périphériques (21).

La *tunica adventitia* ou adventice est la tunique la plus externe, elle est principalement composée d'une matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle on peut retrouver des cellules fibroblastiques ainsi que des structures servant à l'irrigation (*vaso vasorum*) et à l'innervation (*nervi vasorum*) des vaisseaux sanguins eux-mêmes. Cette dernière couche soutient également l'intégration du vaisseau sanguin au sein du tissu environnant.

C. Les pathologies associées et leurs thérapies

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les MCV sont la première cause des décès dans le monde. En 2019 elles ont été responsables de 32 % des décès soit environ 17,9 millions (22). Parmi ces décès, près de 43 % sont survenus à la suite de cardiopathies coronariennes. Déjà trop importants, ces chiffres ne cessent d'augmenter et l'OMS estime le nombre de décès dus à ces MCV à plus de 23 millions d'ici 2030 (23).

En France, chaque jour, 400 personnes meurent à la suite d'une maladie cardiovasculaire. Elles sont la première cause de mortalité chez les femmes et les personnes de plus de 65 ans, mais touchent toutes les tranches d'âge (24). Plusieurs facteurs environnementaux et sociétaux sont responsables de la croissance de ces maladies, dont le tabagisme, le cholestérol, le diabète, l'inactivité, ou encore l'obésité (25).

1. *Les principales maladies cardiovasculaires*

a. *L'anévrisme*

L'anévrisme est une dilatation anormale de la paroi vasculaire (Figure 3) et pouvant être la conséquence d'une athérosclérose (dans 50 % des cas des anévrismes des artères coronaires (26)). Il touche le plus fréquemment les artères et peut être retrouvé notamment, au niveau de l'aorte, des artères abdominales, voire périphériques, cérébrales ou encore de l'artère hépatique. Il est même possible d'en retrouver au niveau du muscle cardiaque lui-même, ce qui trahit un précédent infarctus du myocarde.

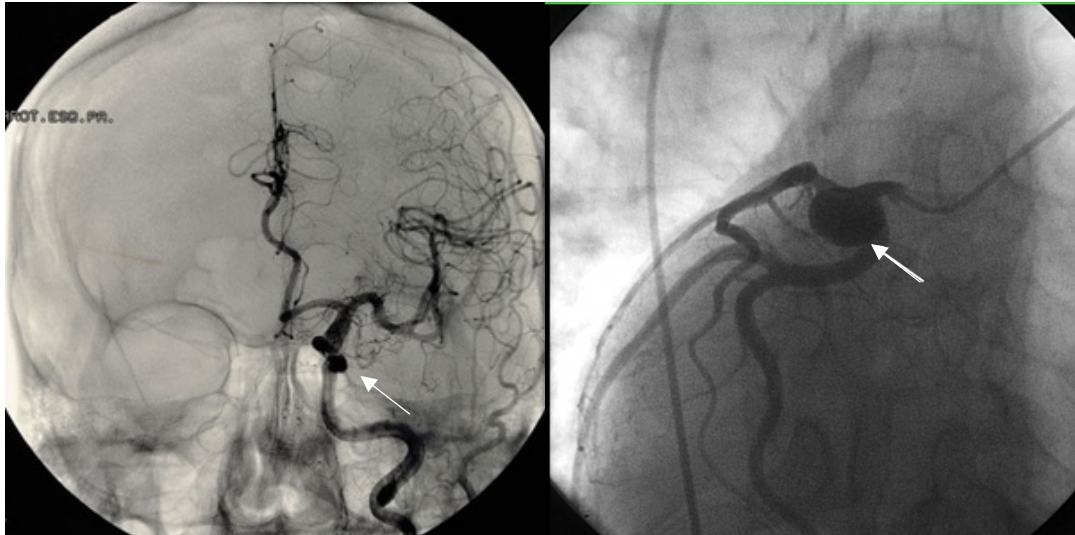


Figure 3. Illustration d'un anévrisme cérébral (27) à gauche et d'un anévrisme coronarien à droite (28).

Dans la paroi d'une artère présentant un anévrisme, une modification structurelle de la média peut être observée. En effet, la média présente une destruction des différentes fibres élastiques et de collagène, impactant fortement l'élasticité de l'artère touchée (29). La présence d'un anévrisme est préoccupante mais n'induit aucun symptôme en l'état. Cependant la santé du patient peut se dégrader subitement suite à la rupture de l'anévrisme, les symptômes et les conséquences étant localisation-dépendants. Dans le cas d'un anévrisme localisé dans une artère du cerveau, sa rupture engendre une diminution drastique du débit vasculaire cérébral fatal dans 20 % des cas. Les séquelles les plus fréquentes sont des difficultés à parler, écrire, ainsi que des problèmes de compréhension et de motricité faciale. Dans seulement 60 % des AVC, le patient récupère une indépendance, avec pourtant dans la plupart des cas, des handicaps sous-jacents comme de troubles de la concentration par exemple (30). Dans le cas d'une rupture d'anévrisme localisée au niveau de l'aorte, l'espérance de survie n'est que de 20 %.

b. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique pernicieuse se caractérisant par l'obstruction progressive de la lumière du vaisseau touché (Figure 4). Cette obstruction est la résultante de la croissance d'une plaque d'athérome. Ces plaques sont retrouvées chez chacun de nous mais ce n'est pas leur simple présence qui est dangereuse mais bien leur développement anormalement important qui va mener à

l'obstruction du vaisseau ou à la rupture d'une de ces plaques qui conduira à la formation d'un caillot sanguin dont l'instabilité peut conduire à la migration d'un embolo susceptible d'obstruer un vaisseau de plus petit calibre.

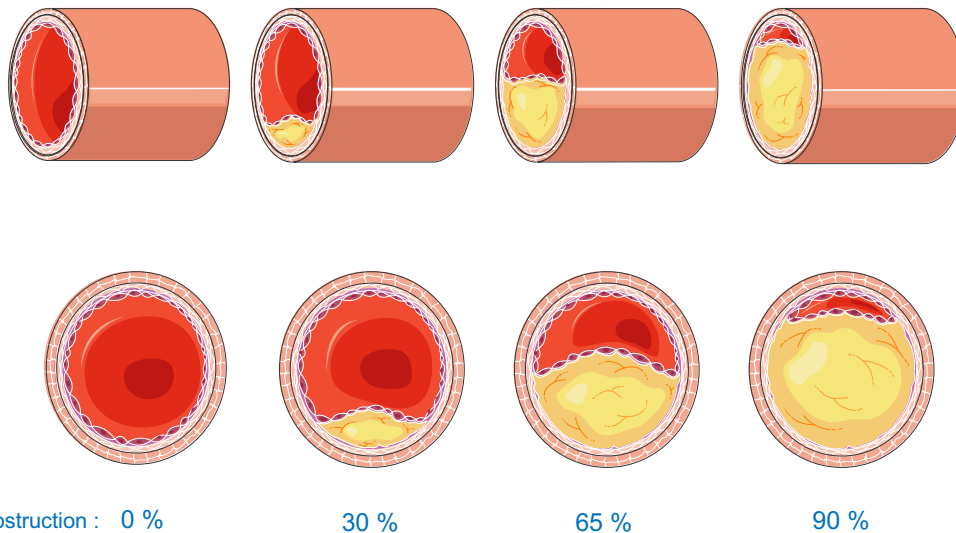


Figure 4. Développement de la plaque d'athérome au sein d'une artère obstruant progressivement la lumière interne du vaisseau touché.

L'un des facteurs favorisant la formation de ces plaques d'athéromes est la présence trop importante de graisses dans le sang. Dans ce cas, les « low-density lipoprotein » (LDL) circulantes, protéines spécialisées dans le transport du cholestérol, vont pénétrer dans la paroi artérielle au niveau du sous endothélium où elles seront oxydées puis phagocytées par des macrophages. Cette absorption n'est cependant pas régie par des mécanismes de régulation, et dans le cas d'une surcharge des macrophages par ces LDL oxydées, ceux-ci se différencient en cellules spumeuses (31,32). Ces cellules vont ainsi peupler la couche sous endothéliale et s'y accumuler au cours du temps. Cependant toutes ces étapes ne sont pas causes de symptômes, et cela grâce au remodelage vasculaire qui va compenser la croissance de la plaque d'athérome en déformant la paroi vasculaire, limitant ainsi le rétrécissement du diamètre luminal de l'artère. Ce remodelage a cependant des limites, et à partir d'un certain seuil de développement (chez la majorité des patients après 40 ans), la plaque d'athérome engendre une sténose du vaisseau touché. À ce stade, la plaque d'athérome est composée principalement d'un centre lipidique formé par des lipides extracellulaires, des macrophages spumeux, de monocytes, des lymphocytes T, des

cellules géantes ainsi que des cellules musculaires lisses. Ce noyau fibreux est entouré d'une chape fibreuse elle-même recouverte de cellules endothéliales (Figures 4 et 5) (31).

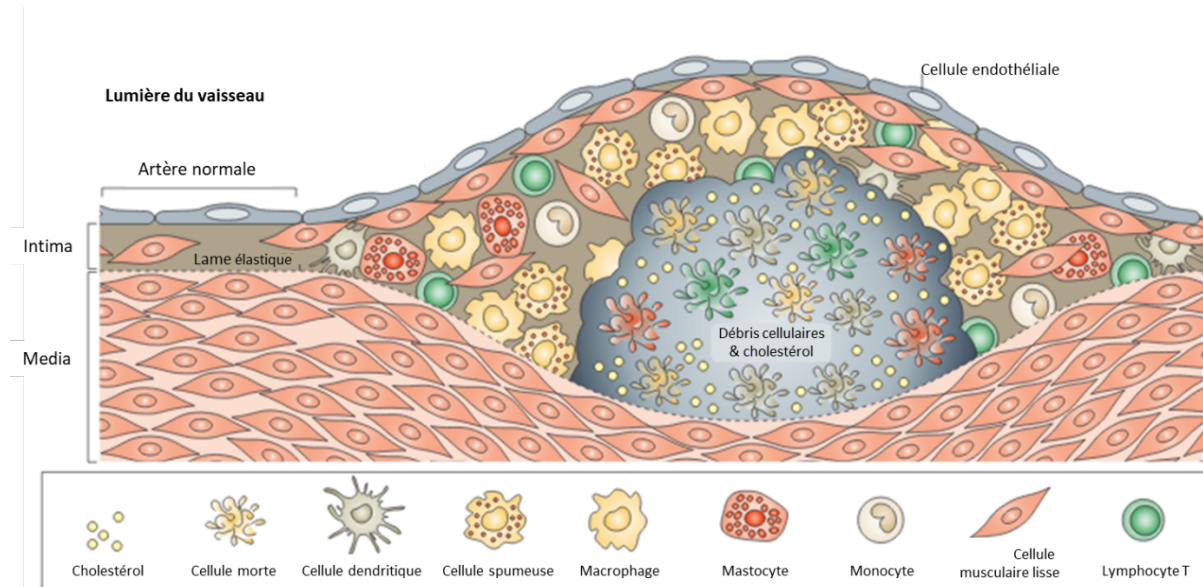


Figure 5. Schéma de la composition d'une plaque athéromateuse (33).

2. Les méthodes thérapeutiques dans le cas d'une athérosclérose de l'artère coronaire

a. La prévention, au cœur de la politique de santé globale

La question de la prévention est centrale dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires et celle-ci va de pair avec la lutte contre l'obésité. Ainsi, les gouvernements et les organisations de santé œuvrent depuis de nombreuses années afin de sensibiliser la population, dès son plus jeune âge, sur la question de l'alimentation, ainsi que sur la pratique régulière d'une activité sportive (34). En plus de ces problématiques, les gouvernements ont mis en place des politiques de luttes actives contre le tabagisme et l'excès de la consommation d'alcool, qui sont également des facteurs de risques (35).

b. Les traitements

i. Dans les cas modérés

Dans les stades les plus précoces de ces maladies cardiovasculaires plusieurs thérapies sont applicables. De façon synthétique, on peut décrire des traitements antiplaquettaires sur la base d'une association d'aspirine et de statine, notamment administrés aux patients dans le but de fluidifier le sang et de diminuer la synthèse du

cholestérol, limitant ainsi la formation de thrombus (6,36). D'autres traitements sont également utilisés en clinique, l'on peut noter l'utilisation de bêtabloquants visant à diminuer l'activité cardiaque (6,37), ou encore d'antagonistes aux récepteurs de l'angiotensine II, dans le but d'inhiber le système rénine-angiotensine, facteur de risque dans le cas de l'athérosclérose, augmentant le stress oxydatif au niveau de la paroi artérielle et entraînant ainsi un dysfonctionnement de l'endothélium (6,38,39).

ii. Dans les cas extrêmes

Lorsque le développement de la plaque d'athérome est trop important, le temps n'étant plus à la prévention primaire ou secondaire, il est nécessaire que le patient subisse une intervention chirurgicale. Il existe différentes techniques chirurgicales afin de restaurer la perméabilité du vaisseau sténosé. Principalement, ces techniques sont l'endartériectomie, l'angioplastie ou le pontage vasculaire. Le choix de la technique se fait selon les recommandations Européennes et dépend, entre autres, du site de la sténose et du vécu du patient.

L'endartériectomie

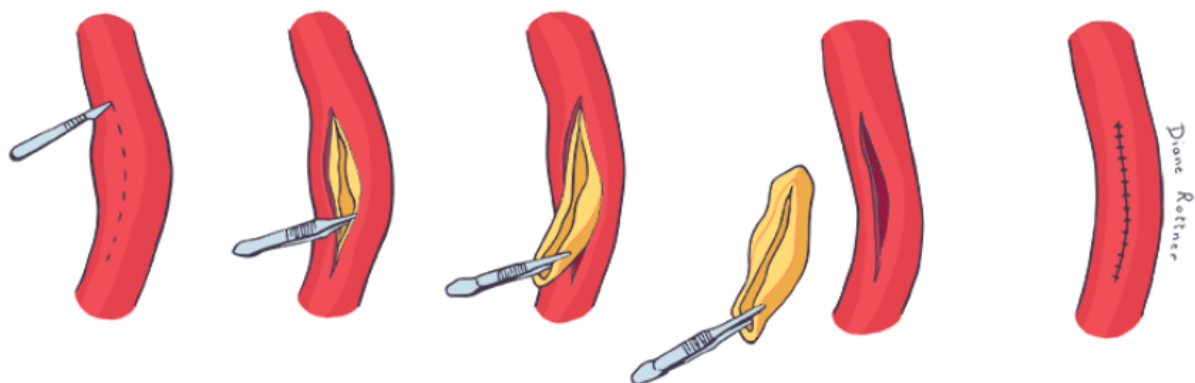


Figure 6. Étapes de la procédure suivie lors d'une endartériectomie (40).

L'endartériectomie est une opération chirurgicale qui consiste, sous anesthésie générale, en l'incision longitudinale de la paroi vasculaire au niveau de l'occlusion, ce qui permet par la suite l'extraction de la plaque athéromateuse. La paroi du vaisseau est ensuite suturée, et l'artère retrouve en principe sa fonctionnalité (Figure 6).

L'angioplastie

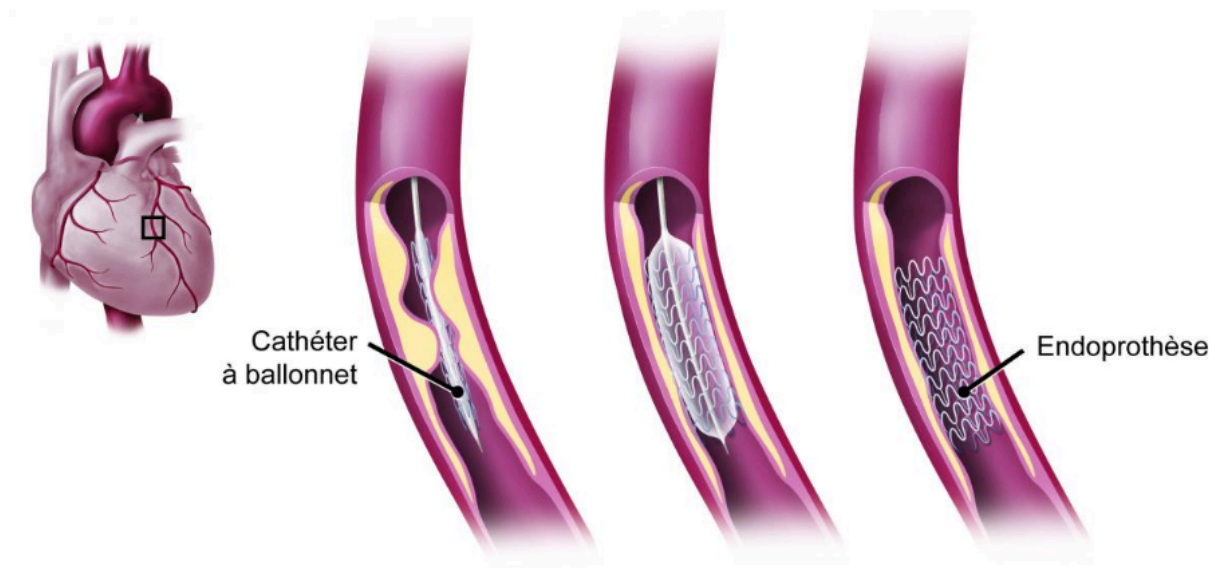


Figure 7. Principes de la technique d'angioplastie, avec mise en place d'une endoprothèse métallique (41).

L'angioplastie a, quant à elle aussi, pour but de désobstruer la lumière du vaisseau en écrasant la plaque d'athérome contre la paroi vasculaire. Cette compression peut s'effectuer par l'insertion d'un cathéter à ballonnet dans le vaisseau sténosé qui, une fois positionné, est gonflé au niveau de la plaque d'athérome. Une variante de l'angioplastie peut également consister en la pose d'une structure solide, endoprothèse métallique appelée stent, placée autour du ballonnet et déployée lors du gonflement de celui-ci. La plaque d'athérome est ainsi comprimée contre la paroi vasculaire, et maintenue en l'état par le stent (Figure 7). Cependant, à la suite de cette chirurgie, l'une des principales conséquences est l'apparition de re-sténoses (près de 40% dans le cas d'une angioplastie, et entre 20 et 30 % dans le cas de la pose d'un stent (42)). La destruction locale de l'endothélium par la pose du stent favorise la prolifération intra-luminale des CML. Pour tenter de pallier cette complication, des stents « fonctionnalisés » à l'aide de diverses molécules, ont émergé. Les premières générations étaient fonctionnalisés à l'aide de substances antiprolifératives comme le *sirolimus* ou le *paclitaxel* (43). Bien que plus efficaces que les stents traditionnels pour prévenir les re-sténoses, ces substances montraient des défauts de biocompatibilité et entraînaient de graves complications sur le long terme (44). Une deuxième génération de stents élués a vu le jour avec, cette fois-ci, leur recouvrement par des substances immunosuppressives douées d'une meilleure biocompatibilité comme

l'*everolimus* (inhibiteur de protéines kinases), le *zotarolimus*, l'*umirolimus*, le *novolimus* et l'*amphilimus* (45,46). De grandes avancées en termes de structure des stents ont également été effectuées. En effet, de nouveaux coatings ou polymères pour la fabrication de stent ont vu le jour, afin d'améliorer leur biocompatibilité, et leur durabilité. On peut noter l'apparition de stent du copolymère hexafluoropropylène-fluorure de vinylidène et du polymère polyvinylpyrrolidone C10-C19.18. Le premier minimisant l'adsorption de molécules, et ainsi l'adhésion des plaquettes et la formation de thrombus. Le second, de par son caractère hydrophile empêche l'adhésion des monocytes activés à sa surface, améliorant ainsi sa biocompatibilité (46). L'arrivée de nouvelles générations de stents a permis une diminution considérable des resténoses, cependant de nombreux progrès peuvent encore être effectués, notamment vis-à-vis de la problématique des événements tardifs sur site liée à la néoathérosclérose (46–48)

Le pontage vasculaire autologue, le cas du pontage coronaire

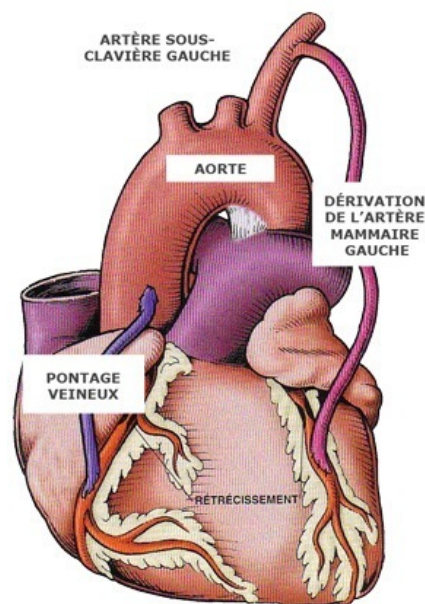


Figure 8. Schéma de mise en place des différents vaisseaux autologues lors d'un pontage coronaire (49).

Dans les cas les plus graves comme l'ischémie provoquée par un décrochage de la plaque venant obstruer une artère en aval, un pontage vasculaire de la région obstruée peut également être effectué en clinique. Cette technique consiste en la mise en place d'une dérivation afin de contourner la région obstruée et ainsi rétablir la circulation sanguine en aval de celle-ci (Figure 8), à condition qu'elle soit encore fonctionnelle. A

l'heure actuelle, dans le cadre d'une obstruction de l'artère coronaire, qui est davantage dans le domaine d'application de notre travail, le pontage autologue est mis en œuvre à l'aide d'un vaisseau autologue pouvant être une veine saphène interne ou l'artère mammaire interne. L'utilisation de cette dernière est préférée en clinique pour plusieurs raisons. D'une part, elle n'implique pas d'incision supplémentaire au niveau de la jambe, et d'autre part, elle est davantage fonctionnelle et les pontages effectués avec ce type d'artère montrent un moins grand risque de thrombose que celui observé suite à l'utilisation de la veine saphène (moins de 40% de taux de perméabilité à 5 ans (50)). En effet, les artères mammaires internes (droite et gauche) possèdent un caractère résistant au développement de plaques athéromateuses (51). Les veines saphènes sont également candidates et souvent utilisées dans ce contexte malgré leur tendance plus propice à la thrombose (52,53). Elles peuvent cependant être inutilisables dans le cas de pathologies comme les varices notamment (54). Selon les pays, l'ordre de préférence entre ces deux types de vaisseaux varie, mais généralement l'utilisation de l'artère mammaire est préférée à celle de la veine. Cependant, à force de prélèvements, la disponibilité de ces vaisseaux autologues diminue jusqu'à un stade où leur utilisation n'est plus possible. A cette limite s'ajoute également une augmentation de l'invasivité chirurgicale inhérente à la récupération du vaisseau autologue, et cela est d'autant plus vrai dans le cas d'une utilisation de l'artère mammaire (55). Ces observations conduisent à imaginer une nouvelle source de substituts vasculaires biocompatibles, produites en grande quantité et à façon, et qui répondent au cahier des charges d'un substitut vasculaire.

3. Autres contextes nécessitant un pontage vasculaire de petit diamètre

a. Le cas de l'insuffisance rénale chronique : le shunt artérioveineux

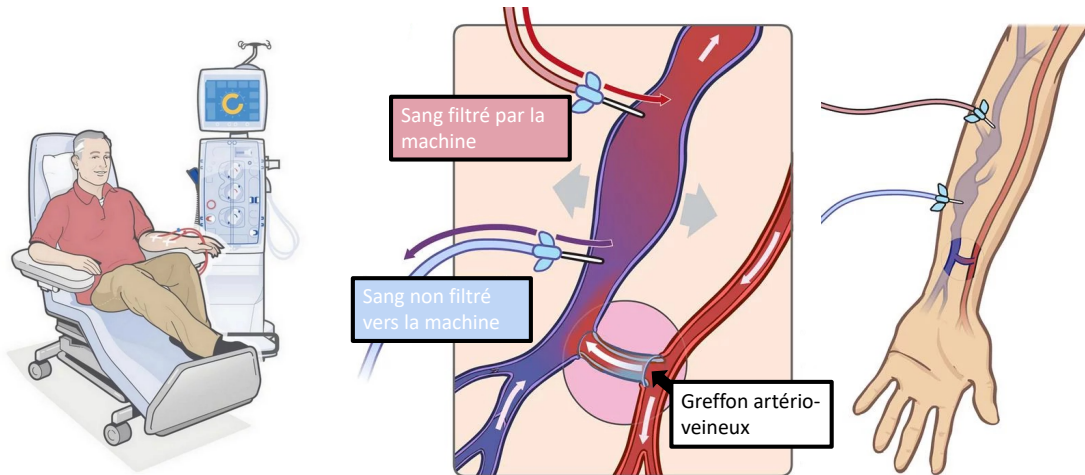


Figure 9. Schéma d'une hémodialyse effectuée via une fistule artérioveineuse prothétique. Figure produite par assemblage d'images (56,57)

L'insuffisance rénale chronique est une pathologie lente détruisant progressivement et de manière irréversible les reins, et dont les principales causes sont le diabète et l'hypertension (58). Cette maladie touche plus de 80 000 personnes en France et est divisée en plusieurs stades reflétant la sévérité de l'atteinte rénale. Ainsi les différents stades vont du stade 1 au stade 5, ce dernier étant également appelé stade terminal. Celui-ci est défini par une perte de 85 % de la fonction rénale, et nécessite une transplantation de rein pour remplacer l'organe touché. Dans le cas où une transplantation ne peut être effectuée immédiatement, la prise en charge des patients implique le recours à la dialyse afin de confier la fonction rénale à une machine. La dialyse peut être effectuée selon deux méthodes i) *la dialyse péritonéale* permettant la dialyse grâce au péritoine via la mise en place d'un cathéter de dialyse permanent dans la cavité abdominale ; ou ii) *l'hémodialyse* permettant d'effectuer la dialyse par une machine *via* la pose d'un accès vasculaire. Dans ce dernier cas, l'accès vasculaire doit présenter un débit suffisant ainsi que permettre de nombreuses ponctions à long terme. Afin d'établir cet accès vasculaire, trois méthodes sont possibles, la première consistant en la pose d'un cathéter de dialyse est une méthode d'urgence mais montre un fort taux de complications. La méthode la plus efficace et engendrant le moins de complications est la mise en place d'une fistule artérioveineuse « native » et consiste à relier directement une veine superficielle du bras à une artère. Cette manipulation

permet, après un temps de maturation, d'utiliser la veine comme accès direct pour la dialyse. Cependant, dans certains cas, le capital vasculaire du patient ne permettant pas la mise en place d'une telle fistule, l'utilisation d'une prothèse vasculaire de petit diamètre est nécessaire afin de réaliser la fistule artério-veineuse (Figure 9) (59). La création d'une telle fistule s'intègre dans la problématique à laquelle essaye de répondre l'ingénierie tissulaire vasculaire.

b. Le cas de pontage vasculaire dans un contexte pédiatrique

Les malformations cardiaques congénitales sont la principale cause de décès des nouveau-nés et touchent près d'une naissance sur cent (60). Dans le cas d'un besoin de pontage vasculaire, nous retrouvons les mêmes problématiques que chez l'adulte. En effet, aucune solution n'est apportée pour éviter le recours à des vaisseaux autologues dans le cas d'un pontage vasculaire de petit diamètre. De plus, ce contexte pédiatrique montre une limite supplémentaire inhérente à la croissance de l'enfant. Ainsi le substitut vasculaire idéal devrait montrer la capacité de croître pour convenir à l'individu tout au long de son développement et éviter de multiples interventions de remplacement vasculaire comme c'est le cas à l'heure actuelle (61).

II. L'ingénierie tissulaire vasculaire

Le terme « Ingénierie tissulaire » voit le jour dans un article éponyme, en 1993 sous la plume de Robert LANGER, et Joseph P. VACANTI (62). D'une manière générale, l'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire alliant l'ingénierie et les sciences du vivant afin de créer, en laboratoire, des matériaux fonctionnels pouvant améliorer, régénérer ou remplacer des tissus ou des organes dysfonctionnels (63).

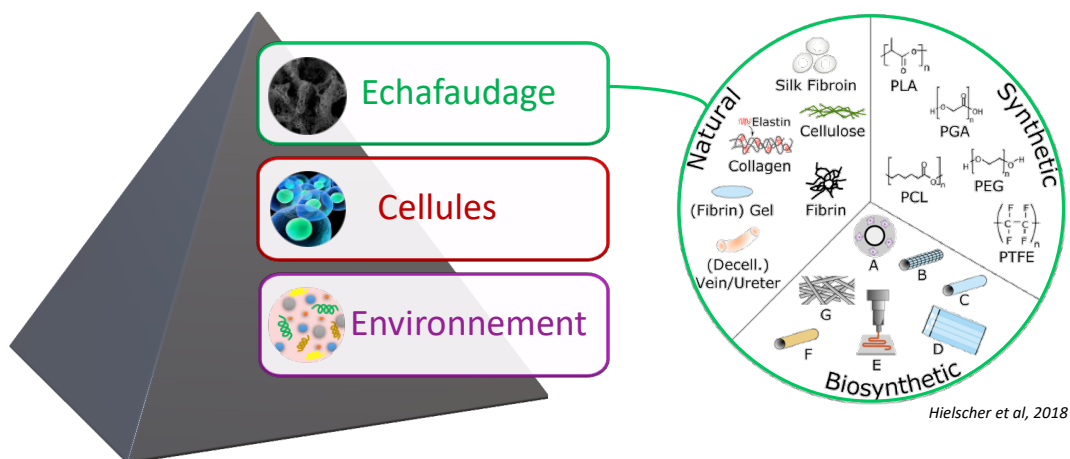


Figure 10. Triade de l'Ingénierie Tissulaire ainsi que les différents matériaux utilisés comme échafaudage (64).

Elle est basée sur une triade dont les différentes composantes sont les cellules, l'échafaudage (ou scaffold) et le microenvironnement (64–66). Ainsi, l'assemblage de ces trois composantes peut se résumer par cette phrase : « Les cellules présentes et organisées au sein d'un échafaudage, dont le devenir sera conditionné par un microenvironnement contrôlé. » (Figure 10) (64).

Bien que, tel que nous le connaissons, ce domaine soit considéré comme étant relativement récent, le premier matériau que nous pourrions définir comme étant construit par ingénierie tissulaire est présenté dans une publication datant de 1933 (67). Il s'agissait, dans le cas d'une déficience pancréatique, d'assurer la libération d'insuline via l'implantation d'un substitut. Dans ce but, des cellules tumorales ont été encapsulées sur une membrane en polymères, puis celle-ci fut implantée dans la cavité abdominale de porcs afin d'étudier son comportement dans l'organisme animal. Dans les années 1970-80 plusieurs réponses à des problèmes cliniques ont été résolus grâce à l'ingénierie tissulaire. En effet nous retrouvons notamment un ingénieux moyen d'améliorer la gestion du glucose dans le sang des personnes atteintes de diabète *via* des membranes semi-perméables au sein desquelles des cellules d'îlots de Langerhans étaient encapsulées (68); ou encore des gels de collagène utilisés comme substitut de peau (69).

Par la suite, les matériaux construits par ingénierie tissulaire se sont complexifiés avec la réalisation de systèmes tridimensionnels, à base de polymères biodégradables, dans lesquels il a été possible d'intégrer de cellules de façon organisée, et présentant un terrain favorable à leur vascularisation par l'organisme de l'hôte. Cette complexité, bien que sommairement imitée il y a encore quelques années, semble être de plus en plus envisageable avec l'émergence de nouvelles techniques de fabrication de biomatériaux, notamment l'impression 3D.

Dans l'ingénierie tissulaire, plusieurs sous-domaines se sont formés en fonction de l'application visée, et celle qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail est l'ingénierie tissulaire vasculaire, dont l'objectif est d'apporter une solution clinique à la problématique des remplacements de vaisseaux sanguins de petit diamètre (<6mm).

En effet, nous avons décrit précédemment les limitations des conduits synthétiques dans le cadre de remplacement de vaisseaux de petit diamètre. Brièvement, les échecs des greffons vasculaires de petit diamètre peuvent être généralement dus à une hyperplasie intimale (au niveau de l'anastomose distale dans les pontages ou aux jonctions greffon-veine des greffons artério-veineux), à une thrombose, à une sténose ou même à des infections. Ainsi, l'une des principales limites est l'absence ou une faible cellularisation intimale induisant une thrombose via les mécanismes d'adhésion des protéines sanguines et de coagulation (70–72). De plus, leurs propriétés ne leur permet pas de croître, et limite ainsi leur utilisation dans un contexte pédiatrique (73,74).

Ces limitations constituent un véritable obstacle à leur utilisation en tant que substituts vasculaires et présentent un problème majeur de santé publique (13,75). Ces greffons sont devenus alors l'un des domaines les plus étudiés et les plus complexes de l'ingénierie vasculaire. L'intégration cellulaire au sein d'un greffon vasculaire issu de l'ingénierie tissulaire (TEVG) est d'autant plus importante que selon l'étude de Skovrind *et al*, les substituts vasculaires de petit diamètre évalués lors d'études *in vivo* montrent un taux de perméabilité supérieur lorsqu'ils intègrent une composante cellulaire en opposition aux substituts inertes (85,1 % contre 64,4 %) (76).

Un TEVG remodelé par les cellules de l'hôte pourrait constituer une solution idéale potentielle pour la chirurgie vasculaire. Les spécifications requises pour le TEVG idéal impliquent principalement une surface luminale avec des propriétés non

thrombotiques, une résistance mécanique et une compliance comparable aux vaisseaux natifs, ainsi que des résistances à la torsion et la suture (ANSI/AAMI/ISO 7198) et des propriétés non immunogènes. Enfin, le TEVG idéal doit être facile à manipuler avec la possibilité de le produire à l'échelle industrielle à un coût raisonnable, avec une longueur suffisante pour répondre aux diverses applications cliniques potentielles du greffon.

A. Les différents types d'échafaudages investigués

Le choix de l'échafaudage, ou du « scaffold », est primordial dans le design d'un greffon vasculaire. C'est cette composante qui va fortement contribuer aux caractéristiques physiques du substitut comme sa résistance à la pression, son élasticité, sa forme, ainsi que son comportement dans le temps au sein de l'organisme de l'hôte.

Les différents scaffolds retrouvés dans la littérature peuvent être distingués selon 3 grandes familles. Tout d'abord, il existe des scaffolds synthétiques, produits *in vitro* par assemblage de polymères comme le ePTFE (77), l'acide polyglycolique (PGA) (78), le poly- ϵ -caprolactone (PCL), ou encore l'acide polylactique (PLA) (79).

Ces produits synthétiques montrent des avantages considérables notamment de par leur forme possible et leur propriétés mécaniques, conditionnées par le protocole de fabrication appliqué. Bien que plus résistant que des produits naturels, leur principal défaut, et non des moindres, est leur effet thrombotique limitant leur utilisation en ingénierie vasculaire de petit calibre (64,80). Des scaffolds naturels sont également utilisés dans ce domaine. Ceux-ci se présentent sous différentes formes, en effet ils peuvent être produits à l'aide de matrice extracellulaire (MEC) décellularisée (81), de protéines matricielles sous forme de gel comme le collagène (82) ou la fibrine (83), ainsi que sur la base de vaisseaux sanguins décellularisés d'origines variées (84–87). Les scaffolds à base de protéines ou créés à partir de MEC, bien que possédant des caractéristiques favorisant l'adhésion cellulaire ainsi qu'une faible immunogénicité, peuvent présenter des propriétés mécaniques limitées, rendant ainsi le substitut vasculaire fragile aux sutures ou à la pression. Les vaisseaux décellularisés quant à eux permettent de fournir une structure tridimensionnelle solide et potentiellement non immunogène, sur laquelle un recouvrement peut être appliqué en amont d'une étape

de cellularisation. La principale difficulté inhérente à leur utilisation est l'application d'un protocole de décellularisation. En effet, une décellularisation extrême peut endommager la paroi matricielle du vaisseau et ainsi impacter directement ses propriétés mécaniques. A l'inverse, si l'étape de décellularisation n'est pas assez efficace, les cellules et débris encore présents peuvent déclencher une réponse immunitaire chez l'hôte et provoquer le rejet du greffon (88). Une fois le type de scaffold choisi, celui-ci peut être ensuite cellularisé et/ou fonctionnalisé afin notamment, de lui conférer des caractéristiques hémocompatibles et vasomotrices indispensables dans le contexte des pontages vasculaires de petit diamètre.

1. *Les scaffolds vasculaires synthétiques*

Les scaffolds synthétiques sont couramment utilisés en ingénierie tissulaire en général mais également plus précisément dans le domaine vasculaire. La possibilité de choisir avec précision les caractéristiques physiques du substitut en fonction de sa méthode de fabrication est une qualité rendant leur utilisation intéressante. Leur reproductibilité est également un avantage considérable, et ces particularités font des greffons vasculaires synthétiques les plus utilisés dans le traitement des MCV (89). Cependant l'obstacle principal à leur utilisation dans le contexte du remplacement de vaisseaux de petit diamètre est leur faible taux de perméabilité par comparaison aux autres types de scaffold trouvés dans la littérature (90). Plusieurs stratégies sont étudiées afin de pallier cette limite, notamment le coating de la surface du substitut à l'aide de molécules, technique aussi appelée « surface biomimétique » (91). Ainsi, selon le traitement appliqué à la surface, les interactions avec des cellules cibles peuvent être favorisées. Cette technique est notamment utilisée dans le but d'optimiser l'attachement de cellules souches au substitut via le dépôt de protéines matricielles comme le collagène, la fibronectine, la laminine, *etc.* (92).

A noter que la dégradation dans l'organisme de certains polymères retrouvés de ce type de scaffold soulève également quelques préoccupations par l'induction d'une baisse du pH au niveau du site d'implantation via la libération de monomères acides. Ce phénomène peut ainsi enclencher le départ d'une réaction inflammatoire pouvant se poursuivre par une nécrose des tissus environnants (93).

2. *Les scaffolds vasculaires naturels*

Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, des scaffolds naturels sont également étudiés. Leur dégradation ne soulevant pas de problème de toxicité, leur utilisation est souvent préférée par principe aux polymères synthétiques. Dans le domaine plus spécifique de l'ingénierie tissulaire vasculaire, ces scaffolds naturels peuvent se présenter sous plusieurs formes telles que des vaisseaux décellularisés, artères ou veines provenant le plus souvent d'animaux, ou encore sous la forme de matrices extracellulaires décellularisées de collagène, de soie ou de fibrine pouvant provenir d'espèces variées. Différentes techniques existent dans la littérature afin de créer un support 3D à base de ces matrices. En effet, celles-ci peuvent être utilisées sous la forme d'hydrogel, mais on trouve également une proposition de production de fils de matrices qui seront ensuite tissés afin d'obtenir une structure vasculaire (94,95).

Tous ces matériaux naturels montrent une meilleure biocompatibilité que les structures synthétiques et sont notamment promoteurs de la cicatrisation vasculaire (64). Les vaisseaux décellularisés quant à eux possèdent des caractéristiques mécaniques moindres que celles retrouvées chez les scaffolds synthétiques, mais satisfaisantes en comparaison de celles des segments vasculaires frais utilisés dans le cas d'allogreffe, tout en étant peu voire, non immunogène, et favorisant la recolonisation du greffon par des cellules de l'hôte (96,97).

3. *Les scaffolds vasculaires biosynthétiques*

Ainsi, à la suite de la production d'un greffon par ingénierie tissulaire, celui-ci possèdera certains atouts et défauts inhérents au type de scaffold choisi, qu'il soit synthétique ou naturel. Afin de tenter d'optimiser cette composante, un nouveau type de scaffold a vu le jour, le scaffold biosynthétique. La combinaison des matériaux naturels et synthétiques pour établir des constructions hybrides permet d'adapter les propriétés du greffon. L'adhésion, la différenciation et l'activité cellulaire peuvent être ainsi contrôlées par l'environnement, tandis que les caractéristiques physiques du greffon peuvent être modulées selon le composé et la méthode de fabrication de la composante synthétique (98). En 2003, Berglund *et al* proposent un scaffold naturel sous la forme d'un tube de collagène cellularisé renforcé par des traitements au glutaraldéhyde (99). Ce traitement permet ainsi d'obtenir un scaffold montrant des propriétés mécaniques importantes, et favorisant son remodelage cellulaire par

l'organisme de l'hôte. A l'inverse, plusieurs scaffolds hybrides basés sur une naturalisation d'un polymère synthétique sont décrits dans la littérature. En 2017, Bertram *et al* proposent une structure tridimensionnelle fabriquée par électrospinning d'un mélange de PCL et de collagène. L'assemblage de ces deux matériaux dans la fabrication d'un greffon vasculaire permet de produire un scaffold solide, dont la structure peut être modifiée selon le besoin, et montrant également une biocompatibilité supérieure à une construction exclusivement composée de PCL. Différentes composantes naturelles peuvent être envisagées comme par exemple l'élastine (100) ou la gélatine (101).

Une fois le scaffold construit, celui-ci est ensuite cellularisé afin de lui conférer une surface de contact adéquate hémocompatible, prévenant ainsi des thromboses fréquentes dans le cadre de remplacement de petits vaisseaux.

B. Les différentes cellules utilisées en ingénierie vasculaire

Plusieurs types cellulaires sont d'ores et déjà grandement appropriés en ingénierie tissulaire vasculaire afin, entre autres, de conférer au substitut, une couche cellulaire luminale proche de l'intima retrouvée dans la structure d'un vaisseau sanguin natif. De plus, l'intégration de cette composante cellulaire peut s'effectuer selon différentes approches de cellularisation, en combinaison ou non avec d'autres types cellulaires, et avec pour but de cellulariser complètement la paroi du substitut, ou seulement sa surface luminale.

Les cellules utilisées peuvent être autologues, c'est à dire provenir de l'individu lui-même, mais elles peuvent également être d'origine allogène (provenir d'un autre individu), ce qui peut impliquer la mise en place d'un traitement immunodéprimant (souvent lourd) afin d'éviter le rejet de la greffe. Certaines cellules sont pourtant connues pour être immunoprivilégiées et posséder des effets immunomodulateurs permettant ainsi la greffe inter-individu en limitant la problématique de la "compatibilité". L'intérêt pour ce genre de cellules est grandissant dans le monde de l'ingénierie tissulaire et pourrait permettre de contourner les limites des greffes exogènes.

Les différentes cellules utilisées afin de produire un substitut vasculaire de petit diamètre sont discutées dans la revue « Cellularized small-caliber tissue engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard » publiée dans le journal *npj Regenerative Medicine* (produite dans l'annexe 1) (102).

C. Les différents types d'apport au microenvironnement

L'ingénierie tissulaire ne consiste pas qu'en la cellularisation d'un échafaudage, il s'agit ici d'étudier et de modeler le microenvironnement du greffon vasculaire afin de permettre le maintien du substitut au sein de l'organisme hôte, de maximiser ses propriétés, ou encore d'orienter au mieux le devenir des cellules déposées sur le substitut. Selon le contexte d'implantation, et selon le domaine d'ingénierie tissulaire, une multitude de méthodes sont étudiées. Des méthodes de fonctionnalisation du scaffold sont proposées dans la littérature, *via* par exemple l'ajout d'enzymes, de facteurs de croissance, de protéines, ou de cytokines afin d'optimiser le comportement cellulaire au sein du substitut, ou afin d'apporter directement une propriété spécifique au greffon. Ici nous nous attarderons sur différentes techniques présentes en ingénierie tissulaire vasculaire.

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire vasculaire, ces tentatives de fonctionnalisations ont principalement pour but d'améliorer l'hémocompatibilité du greffon afin d'éviter l'apparition de thromboses au cours de l'implantation. Wang *et al.*, en 2015, présentent par exemple un substitut vasculaire acellulaire libérant *in situ* du monoxyde d'azote (NO), molécule clé dans l'hémostase, libérée en condition physiologique par les cellules endothéliales afin, entre autres, de maintenir la perméabilité vasculaire (103). L'ajout d'autres molécules possédant des propriétés thromborésistantes sont également étudiées et c'est le cas notamment de l'héparine, un glycosaminoglycane naturel. En effet, dans le cas de la production d'un dispositif implantable en contact direct du sang, l'utilisation de cet anticoagulant est largement étudiée et permet une amélioration de la thromborésistance du dispositif (104–106). En 2011, Wan *et al.* ont également testé l'incorporation de l'héparine directement au sein d'un biomatériau mimant la MEC dans le but d'utiliser ce polymère dans la fabrication d'un substitut vasculaire (107).

En ingénierie tissulaire vasculaire, l'utilisation de cellules joue un rôle primordial dans l'hémocompatibilité du TEVG. Dans le contexte plus large de l'ingénierie tissulaire l'utilisation de cellules comme les CSM a pour objectif de profiter de leurs bienfaits thérapeutiques (108). Cependant l'utilisation de matériel vivant implique plusieurs inconvénients dont notamment le coût de production élevé, ainsi qu'une problématique de stockage du substitut cellularisé. Au cours de la dernière décennie une nouvelle approche a émergé, préférant utiliser les vésicules extracellulaires des CSM et leur sécrétome plutôt que les CSM directement afin de fonctionnaliser différents biomatériaux (109).

D. Les différentes méthodes d'assemblage proposées.

La recherche en ingénierie tissulaire est en perpétuel mouvement et propose un terrain enclin à l'innovation. En effet, de nombreuses méthodes de production innovantes ont émergé ces dernières années afin de produire un substitut vasculaire de petit diamètre. En plus de la méthode « conventionnelle » consistant en la cellularisation en laboratoire d'un tube naturel ou synthétique, de nouvelles approches sont proposées afin d'obtenir un greffon vasculaire cellularisé (Figure 11).

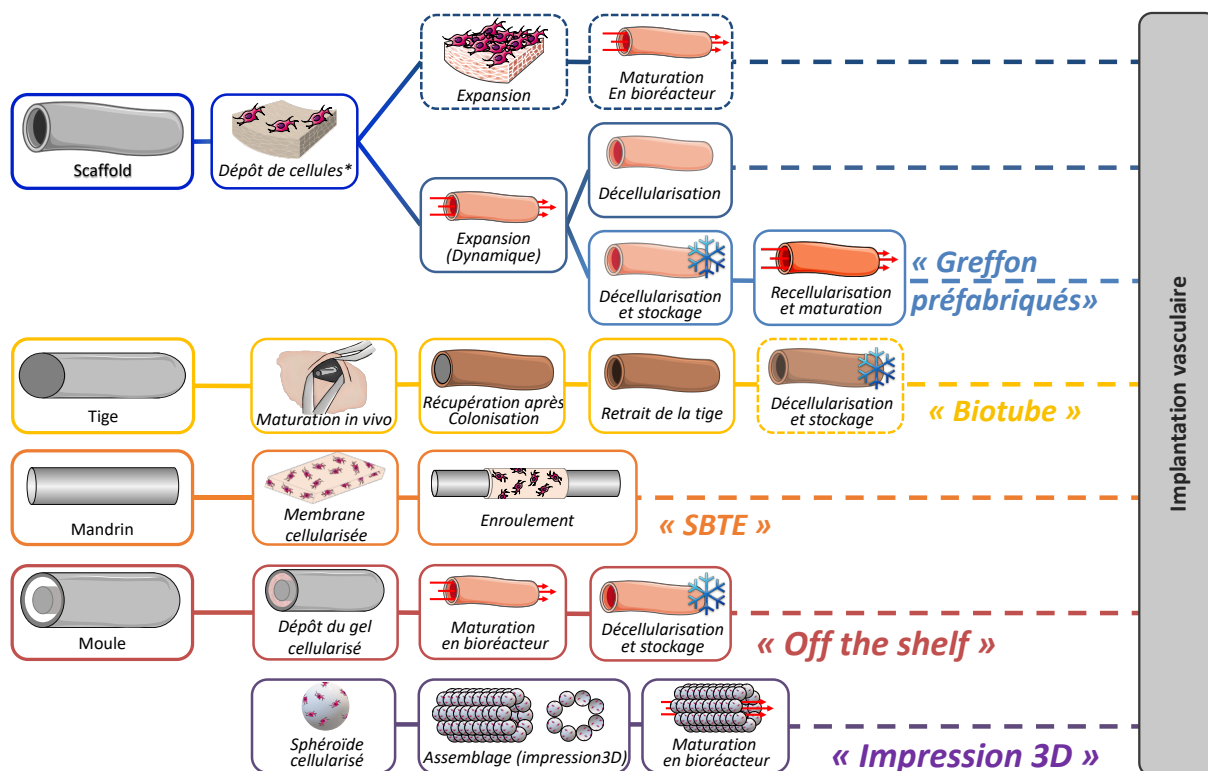


Figure 11. Les différentes méthodes d'assemblage retrouvées dans la fabrication de substituts vasculaires testés in vivo (102).

SBTE : Ingénierie tissulaire basée sur la production de membrane

L'approche "conventionnelle", nommée ainsi car étant la plus représentée dans la littérature, consiste en la cellularisation d'un scaffold cylindrique. Cependant, il existe déjà au sein de cette catégorie, des approches différentes développées afin d'optimiser le temps entre la demande du greffon et sa disponibilité. Pour cela, Lawson *et al* proposent par exemple d'utiliser la composante cellulaire dans le but de faire produire de la MEC enrobant leur scaffold en polymère biodégradable (PGA). Cet enrobage est effectué par une cellularisation nécessitant une période de culture de 8 semaines (110). Une fois cette matrice imprégnée, le substitut est décellularisé, permettant ainsi son stockage et sa disponibilité directe. Cette technique ne permet donc pas d'obtenir un substitut intégrant une composante cellulaire, cependant ce même protocole est utilisé afin d'obtenir une base de substitut vasculaire préparée à l'avance et stockable, qui pourra ensuite être recellularisée au dernier moment (111,112). Cette méthode consiste donc en la préparation d'un greffon "préfabriqué" dont la finalisation est effectuée extemporanément à son utilisation.

Parallèlement à ces approches basées sur la méthode conventionnelle, on retrouve également la méthode dite des « Biotubes », consistant en la cellularisation d'un

scaffold par son implantation sous-cutanée chez l'animal au cours d'une période plus ou moins longue (allant de 4 semaines à 2 mois) (113,114) L'accès à la surface interne d'une structure cylindrique (destinée à devenir la surface luminale du greffon vasculaire) étant limitée, une technique basée sur la production de tapis ou membranes (SBTE), lesquelles seront cellularisées puis enroulées autour d'une tige, permettant ainsi l'obtention d'un substitut vasculaire (115–117). Le tube cellularisé peut également être obtenu par le dépôt d'un gel cellularisé au sein d'un moule, gel solidifié par la suite, permettant d'obtenir un substitut vasculaire implantable solide (118). Enfin, l'impression 3D en plein essor ces dernières années, permet également de créer ce genre structure cellularisée. On peut noter une approche innovante consistant en l'assemblage de sphéroïdes cellularisés d'une taille de l'ordre de 600 μm pour obtenir un greffon vasculaire (119).

Ces nouvelles approches ayant fait l'objet d'études *in vivo* (évaluations cliniques ou pré-cliniques) sont décrites et discutées dans la revue écrite au cours de ma thèse : « Cellularized small-caliber tissue engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard », publiée dans le journal *npj Regenerative Medicine* (produite dans l'annexe 1) (102).

E. La cellularisation de la surface luminale, différentes approches

En plus de la variété des propositions retrouvée dans la littérature afin de créer un substitut vasculaire, différentes approches sont également distinguables afin de permettre la cellularisation de la surface luminale du greffon. La méthode de cellularisation luminale la plus représentée consiste en l'injection de cellules en suspension directement au sein de la lumière de greffon. Cela peut s'effectuer en conditions pulsatiles au sein d'un bioréacteur (111) ou en conditions "statiques", auquel cas les extrémités du greffon sont ensuite refermées, et ce dernier est placé sur un système permettant sa rotation, utilisant ainsi la gravité pour déposer les cellules sur l'ensemble de la surface luminale (120–123). Une méthode innovante a également été évoquée par Swartz et al, qui proposent un greffon construit par cellularisation de la surface externe d'un tube de fibrine dont la surface extérieure, au moment de l'implantation, est « tirée vers l'intérieur » à l'aide de pinces pour placer les cellules endothéliales dans la partie luminale du vaisseau" (124). C'est sur ce principe

que nous proposons, dans notre protocole de fabrication, d'exposer la surface luminale de l'artère ombilicale par une méthode de "retournement". Cette opération permet ainsi d'y apposer directement un coating ainsi que d'y déposer les cellules. L'exposition de la surface luminale permet d'optimiser les différents apports de nutriments et d'oxygène aux cellules déposées, minimisant ainsi le temps de culture nécessaire pour obtenir une cellularisation complète de la surface luminale du greffon. Une fois la confluence atteinte, le greffon peut être retourné une seconde fois afin d'obtenir un greffon vasculaire implantable.

III. L'étude des propriétés mécaniques des substituts vasculaires

Bien que trop peu effectuées, les analyses des propriétés mécaniques d'un substitut vasculaire précédent son évaluation *in vivo* peuvent permettre d'obtenir des indications sur l'efficacité de celui-ci dans les différents modèles susceptibles de reproduire des conditions physiologiques. Dans ce chapitre nous serons amenés à discuter de pression selon deux unités de mesures différentes, le Pascal (Pa) ainsi que le millimètre de mercure (mmHg), dont la proportionnalité est la suivante : 1 mmHg = 133,322 Pa. Le Pascal, l'unité de pression du système international, sera utilisée dans le cadre des tests mécaniques. En parallèle, la pression artérielle, mesurée en termes de mmHg, c'est donc cette unité qui sera utilisée dans le contexte de pression interne des vaisseaux sanguins.

A. Comportement mécanique des vaisseaux sanguins

1. La non-linéarité

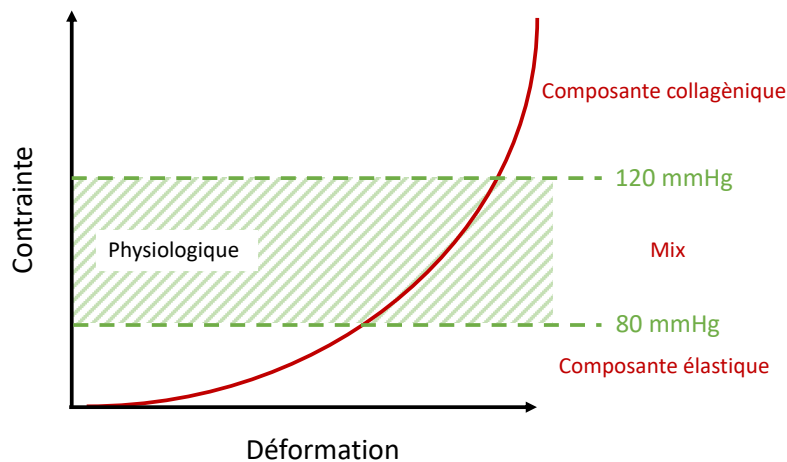


Figure 12. Courbe du diamètre artériel en fonction de la pression appliquée : le comportement non linéaire des vaisseaux sanguins.

Le comportement des vaisseaux sanguins face à la pression est dit « non-linéaire », c'est-à-dire que son comportement face à la pression se caractérise en plusieurs phases mécaniques (Figure 12). Ce phénomène est très important notamment dans les interactions entre le vaisseau sanguin et le pouls artériel et est expliqué par la composition de la paroi vasculaire, partagée entre une composante élastique (fibres d'élastine) et une composante plus rigide (fibres de collagène) (125). L'ensemble de ces paramètres a pour effet l'obtention d'une courbe contrainte/déformation non linéaire (Figure 12). En effet, dans des conditions ne présentant aucune contrainte de pression, les fibres d'élastine ainsi que celles de collagène s'organisent de façon ondulée et désorganisée. Au cours de l'augmentation de la pression, les fibres vont commencer à se tendre progressivement, et ce jusqu'à une pression de 80 mmHg, condition pour laquelle les fibres élastiques sont presque complètement étirées. Une pression supérieure à cette valeur entraîne l'étirement complet des fibres d'élastine et le redressement continu des fibres de collagène jusqu'à la limite supérieure de la pression physiologique (120 mmHg). Par conséquent, à des valeurs de pression inférieures à 80 mmHg le vaisseau sanguin montre un comportement mécanique élastique dominé par la tension des fibres élastiques. Dans l'intervalle de pression physiologique, la charge est partagée entre les deux types de fibres, et enfin à de plus

hautes pressions (> 120 mmHg) ; le comportement mécanique vasculaire est dicté par celui des fibres de collagène, plus rigides, résistantes à l'augmentation du diamètre du vaisseau, empêchant ainsi l'endommagement et/ou la rupture des vaisseaux sanguins en cas d'une augmentation trop importante de la pression (126).

2. L'anisotropie

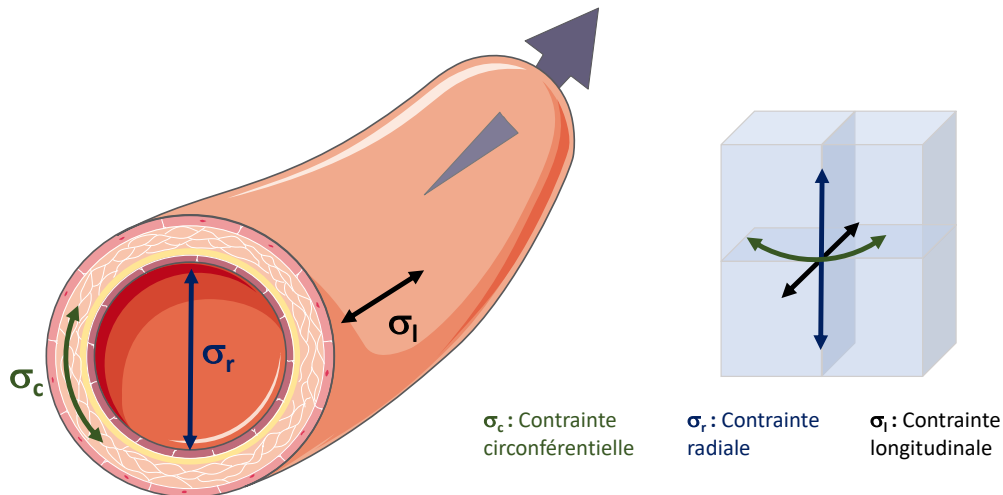


Figure 13. Contraintes appliquées aux vaisseaux sanguins.

La paroi vasculaire montre de grandes propriétés de déformation, et cela en suivant une réponse au stress non linéaire. Des études sur la réponse de cette paroi à divers stimuli mécaniques ont montré que cette dernière répondait différemment selon les directions des contraintes appliquées, et notamment que la paroi vasculaire possède trois directions privilégiées perpendiculaires (longitudinale, radiale, et circonférentielle, Figure 13) (127). Cette anisotropie est également accentuée par l'orientation et la disposition des fibres composant la paroi vasculaire (128).

3. La viscoélasticité

La viscoélasticité de la paroi artérielle est également un caractère important en hémodynamique. En effet, lors d'un étirement du tissu prolongé induit par le maintien de la déformation, la contrainte résultante diminue progressivement avec le temps. Ce phénomène est appelé « relaxation de la contrainte ». En opposition, le phénomène de « fluage » se caractérise par une déformation augmentant progressivement lors de l'application d'une contrainte constante (129).

4. *La compliance et l'élastance*

La compliance des vaisseaux sanguins (organes creux) est définie par le pourcentage d'augmentation du diamètre induit pour une augmentation donnée de la pression au sein du vaisseau sanguin. Ce phénomène joue un rôle clé dans la propagation de l'écoulement sanguin pulsatile. La propriété de compliance est une mesure de la capacité de stockage de pression des artères et représente leur action tampon pour convertir le flux pulsatile au niveau de l'aorte en flux continu dans les artères périphériques et les capillaires (130). L'élastance est l'inverse de la compliance, elle permet d'appréhender et de chiffrer l'élasticité de la paroi vasculaire.

B. Caractérisation des vaisseaux sanguins et substituts

1. *La norme ANSI/ISO 7198:2016 : Implants cardiovasculaires et systèmes extracorporels — Prothèses vasculaires — Greffons vasculaires tubulaires et pièces vasculaires*

Les exigences relatives à l'évaluation des substituts vasculaires tubulaires implantés par des techniques chirurgicales à visualisation directe et destinés à remplacer, contourner ou former des shunts entre des segments du système vasculaire chez l'homme sont explicitées par la norme ANSI/ISO 7198:2016 (131).

2. *Les principaux tests mécaniques retrouvés dans la littérature*

Pléthore de tests analysant les propriétés mécaniques d'un matériau existent. Ils peuvent consister en *i*) une analyse se basant sur une force appliquée le long d'un axe (test uniaxial) de façon répétée ou non (cyclique ou non), ou *ii*) en tests appliquant une pression et pouvant reproduire une force multiaxiale. Dans la littérature, les tests les plus communément retrouvés consistent en des tests de pression à l'éclatement ainsi qu'en des tests uniaxiaux et non cycliques, de traction ou de compression.

a. *Test de pression à l'éclatement*

En condition physiologique, et dans le cas d'une tension normale, la valeur maximale de pression appliquée aux vaisseaux sanguins s'élève à 119 mmHg (pression systolique). Au-delà de cette valeur, le patient est déclaré « à risque » jusqu'au seuil maximale de 139 mmHg (132). Dans le cas d'une pression systolique plus élevée, le contexte est nommé « hypertension » dans lequel on peut observer des valeurs de pression systolique ne dépassant pas 250 mmHg (133).

Afin d'être utilisable dans un contexte de pontage vasculaire, le substitut doit donc pouvoir supporter ces valeurs de pression interne. Ainsi, l'un des tests les plus fréquemment effectué sur les greffons vasculaires consiste en l'étude de la valeur de pression maximale supportée par le substitut avant éclatement. Pour cela, l'une des extrémités de substitut est hermétiquement fermée, et une pression interne est appliquée via la seconde extrémité. La pression est alors augmentée progressivement jusqu'à rupture de l'échantillon.

b. La compression, ou traction, uniaxiale incrémentée.

Comme leur nom l'indique, la principale différence entre les tests de compression ou de traction uniaxiaux est liée au chemin de déformation appliqué à l'échantillon. Dans la plupart des cas, les essais de compression et de traction consistent à appliquer une déformation incrémentale à un taux constant dans des directions opposées. Ces tests permettent de déterminer, entre autres, le module de Young (ou module élastique) du matériau. La méthode la plus utilisée dans la littérature pour la caractérisation mécanique des greffons vasculaires est le test de tension-déformation. Ce test consiste à appliquer une contrainte de traction sur l'échantillon à une vitesse constante jusqu'à sa rupture ou jusqu'à atteindre une déformation spécifique. L'expérience peut s'effectuer selon plusieurs protocoles se différenciant par la forme finale de l'échantillon lors du test ou également par l'orientation de la contrainte appliquée (longitudinale ou transverse). Les échantillons tubulaires peuvent être disposés directement en l'état, ou ouverts longitudinalement et posés à plat. Ils sont ensuite montés sur des pinces par leurs extrémités dans l'appareil de traction. Dans le cas d'un test allant jusqu'à la rupture de l'échantillon il est possible de déterminer la contrainte et la déformation maximale supportée par l'échantillon.

c. Tests cycliques, l'analyse mécanique dynamique (DMA)

La DMA est une technique très utilisée dans le domaine des polymères, mais dont l'utilisation dans les domaines de la biologie, et notamment dans l'étude des substituts vasculaires, se voit être de plus en plus populaire. Cette technique permet d'évaluer le comportement viscoélastique des matériaux en fonction de la température et de la fréquence. Elle s'effectue en milieu aqueux ce qui permet, entre autres, de contrôler la température, et l'humidité de l'étude. Ainsi, l'utilisation de cette technique permet de mieux représenter les conditions d'intégration du substitut dans l'organisme (134).

Cette technique consiste en l'application de forces de traction ou de compression, de manière cyclique et pour de faibles déformations, grâce à un moteur générant une force dynamique agissant sur l'échantillon. L'appareil comprend des capteurs de force, de déplacement et de température installés pour les mesures. Pour chaque échantillon, la DMA permet d'obtenir une valeur de module élastique (E'), ainsi que le facteur d'amortissement (ou facteur de perte, $\tan \delta$) représentant le comportement du matériel face à des contraintes dynamiques. Bien que puissante et montrant des avantages dans l'analyse de polymères, cette technique montre plusieurs limites dans le contexte de l'étude de biomatériaux. Comme exemple, la nécessité d'identifier la forme de l'échantillon analysé qui ne peut être que parallélépipède ou cylindrique, ou encore l'impossibilité d'appliquer des forces multiaxiales.

IV. L'évaluation préclinique des substituts vasculaires

Une fois la combinaison des différents éléments constituant le substitut vasculaire définie, celui-ci est tout d'abord soumis à des études *in vitro* afin d'évaluer ses caractéristiques et ainsi tenter de prédire son comportement dans le cadre d'implantations dans le système vasculaire.

A. But et mise en œuvre

Afin de pouvoir utiliser un médicament en clinique, ou un substitut dans le cas de l'ingénierie tissulaire, celui-ci doit, bien-entendu, passer plusieurs étapes de vérifications et de tests. Dans le cas d'un dispositif implantable, l'ultime test sera une étude de son comportement *in vivo*, en particulier de ses performances après implantation chez l'homme au cours d'un ou plusieurs essais cliniques. Cependant, afin de pouvoir effectuer de telles études, il est nécessaire de valider au préalable les performances de ce substitut lors de son implantation chez l'animal. Cet essai préclinique est primordial afin d'évaluer ses fonctionnalités, sa réactivité et son comportement ainsi que son devenir au sein d'un organisme complet. Ces types d'études précliniques extrêmement réglementées, doivent répondre au maximum à « la règle des 3 R » et leur mise en place en France est conditionnée par la soumission d'un dossier (demande d'autorisation) au Ministère de l'Enseignement et de la

Recherche. La règle des 3 R comprend les points suivants : Réduire, Raffiner, Remplacer.

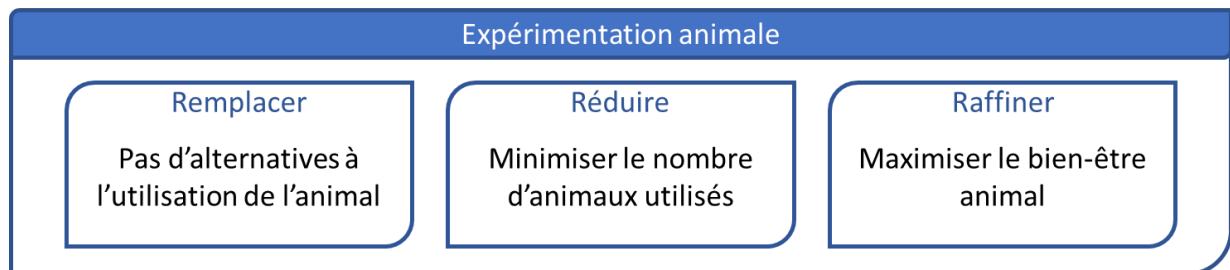


Figure 14. La règle des 3 R, principes fondamentaux de l'expérimentation animale.

L'expérimentation animale « doit revêtir un caractère de stricte nécessité », doit s'effectuer au sein d'un établissement conforme et agréé et par un personnel compétent et formé. De plus, le choix du modèle animal doit être motivé (et ne pas pouvoir être remplacé par un modèle *in vitro*) et le nombre d'animaux utilisé au cours de l'étude doit être justifié et réduit au maximum. Enfin le dossier doit également mentionner les solutions apportées aux animaux afin de réduire au maximum les contraintes, tant sur le plan expérimental (point limite, « lors du choix entre procédures, devraient être sélectionnées celles qui (...) causent le moins de dommages durables, de douleurs, de souffrances et d'angoisse et qui sont susceptibles de donner les résultats les plus satisfaisants ... ») que sur le plan de l'hébergement (conditions décentes, et bien être de l'animal amélioré par l'apport de jeux, ...) (Figure 14) (135).

B. Les différents modèles animaux en ingénierie tissulaire vasculaire

Afin de déterminer le potentiel clinique d'un greffon vasculaire, il est nécessaire, à la suite des études *in vitro*, d'évaluer son comportement au sein d'un organisme vivant. Plusieurs variables doivent être prises en compte lors de la sélection d'un modèle animal approprié, notamment la thrombogénicité, l'immunogénicité, la taille du greffon vasculaire, le site d'implantation et le contexte clinique dans lequel s'inscrit le substitut.

De nombreux critères sont à prendre en compte au cours du développement d'un greffon vasculaire. Afin d'encadrer la production de substituts vasculaires candidats, une standardisation de propriétés minimales a été établie en 1998 puis actualisée en 2016 (131,136). Ainsi, la fabrication du substitut vasculaire doit, entre autres, être

reproductible, avoir un coût limité, être implantable, non immunogène et montrer un remodelage à long terme. Le substitut doit également être physiologiquement fonctionnel et n'induire aucune réaction thrombogénique (137). Bien que certains de ces critères puissent être évalués *in vitro*, il est actuellement encore indispensable de soumettre le substitut à des études *in vivo* afin d'étudier son comportement et ses performances au cours du temps au sein d'un organisme vivant. Pour cela différents modèles animaux sont utilisables dans le but de finaliser l'évaluation préclinique du substitut et ainsi démarrer les essais cliniques (les valeurs hémodynamiques, ainsi que la numération sanguine basale de ces différents modèles sont présentées dans les Tableaux 1 et 2). Les études *in vivo* sont généralement débutées au sein d'un modèle « petit animal » comme le sont les rongeurs ou les lagomorphes. Ces modèles moins coûteux, bien qu'ils renseignent sur le comportement du greffon dans un organisme, notamment son immunogénicité, ne sont pas suffisants afin de valider l'étape pré-clinique. Pour cela, il est nécessaire de poursuivre l'évaluation *in vivo* chez des modèles dits de « gros animaux », plus onéreux mais également bien plus représentatifs des conditions retrouvées chez l'Homme.

Tous les modèles animaux étant différents, il s'agit de choisir judicieusement le ou les modèle (s) utilisé (s) en fonction des critères primordiaux pour évaluer le potentiel clinique du TEVG visé.

Tableau 1. Valeurs hémodynamiques de différentes espèces animales utilisées en l'ingénierie tissulaire vasculaire. (repris de la revue (138)).

| Espèces | Pression sanguine en systole (mm Hg) | Pression sanguine en diastole (mm Hg) | Pression sanguine moyenne (mm Hg) | Fréquence cardiaque (battements/min) | Index cardiaque (ml/min/kg) | Volume sanguin (ml/kg) |
|---------|---|--|--------------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------|
| Humain | 126 ± 14 | 79 ± 10 | 95 ± 11 | 70 ± 14 | 93 ± 20 | 80 |
| Babouin | 122 | 77 | 107 ± 16 | 92 ± 13 | 103 | 60-80 |
| Porc | 127 ± 8 | 86 ± 7 | 102 ± 9 | 105 ± 10 | 99 ± 20 | 57 |
| Brebis | 140 | 90 | 114 | 95 ± 24 | 115 ± 31 | 58 |
| Chien | 126 ± 23 | 90 ± 20 | 96 ± 7 | 98 ± 18 | 88 ± 19 | 93 |
| Lapin | 120 | 80 | 98 ± 3 | 130-325 | 279 ± 56 | 56 |
| Rat | 127 ± 7 | 85 ± 15 | 120 ± 8 | 250-450 | 441 ± 142 | 54 |

Tableau 2. Numérations sanguines de différentes espèces de l'ingénierie tissulaire vasculaire. (repris de la revue (139)).

| Espèces | Globules rouges ($\times 10^9/\text{mL}$) | Hématocrite (%) | Plaquettes ($\times 10^9/\text{L}$) | Globules blancs ($\times 10^9/\text{L}$) | Neutrophiles (% globules blancs) | Lymphocytes (% globules blancs) | Fibrinogène (g/L) |
|---------|--|--------------------|--|---|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Humain | 4,8-5,4 | 44,5 \pm 8 | 265 \pm 135 | 7,4 \pm 3,4 | 50-70 | 20-40 | 2-4 |
| Babouin | 4,5 | 36,2 \pm 2 | 370 \pm 105 | 7,1 \pm 2,1 | 44 | 46 | |
| Porc | 6-8 | 41 | 350 \pm 150 | 14,8 | 40 | 50 | 2-4 |
| Brebis | 10-13 | 36 \pm 9 | 550 \pm 250 | 8 \pm 4 | 30 | 60 | 2-4 |
| Chien | 6-8 | 45 \pm 10 | 350 \pm 150 | 11,5 \pm 5,5 | 60 | 25 | 1-4 |
| Lapin | 4-7,2 | 42,5 \pm 3 | 200-1000 | 7,5 \pm 13,5 | 30 | 55 | |
| Rat | 7-10 | 46,4 | 500-1300 | 6-17 | 9-34 | 65-85 | |

1. Les modèles « petit animal »

a. Les modèles murins

En ingénierie tissulaire vasculaire, les souris ainsi que les rats de par leur anatomie, ne peuvent être utilisés comme modèle animal que pour étudier les greffons de très petit diamètre (1-2 mm) et cela sur une longueur maximale d'un centimètre. Leur rapidité de reproduction et l'entretien qu'ils nécessitent en font un modèle utilisable sur un très grand nombre, ce qui constitue le principal intérêt à leur utilisation. Un autre avantage majeur est la possibilité de manipuler le génome de ces animaux afin de créer des modèles transgéniques permettant de concentrer l'évaluation du substitut implanté sur certains aspects. Dans l'optique de réduire les coûts à minimum, l'équipe de Lopez-Soler a développé un modèle de souris exhibant une immunodéficiencia combinée (SCID) destiné à évaluer des substituts vasculaires de petit diamètre produits à l'aide de cellules xénogènes (139). Un autre exemple de souris transgénique a été mis au point par l'équipe d'Hibino afin d'étudier le rôle des macrophages dans la sténose pouvant toucher les greffons vasculaires (140).

Bien que présentant de nombreux avantages (biocompatibilité, comportements hémodynamiques, ...), les modèles murins montrent d'importantes différences en termes de physiologie cardiovasculaire avec l'humain, et cela se retrouve également au niveau des mécanismes de thrombogénicité, qui sont d'une importance capitale dans l'évaluation de TEVG.

b. Le modèle lagomorphe

Le lapin est le modèle de petit animal le plus pertinent pour évaluer les greffons vasculaires de petit diamètre (1-4 mm). Son système cardiovasculaire est plus proche de celui de l'Homme comparé aux modèles murins, tant en termes de thrombogénicité, et de processus d'endothélialisation (141). Ce modèle permet l'accès à différents sites

d'implantation vasculaire au niveau de l'aorte, de l'artère carotide ou encore de l'artère fémorale. L'inconvénient de ce modèle, de par sa taille et sa physiologie vasculaire, est la limitation en termes de temps d'implantation. Il est ainsi préféré dans des études à court terme évaluant le substitut vasculaire à différents sites d'implantation.

2. Les modèles « gros animal »

a. Le modèle primate non humain

Les primates non humains montrent d'extrêmes similitudes avec l'Homme, tout d'abord d'un point de vue génétique et également cardiovasculaire (142). La physiologie du système vasculaire, les mécanismes thrombotiques ainsi que le contexte de l'athérosclérose sont semblables à ce que l'on peut retrouver chez l'humain (141). D'autres avantages peuvent être cités comme une encapsulation fibreuse limitée en comparaison à d'autres modèles animaux, ainsi que la possibilité d'utiliser les mêmes machines d'imagerie qu'en clinique. Bien que ce modèle ait les caractéristiques « idéales » pour être le modèle de prédilection pour les études précliniques, d'important inconvénients lui sont inhérents. En effet, ce modèle est très coûteux et est sujet à des préoccupations éthiques plus importantes que d'autres espèces animales, ce qui rend ce modèle moins accessible.

b. Le modèle ovin

Les moutons et les brebis sont des animaux à cycle de reproduction rapide se prêtant plutôt bien aux études à long terme de par leur facilité de manipulation, leur croissance modérée et leurs similitudes avec l'Homme quant à la composante vasculaire. Ces espèces sont des animaux au long cou ce qui permet un accès facile et rapide aux artères carotides ainsi que l'intégration d'un greffon de longueur importante. La brebis a été décrite comme possédant un système de coagulation très proche de celui retrouvé chez l'Homme, bien plus que ce que l'on peut observer chez les modèles porcins et canins (143). De nombreuses différences sont cependant notables, en particulier en termes de coagulation. En effet, d'une part ces animaux exhibent un nombre important de plaquettes circulantes dans le sang comparé à tous les autres modèles, et d'autre part on y retrouve une faible activité fibrinolytique (144). Tout cela se traduit par une hypercoagulabilité du modèle pouvant être délétère à l'évaluation *in vivo* d'un substitut vasculaire.

c. Le modèle canin

Les chiens sont très souvent utilisés dans la recherche cardiovasculaire et permettent, selon le site choisi, d'implanter des greffons de différents diamètres. Les substituts, dont le diamètre est supérieur à 6 mm, peuvent être implantés au niveau de l'aorte thoracique, ou abdominale, tandis que les vaisseaux de plus petit diamètre peuvent s'intégrer au niveau de l'artère carotide ou aorto-illiaque. Cependant, ce modèle présente de nombreuses différences avec l'humain, tant en termes de mécanismes de thrombose que du point de vue des propriétés viscoélastiques des vaisseaux sanguins. Il est également reconnu comme étant un modèle montrant une hypercoagulabilité (144). D'ailleurs, après une analyse comparative entre les différents modèles animaux utilisés en ingénierie vasculaire, Sato M. et Harasaki H. ont conclu que ce modèle n'était pas idéal pour l'évaluation des interactions du sang avec la surface vasculaire (145).

d. Le modèle porcin

Le modèle porcin montre un système de coagulation similaire à celui retrouvé chez l'Homme avec cependant une tendance à l'hypercoagulation (143,146). La physiologie vasculaire est également très représentative de ce que l'on retrouve chez l'humain, avec en particulier la vascularisation coronaire qui rend ce modèle très pertinent dans l'étude de reperfusion à la suite d'une ischémie ou encore dans le cadre de l'évaluation de stents coronaires (144). Cependant l'envergure de l'animal, ainsi que sa croissance sont un frein à son utilisation sur des études à long terme. Pour pallier ces problématiques, un modèle porcin dit « minipig » émerge et bien que son prix soit élevé, il pourrait bien faire des modèles porcins les plus efficaces pour évaluer les TEVG.

3. Les futures alternatives ?

Pour l'heure, le modèle animal est primordial dans la recherche et plus particulièrement dans les protocoles d'évaluation des solutions cliniques. Cependant, depuis plusieurs années la réflexion sociétale concernant l'animal, sa conscience, son bien-être et sa place par rapport à l'Homme, est en ébullition. Celle-ci bouscule fortement, non seulement les méthodes de production des produits animaux dans le secteur agroalimentaire, mais également l'utilisation de l'animal dans le domaine de la recherche. Malgré toutes les consignes prenant en compte le bien-être animal dans

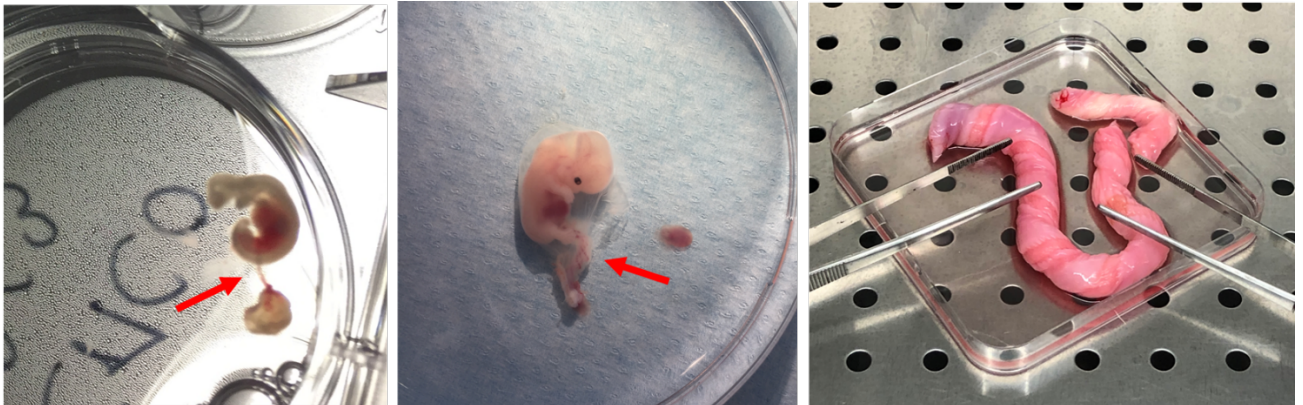
les études *in vivo*, celles-ci sont très souvent remises en question. Ainsi, selon le domaine de recherche, de nombreuses alternatives sont investiguées afin de remplacer définitivement le modèle animal par des modèles moins chers, nécessitant moins de produits, moins chronophages et surtout plus en phase avec l'évolution de notre société. La réflexion s'est portée sur le remplacement de l'utilisation de vertébrés par des modèles animaux moins concernés par les problèmes d'éthique comme le zebrafish ou des invertébrés comme la drosophile ou encore le vers *C. elegans* (147–149). Dans certains cas, l'animal peut également être complètement retiré de l'équation, notamment via l'utilisation, de montages complexes mimant les conditions physiologiques (patch-clamp), ou de micro-organismes qui peuvent être pertinents par exemple dans l'étude des programmes de mort cellulaire et par extension, dans la recherche contre le cancer (150). L'outil le plus prometteur à long terme semble être le modèle numérique. En effet bien qu'encore « rudimentaires » à l'heure actuelle, les modèles informatiques permettent déjà de prévoir les différents effets d'une substance sur le comportement cellulaire, et cela sans avoir besoin de le tester directement sur l'animal. Cette technique possède plusieurs avantages, en plus d'être « animal-free », l'étude est beaucoup plus rapide et son prix est dérisoire par rapport à une étude menée sur l'animal (151). Avec l'avancée technologique et les méthodes de screening toujours plus performantes, il y a fort à parier qu'à long terme, ces modèles *in silico*, en parallèle de la croissance des bases de données, permettront de se passer définitivement de l'animal dans le domaine de la recherche (152).

V. Notre greffon SMILING

A. Les fondements (la philosophie) du greffon SMILING

La genèse du projet de fabrication du greffon SMILING repose sur la volonté de proposer un substitut vasculaire de petit diamètre complètement naturel, et exclusivement produit à partir de composants provenant du cordon ombilical humain. Ce greffon est produit par ingénierie tissulaire et son évaluation *in vivo* s'est effectuée au cours de ma thèse sur le porc, un modèle animal connu pour être très comparable de l'humain, notamment dans le contexte cardiovasculaire. La suite de ce projet a reçu en 2021, le soutien de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

B. Le cordon ombilical humain



Développement du cordon ombilical humain

Figure 15. Développement du cordon ombilical humain, des premiers stades fœtaux, jusqu'au terme de la grossesse.

Le cordon ombilical est une structure faisant le lien entre l'embryon (puis le fœtus), et le placenta de la mère. Il a pour but d'alimenter le fœtus en oxygène et nutriments au cours de son développement via ses 2 artères et sa veine ombilicales. Sa structure et sa taille croissent également au cours de la gestation afin de s'adapter aux besoins fœtaux pour atteindre, à terme, jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres de long pour un diamètre de 2 centimètres (Figure 15) (153).

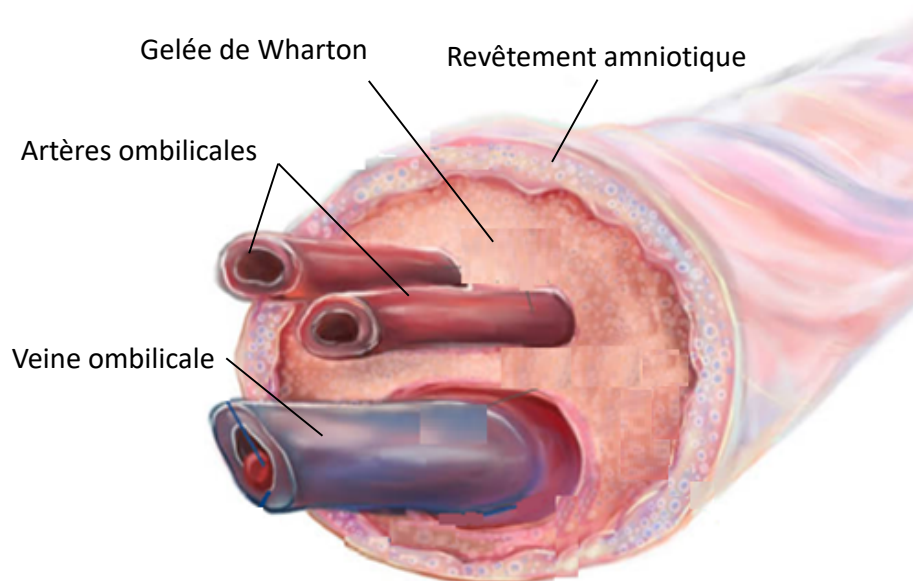


Figure 16. Description des différents composants du cordon ombilical

À termes, il est composé de trois vaisseaux ombilicaux : deux artères et une veine, au sein d'un tissu conjonctif appelée Gelée de Wharton (GW) (nommée ainsi suite à sa découverte par Thomas Wharton, 1614-1673) le tout confiné par un revêtement amniotique (Figure 16).

Le cordon ombilical, considéré encore récemment comme un « déchet » opératoire, a intéressé le domaine de la recherche depuis une quarantaine d'années notamment vis-à-vis du sang qu'il contient, riche en cellules progénitrices et cellules souches sanguines. Sa récupération non invasive, et son caractère naïf exacerbé, rend ses cellules intéressantes en remplacement des cellules de moelle osseuse, afin de reconstituer le capital sanguin d'un patient ayant subi une thérapie myéloablatrice, traitement prescrit suite à de nombreuses maladies sanguines (154).

Les investigations sur le cordon ombilical ne se concentrent pas uniquement sur le sang de cordon, mais dans bien d'autres domaines, et cela notamment de par le caractère « naïf » de ses cellules comme source potentielle alternative à l'utilisation de cellules embryonnaires sujettes à de nombreux problèmes éthiques (155).

Déjà en 1976, on peut retrouver une étude sur son utilisation dans la fabrication de prothèses vasculaires, et notamment dans la modification de la veine ombilicale afin de l'utiliser comme prothèse vasculaire au niveau des artères poplitées, tibiales et péronières (156). Depuis, les produits dérivés du cordon ombilical sont toujours investigués dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, de par leur potentiel de réparation tissulaire accru et leur résistance à la dégradation. On peut aussi noter l'utilisation de segment de cordon dans le cadre de greffe de peau, ou encore plus récemment, l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon lors d'un essai clinique pour traiter des enfants ayant des pathologies neurologiques (156,157).

C. Le matériel ombilical, composants de notre greffon SMILING

1. *Les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton*

D'une manière générale, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules adhérentes, ayant une morphologie fibroblastique, capables d'un auto-renouvellement accru et possédant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires (multipotentes). Ces cellules peuvent être retrouvées dans différents tissus

chez l'adulte, notamment la moelle osseuse, la pulpe dentaire, le sang circulant, et les tissus adipeux ; mais elles sont également présentes dans des tissus fœtaux ou néonataux comme dans le placenta ou encore dans la gelée de Wharton (158).

Bien que selon leur origine, les CSM montrent quelques spécificités, elles possèdent toutes une base de caractéristiques générales identiques, c'est donc selon un cahier des charges strict que se fait l'identification de ce type cellulaire. En effet, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (The International Society of Cellular Therapy) a établi une liste de critères caractérisant ce type cellulaire. Ces cellules, en plus de leur adhérence au plastique et de leur compétence à se différencier entre autres, en ostéoblastes, en adipocytes, ou en chondroblastes, doivent présenter les différents marqueurs CD105, CD73, CD90 tout en n'exprimant pas (entre autres) CD45, CD34, HLA-DR (159). Les CSM ont également montré leur capacité de différenciation en cellules endothéliales ainsi qu'en cellules musculaires lisses les rendant particulièrement intéressantes dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire (160–162).

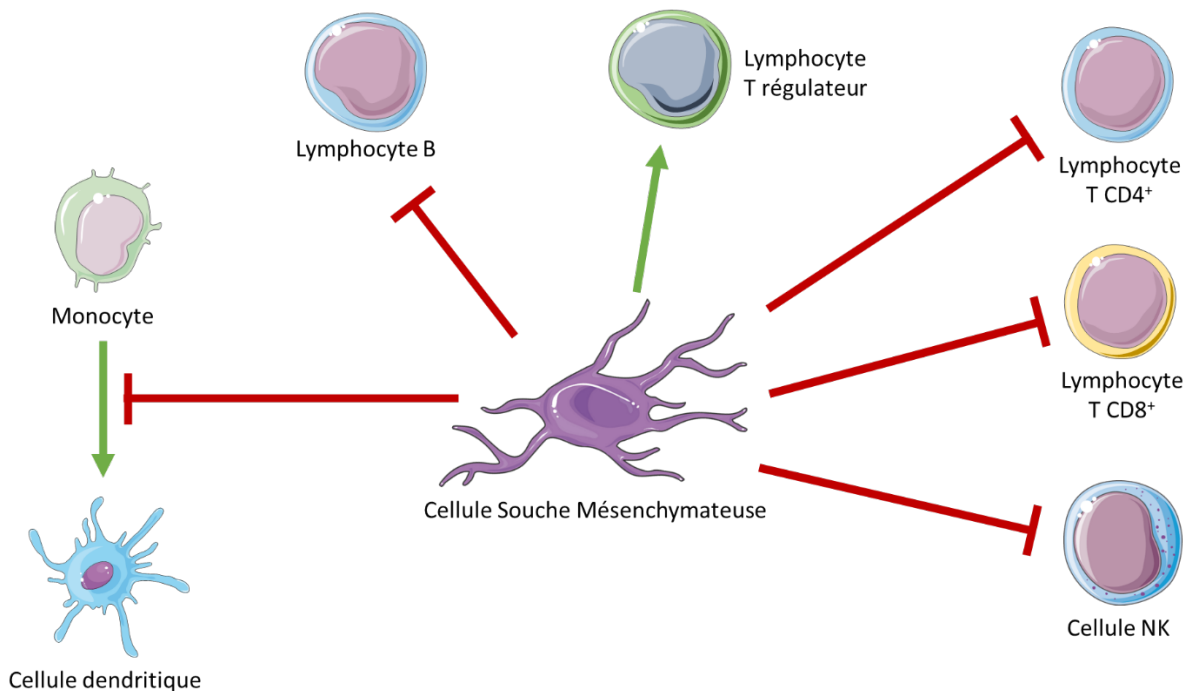


Figure 17. Effets des CSM sur les différentes cellules du système immunitaire.

Les CSM, en plus des caractéristiques précédemment citées, possèdent d'importantes propriétés immunosuppressives et immunomodulatrices (Figure 17). On peut noter

l'absence d'expression de HLA-DR, une protéine membranaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Celle-ci a un rôle de présentation d'antigène notamment aux lymphocytes T CD4⁺ et son absence à la surface des CSM leur confère une protection contre une potentielle réaction immunitaire déclenchée par ce type de lymphocytes T (163,164). Cette propriété fait des CSM, un type cellulaire de choix dans l'utilisation en condition xénogénique et donc dans un cadre clinique, notamment celui de l'ingénierie tissulaire. De plus, les CSM possèdent d'importantes caractéristiques immunosuppressives. Elles ont la capacité de bloquer la prolifération des lymphocytes B, des lymphocytes T ainsi que des cellules NK via, entre autres, la sécrétion d'indolamine 2, 3-dioxygénase (IDO), ou de prostaglandines (165,166). Elles sécrètent également d'autres cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-10, permettant de contrer la réponse pro-inflammatoire des cellules Th17 ainsi que de stimuler les cellules T régulatrices (165,167). Les CSM interagissent également avec le cycle cellulaire des monocytes, les bloquant en phase G₀ et interférant ainsi dans leur différenciation en cellules dendritiques (168). Toutes ces interactions modulent la réaction inflammatoire et font de ces cellules des candidates sérieuses pour limiter les réactions du système immunitaire de l'hôte dans le cadre de la réaction du greffon (169). Les CSM possèdent également des caractéristiques antithrombotiques rendant leur utilisation très intéressante dans un contexte vasculaire. En effet, ces cellules montrent un taux d'adhésion des plaquettes comparables à celui retrouvé chez les cellules endothéliales (115).

Les CSM les plus utilisées en recherche et en clinique sont pour le moment les CSM de la moelle osseuse (CSM-MO). Leur récupération s'effectue de manière invasive, via une biopsie chez le patient. Bien que les CSM-MO soient les plus couramment utilisées, les CSM provenant d'autres sources montrent les mêmes caractéristiques, notamment en terme d'immunoprivilège, et d'immunomodulation (170,171). Cependant, les CSM-GW pourraient bien remplacer les CSM-MO et devenir le gold standard en clinique (172). En effet, leur utilisation présente de nombreux avantages, tout d'abord de par le caractère plus primitif de ces cellules en comparaison des CSM retrouvées chez l'adulte, y compris celles de la moelle osseuse. À cela s'ajoute un autre avantage à leur utilisation, celui de la méthode de récupération, qui est non invasive que ce soit pour la mère, ou pour l'enfant, et permettant leur extraction en quantité importante (173). Il a également été montré que ces cellules possédaient une

capacité de prolifération plus importante que celles provenant d'autres sources, ainsi qu'un potentiel de différenciation semblable au CSM-MO (172). Ces CSM provenant de la GW ont d'ailleurs déjà été utilisées dans de nombreux essais cliniques au cours desquels elles se sont montrées sûres et efficaces dans un contexte de médecine régénérative dans des domaines tels que la neurologie ou l'hématologie principalement (174).

2. L'artère ombilicale

Trois structures vasculaires sont retrouvées au sein du cordon ombilical, dont une veine et deux artères, toutes trois ancrées dans la gelée de Wharton. Ces artères ont pour fonction d'acheminer, à une pression de 50 mmHg, le sang non oxygéné vers le placenta, au sein duquel s'effectuent les échanges gazeux. Le sang fraîchement ravitaillé en oxygène et métabolites est ensuite redirigé vers le fœtus via la veine ombilicale.

Les artères ombilicales peuvent mesurer entre 50 et 60 cm de long sans collatérales, sont composées des trois tuniques vasculaires précédemment décrites et possèdent un diamètre interne d'environ 4 mm (153,175). Leur surface luminale présente des aspérités appelées « valves d'Hoboken » pouvant être un atout dans le cadre d'une recellularisation, en favorisant l'adhésion cellulaire (176). Toutes ces caractéristiques font de ces artères un *scaffold* de choix dans l'ingénierie tissulaire vasculaire. Elles ont déjà fait l'objet d'investigations notamment dans les domaines de l'ingénierie microvasculaire et vasculaire (177,178).

En 1984, Keller et son équipe publient un article relatant l'étude *in vivo* d'un substitut vasculaire de petit diamètre fabriqué à partir d'une artère ombilicale humaine (177). Pour évaluer le potentiel clinique de ce substitut, des artères ombilicales d'un diamètre interne entre 1,5 et 2 mm ont été fixées au glutaraldéhyde puis intégrées dans le cadre d'un pontage vasculaire de l'aorte abdominale sur 10 mm chez 20 rats albinos. Après un mois de greffe, 90 % des artères ombilicales étaient toujours perméables. Ce pourcentage diminue avec l'augmentation du temps de greffe pour atteindre 40 % après 9 mois.

Plus récemment, Gui *et al.* ont publié une étude préclinique chez des rats *nude* dans le même contexte de pontage abdominal de l'aorte (178). Ici, le substitut vasculaire décrit consiste en une artère ombilicale humaine décellularisée par étapes

successives de bains en détergents 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) suivi de dodécylsulfate de sodium (SDS). La surface luminale de l'artère décellularisée est ensuite recellularisée à l'aide de cellules endothéliales provenant de veine ombilicale (HUVEC). Le comportement du greffon ainsi construit a été étudié en comparaison à une artère ombilicale décellularisée sur une période de 8 semaines d'implantation. A la fin de l'étude, tous les greffons recellularisés étaient perméables (n=4), ainsi que six greffons acellulaires (n=11). Sur les onze animaux ayant été greffés à l'aide du substitut vasculaire acellulaire, les cinq autres sont morts dans les heures suivant la chirurgie.

3. La gelée de Wharton

La gelée de Wharton est un tissu conjonctif présent au sein du cordon ombilical dans lequel sont ancrés les vaisseaux ombilicaux. Ce tissu composé de différentes protéines matricielles, et dans lequel sont présentes en quantité les CSM-GW, est relativement gélatineux et a notamment pour fonction de protéger les vaisseaux contre les phénomènes de compression et de torsion (179). La gelée de Wharton est essentiellement constituée de matrice extracellulaire, elle-même composée principalement de différents collagènes et protéoglycanes (majoritairement la décorine), protéines ayant un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire (180,181). Ce tissu est également source de facteurs de croissance comme l'*insulin-like growth factor* (IGF-1) ou encore le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), tous deux jouant un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation cellulaire, ainsi que dans la synthèse et le remodelage de la matrice extracellulaire (182).

Ainsi, de part tous ces aspects précédemment cités, la gelée de Wharton a suscité l'intérêt de plusieurs équipes travaillant dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. La décellularisation de ce tissu est proposée afin qu'il soit utilisé comme échafaudage (183). L'intérêt de ce support consiste en sa bio-activité pouvant supporter et optimiser la cellularisation notamment dans le cadre d'une cellularisation par des CSM, cellules de choix dans l'ingénierie tissulaire. Ce même principe a été étudié dans la promotion d'une différenciation hépatique de cellules humaines reprogrammées (hiPSC) (184), ou encore plus récemment dans le cadre d'une thérapie régénérative des disques intervertébraux (185).

D. Les résultats antérieurs de l'équipe

Mon projet s'inscrit dans la continuité d'une étude du greffon cellularisé construit au laboratoire dans un contexte d'implantation *in vivo* chez le lapin en remplacement de l'artère carotide. Les résultats de cette étude menée au cours de la thèse de Pan DAN, ont permis de vérifier la perméabilité du greffon et l'absence de thrombose, après 3 semaines de transplantation chez le lapin. Cependant, bien que très prometteur, ce greffon présentait des potentialités d'améliorations, notamment à visée « grade clinique ». Ma thèse avait donc comme objectif premier d'améliorer le procédé de fabrication du greffon pour que toutes les étapes répondent bien aux exigences du grade clinique, et d'un deuxième objectif qui était de confirmer les résultats chez le lapin par le passage à une étude chez le gros animal (le porc) plus proche de l'homme.

Objectifs de ma thèse

Ma thèse est divisée en trois parties, la première comprenant l'étude *in vitro* des différents composants de notre greffon vasculaire, et notamment l'optimisation et la caractérisation de la MEC-GW. La seconde partie se concentre sur l'évaluation *in vitro* des caractéristiques de notre greffon, son hémocompatibilité, ainsi que ses propriétés mécaniques, et la dernière qui consiste en l'évaluation préliminaire du greffon vasculaire *in vivo* selon différents contextes d'intégration vasculaire.

La première partie de ma thèse a consisté en la proposition d'améliorations dans le protocole de fabrication d'un nouveau biomatériau naturel, utilisable dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Pour cela, je me suis intéressé à produire et caractériser une MEC-GW à l'aide d'une méthode d'extraction chimique, plus en adéquation avec une optique clinique. Mon travail s'est donc porté sur l'optimisation de l'extraction mécanique de la MEC-GW, ainsi que sur la caractérisation du produit final obtenu, afin d'établir ses propriétés en tant que surface de recouvrement ou coating destinée à être utilisée en ingénierie tissulaire. Cette caractérisation a consisté en une analyse de son contenu, par différents dosages quantitatifs (ADN, protéines globales, GAG, et collagène), mais également par une analyse plus poussée effectuée par une étude protéomique en collaboration avec la plateforme de protéomique (IBSLor). Une fois son contenu déterminé, et dans l'optique d'une utilisation de cette MEC-GW dans un contexte d'ingénierie tissulaire, il a été important de caractériser la forme du dépôt obtenu. Pour cela, des mises au point de marquage fluorescent ont été établies afin de permettre la visualisation du dépôt en microscopie à épifluorescence, ainsi qu'en microscopie confocale. Parallèlement, et afin d'obtenir des informations sur la disposition de ce coating à l'échelle nanométrique, des analyses d'AFM ont été effectuées en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME). Afin d'évaluer les propriétés de la MEC-GW en tant que coating utilisable en ingénierie tissulaire, j'ai également étudié sa cytocompatibilité dans un contexte de cellularisation par des hCSM-GW. Bien que cette MEC-GW puisse-t-elle être utilisée dans le contexte globale de l'ingénierie tissulaire, sa conception avait initialement pour but de présenter un biomatériau intégrable dans le protocole de fabrication de notre greffon, permettant l'optimisation de la recellularisation de sa surface luminale. Ainsi, j'ai également mené une étude visant à

évaluer sa thrombogénicité afin de valider son hémocompatibilité dans un contexte vasculaire en collaboration avec le laboratoire DCAC (Défaillance Cardiovasculaire Aiguë et Chronique).

Au cours de ma thèse, j'ai également mené des études visant à ajouter plusieurs fonctions à la MEC-GW afin d'optimiser son impact selon différentes potentielles utilisations en ingénierie tissulaire. Ainsi, j'ai tout d'abord tenté de lui ajouter une composante anticoagulante *via* l'ajout d'héparine. Il a donc été nécessaire de vérifier l'impact de différentes concentrations d'héparine sur le dépôt de MEC-GW obtenu, ainsi que sur sa cytocompatibilité. Je me suis aussi intéressé à étudier la disponibilité de l'héparine au sein du coating ainsi que son efficacité. Parallèlement, j'ai initié une étude visant à intégrer une composante immunorégulatrice au sein de la MEC-GW, en y incorporant le sécrétome des hCSM-GW. Pour cela, j'ai donc tout d'abord évalué la pertinence de différents protocoles de stimulations pro-inflammatoires de ces cellules afin d'optimiser l'effet immuno-régulant du sécrétome obtenu.

La seconde partie de ma thèse a eu pour objectif d'optimiser les différentes étapes du protocole de développement du greffon *in vitro* pour qu'il soit adapté au mieux pour une étude préliminaire *in vivo* chez le porc. Ainsi j'ai pu valider l'efficacité de notre protocole de décellularisation de l'artère ombilicale, et également optimiser le temps nécessaire à la recellularisation complète de sa surface luminale. J'ai également mené des études visant à observer l'impact des différentes étapes de fabrication sur le caractère hémocompatible de l'artère, ainsi que sur ses propriétés mécaniques. J'ai donc étudié les effets potentiels des différents traitements appliqués au greffon [décellularisation, retournement (détaillé plus tard), recellularisation...] sur ces différents facteurs.

Enfin, la troisième partie de ma thèse consistant en la mise en place et la réalisation de l'étude *in vivo* de notre greffon vasculaire, a été effectuée en collaboration étroite avec l'École de Chirurgie ainsi qu'avec l'équipe de chirurgie cardiovasculaire du CHRU de Nancy.

Mon travail, au cours de cette dernière étude, a été tout d'abord de produire et de sélectionner les meilleurs greffons destinés à l'implantation. J'ai également pu assister et participer aux opérations chirurgicales de pontages vasculaires. Afin de suivre au mieux l'animal au cours de la période post-implantatoire, j'ai œuvré de concert avec

l'équipe de l'École de Chirurgie plusieurs fois par semaine, afin de permettre le suivi échographique du greffon implanté, tout en récupérant des échantillons sanguins de l'animal permettant d'établir un suivi de la numération sanguine. Le but de ce dernier étant de pouvoir détecter et de suivre l'évolution d'une éventuelle inflammation afin de pouvoir évaluer la nécessité d'administrer un traitement anti-inflammatoire ou de mettre fin à l'étude. Enfin, à la fin de la période d'étude, je me suis occupé des analyses histologiques et immunohistologiques des greffons explantés.

En termes de valorisation scientifique, le travail effectué au cours de mes 3 années de thèse a permis la production d'un article scientifique, en cours de soumission, traitant le protocole d'extraction de la MEC-GW et de la caractérisation fine de cette dernière en vue d'une utilisation en ingénierie tissulaire (la version « draft de cet article est produite dans l'annexe 2). À cela s'ajoute la publication d'une revue scientifique intitulée : « Cellularized small-caliber tissue engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard », publiée dans le journal « *npj Regenerative Medicine* » (produite dans l'annexe 1). Dans cette revue j'ai établi une analyse critique des différentes propositions, retrouvées dans la littérature, de greffons vasculaires de petits diamètre produits à l'aide d'une composante cellulaire, et ayant fait l'objet d'études pré-cliniques et/ou cliniques(102). Un prochain article, visant à publier l'étude mécanique du greffon, non encore décrite dans la littérature, est envisagée.

Durant ma thèse j'ai également eu la chance de présenter mes premiers résultats au sein d'un congrès international (SFA/GDR : Réparer l'Humain, « Engineering small vessels and micro-vascularisation for 3D models and regenerative medicine »), au cours duquel j'ai effectué une présentation orale suivie d'un moment de discussion autour d'un poster.

Matériels et méthodes

A. Les études *in vitro*

1. Les composants du greffon vasculaire

a. La récupération des cordons ombilicaux humains

Tous les composants de notre greffon vasculaire de petit diamètre sont extraits exclusivement de cordons ombilicaux humains. Ceux-ci proviennent tous de grossesses menées à terme et entrent dans le processus d'acheminement jusqu'au laboratoire à la suite du recueil du consentement éclairé de la mère (Numéro d'autorisation : TCG/11/R/011). Une fois les cordons prélevés par les sages-femmes de la Maternité Régionale de Nancy, les artères ombilicales sont rincées par ces dernières, à l'aide d'une solution héparinée afin d'éviter la formation de caillots sanguins qui pourraient fragiliser la paroi vasculaire, et limiter aussi la contamination de la GW par le sang. Les cordons sont ensuite immergés en solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) supplémentée en antibiotiques (2 % pénicilline, 2 % streptomycine, 2 % fungizone) à 4°C jusqu'à réception et manipulation au laboratoire.

b. Dissection des cordons ombilicaux et extraction des différents composants du greffon vasculaire

A partir de leur arrivée au laboratoire, les cordons sont manipulés en conditions stériles sous hotte à flux laminaires afin de limiter au maximum d'éventuelles contaminations.

Le processus d'extraction des différents composants d'intérêts (artères ombilicales et GW) débute par le lavage de la veine et des deux artères ombilicales par injection d'une solution de PBS 1x stérile (Sigma D1408-500 mL dilué 10 fois en eau distillée stérile). Une pipette de 2 mL est ensuite introduite à l'intérieur de la lumière de la veine ombilicale afin d'une part de rigidifier et d'allonger le cordon au maximum facilitant ainsi la procédure de récupération, mais également afin de s'assurer de ne pas récupérer de matériel provenant de cette veine lors de la récupération de la GW. Le cordon est ensuite ouvert longitudinalement en suivant la veine ombilicale à l'aide de pinces de dissection. Les 2 artères ombilicales sont ensuite délicatement désengagées du tissu environnant pour être nettoyées et rincées à l'aide d'une solution de HBSS stérile puis placées dans ce même tampon, supplémenté en

antibiotiques (1 % pénicilline, 1 % streptomycine, 1 % fungizone) à 4 °C afin de préserver leur intégrité mécanique au cours de la période de stockage.

Une fois les artères isolées, la GW est dissociée du cordon en grattant le tissu restant à l'aide d'une pince Quenu tout en évitant de prélever l'épithélium du cordon. La gelée est ensuite découpée en fins morceaux. La quantité de GW ainsi obtenue est ensuite divisée en 2 parties. La partie servant à la production de la MEC-GW est lavée 3 fois par immersion en solution de tampon phosphate salin (PBS), centrifugée 5 minutes à 3000 g, et enfin congelée à sec à -80 °C. L'autre partie est utilisée afin d'en récupérer les hCSM-GW par la méthode dite des « explants » (186). Décrite rapidement, les morceaux de GW sont mis en culture pendant 2 semaines en plaque 6 puits dans du milieu α -MEM supplémenté à 10 % de sérum de veau foetal (SVF), de fungizone (100 mg/mL), de pénicilline (200 mM) et de L-glutamine (200 mM). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours en prenant soin de ne pas retirer les morceaux de GW présents dans les puits.

c. [Contrôle qualité des artères ombilicales par observation histologique](#)

Les artères ombilicales stockées peuvent être de différentes longueurs allant de 5 cm à 40 cm. Afin de confirmer l'intégrité structurelle de la paroi artérielle, un morceau d'une longueur de 5 mm est prélevé pour chacune des artères et est placé en solution de formaldéhyde 4 % filtrée pour une période de 24 h. Une fois l'étape de fixation terminée ces échantillons sont déshydratés par une succession de bains d'alcool d'une concentration croissante pour ensuite être immergés en solution de Tissue-Clear® (Tissue-Tek® 1466). Cette étape de déshydratation est effectuée par un automate LEICA ASP300S, et précède l'inclusion des échantillons en paraffine (Tissue-Tek® TEC). Une fois les échantillons inclus, des coupes de 5 μ m d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome (Leica RM2135) et celles-ci sont soumises à une coloration hématoxyline-éosine (HE) permettant d'évaluer l'intégrité des différentes tuniques composant l'artère ombilicale. Pour cela les coupes sont déparaffinées puis réhydratées par immersion dans des bains d'alcools de degrés décroissants puis dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite mises en solution d'hématoxyline stabilisée (RAL Diagnostics) filtrée pour une période de 12 minutes, rincées à l'eau distillée puis plongées 1 minute en 400 mL d'éthanol 70 ° dans laquelle a été ajouté 1 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 12 N (1 % HCl en éthanol 70 °). Les coupes sont rincées une

nouvelle fois en eau distillée puis placées en eau du robinet pendant 10 minutes. Elles sont ensuite immergées 1 minute dans un bain d'éosine (312820, RAL Diagnostics) filtrée puis rincées en eau distillée. Enfin, elles sont déshydratées par des bains d'alcool de degrés croissant puis enfin par une immersion de 5 minutes en solution Tissue Clear afin de permettre le montage des lames.

d. Contrôle qualité des hCSM-GW par cytométrie en flux

Les hCSM-GW sont récupérées conformément à la méthode dite « des explants » en milieu de culture α -MEM (Lonza, 12-169F) supplémenté. Cette méthode a pour effet de laisser les cellules adhérentes migrer de la GW jusqu'au plastique du fond du puit. Ainsi seules les cellules ayant adhéré sont sélectionnées, et sont identifiées comme étant au passage 0 (P0). Une fois ces cellules arrivées à confluence, elles sont décollées du fond des puits par une incubation de 5 minutes à 37 °C dans un volume de 1 mL de trypsine 0,05 % (Trypsin-EDTA Solution 1X, MERCK 59417C). La réaction est stoppée par l'ajout de 2 mL de milieu α -MEM complémenté puis les cellules en suspension sont centrifugées 5 minutes à 300 g. Le milieu contenant la trypsine est alors retiré et les cellules sont resuspendues en milieu α -MEM complémenté puis réensemencées à une densité de 100 000 cellules par flasque T75. À ce stade, les cellules sont identifiées comme étant au 1^{er} passage. Les hCSM sont cultivées en milieu α -MEM jusqu'à leur 3^{ème} passage, stade auquel elles seront utilisées dans le processus de fabrication de notre greffon SMILING. Cette période de mise en culture a l'avantage de permettre la sélection des cellules capables d'auto-renouvellement tout en limitant la présence de cellules sénescents lors de leur utilisation.

Toutefois, afin de vérifier la pureté de la population cellulaire utilisée, les différentes souches sont, au préalable, caractérisées par cytométrie en flux selon un panel de marqueurs exprimés ou non se basant sur le phénotype défini par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire. Après trypsination et comptage, $5 \cdot 10^6$ cellules sont mises en suspension et incubée pendant 10 minutes à température ambiante (TA) avec de l'Human TruStain FcX (BioLegend BLE422302), réactif permettant de bloquer les récepteurs Fc présents sur les cellules et pouvant induire un marquage aspécifique. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 4 °C avec anticorps suivants : Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (1/1000, BioLegend 423101), Brilliant Violet 421™ anti-human CD73 (1/200, BioLegend 344008), FITC anti-human CD90 (1/200, BioLegend

328108), PE/Cy7 anti-human CD44 (1/200, BioLegend 328816), APC anti-human CD105 (1/200, BioLegend 323208), PE anti-human CD34 (1/200, BioLegend 343506), PE anti-human HLA-DR (1/200, BioLegend 307606), PE anti-human CD45 (1/200, BioLegend 304008) et PE anti-human CD86 (1/200, BioLegend 305406). Une fois l'étape de marquage terminée, les cellules sont lavées 3 fois avec 2 mL de PBS 2 %SVF puis centrifugées 5 minutes à 300 g. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 300 µL de PBS 2 %SVF puis analysées à l'aide d'un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter) à la plateforme de cytométrie en flux de l'UMS IBSLor. Les tubes contrôle pour cette caractérisation par cytométrie en flux consistent en des tubes « Fluorescent Minus One » (FMO) permettant d'établir avec précision le bruit de fond pour chacun des fluorochromes utilisés et ainsi optimiser considérablement l'analyse.

e. La préparation de la MEC-GW

La matrice utilisée au cours de nos différentes études est exclusivement extraite à partir de la GW prélevée sur des cordons ombilicaux frais humains. De par son origine naturelle, une relative hétérogénéité est attendue. Ainsi, afin d'homogénéiser au maximum le produit final, chaque lot de MEC-GW est produit à partir d'un pool de GW provenant de 3 cordons différents.

Initialement, la MEC-GW produite et utilisée au sein de l'équipe était issue d'une extraction enzymatique. Cependant, ce procédé était en contradiction avec la visée clinique du greffon. Ainsi, deux méthodes d'extraction mécanique des protéines matricielles ont été étudiées, l'une impliquant l'utilisation de PBS et l'autre se basant sur les propriétés de l'acide acétique.

f. L'extraction de la MEC-GW en acide acétique 0,5 M

La MEC-GW est produite suivant une méthode mécanique basée sur l'extraction de différentes protéines matricielles dans l'acide acétique. La GW extraite d'un cordon ombilical est coupée en morceaux, lavée puis congelée à sec à -80 °C jusqu'à son utilisation. Les différentes GW sont lentement décongelées à TA puis mélangées. Le pool de GW est ensuite rapidement lavé 2 fois en PBS 1 % Triton puis centrifugé 5 minutes à 3000 g. Cette étape est répétée une seconde fois mais cette fois-ci en laissant la GW incubé 5 min à TA avant d'être centrifugée. S'en suivent 3 lavages de 5 minutes en eau MQ stérile, chacun séparé par une étape de centrifugation. Une fois l'étape de lavage terminée, la GW est immergée dans de l'acide acétique 0.5 M à

raison de 2 volumes d'acide acétique pour 1 volume de GW. La GW est ensuite homogénéisée 10 minutes dans l'acide acétique, et sur glace, à l'aide d'un homogénéiseur DI 25 Basic (Yellowline by IKA). Après une incubation sur la nuit à 4 °C sous agitation, la solution est centrifugée à 10 000 g 30 minutes à 4 °C. Le surnageant visqueux ainsi obtenu est ce que nous appelons MEC-GW, et contient les protéines matricielles solubilisées en acide acétique. Il est récupéré, aliquoté et stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation dans nos différents protocoles.

2. La caractérisation de la MEC-GW extraite en acide acétique

Afin de permettre une caractérisation optimale, trois lots de MEC-GW extraits à partir de trois GW différentes chacun ont été produits. Les analyses effectuées ont ainsi été faites sur au minimum trois lots différents de MEC-GW (nommés : MEC-GW A, B et C).

a. Analyse du contenu en ADN

i. Extraction d'ADN, dosage et migration sur gel d'agarose

Afin de procéder au dosage des acides nucléiques, ceux-ci ont été extraits des différents échantillons à l'aide du kit Quick-DNA™ Miniprep Plus (ZymoResearch D4068). La quantité d'ADN au sein d'une MEC-GW est comparée à celle présente initialement dans le tissu natif de GW dont elle est extraite.

Afin de permettre l'extraction des acides nucléiques, les différents échantillons ont été préparés selon leur état : liquide dans le cas de la MEC-GW, ou solide dans le cas du tissu natif de GW.

Concernant les échantillons solides : 25 mg de GW ont été placés dans un microtube dans lequel ont été ajoutés 95 µL d'eau distillée, 95 µL de « Solid Tissue Buffer » ainsi que 10 µL de Proteinase K. Le tube est ensuite vortexé 15 secondes et incubé 5 heures à 55 °C avant d'être centrifugé 1 minute à 14 000 g afin de culoter les débris. Le volume de surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube au sein duquel 2 volumes de « Genomic Binding Buffer » sont ajoutés. Le tube est ensuite vigoureusement vortexé.

Afin de préparer les échantillons de MEC-GW, 200 µL de chaque MEC-GW sont placés en microtube, auxquels sont ajoutés 200 µL de la solution « Biofluid & Cell Buffer » ainsi que 20 µL de proteinase K. Le tube est ensuite vortexé 25 secondes et incubé 10 minutes à 55°C. 420 µL de

« Genomic Binding Buffer » sont ensuite ajoutés aux échantillons digérés et le tube est mélangé vigoureusement.

Une fois tous les échantillons digérés, les différents échantillons sont transférés en colonnes « Zymo-Spin™ IIC-XLR » dans un tube de récupération puis centrifugés 1 minute à 12 000 g. La colonne est ensuite placée dans un nouveau tube de récupération et 400 µL de « DNA Pre-Wash Buffer » sont déposés sur la colonne. Le tube est ensuite centrifugé 1 minute à 12 000 g. Le tube de récupération est vidé et une première étape de lavage de la colonne est effectuée par dépôt de 700 µL de « g-DNA Wash Buffer » suivie d'une centrifugation d'une minute à 12 000 g. Le tampon est retiré du tube et une nouvelle étape de lavage est effectuée par dépôt de 200 µL « g-DNA Wash Buffer » suivie d'une centrifugation d'une minute à 12 000 g. La colonne est ensuite transférée dans un nouveau microtube dans lequel 75 µL de « DNA Elution Buffer » est ajouté. Le mélange est incubé 5 minutes à TA puis centrifugé à 12 000 g. La teneur en acides nucléiques de chaque échantillon est ensuite déterminée par lecture au spectrophotomètre NanoDrop™ One (Thermo Scientific). Les échantillons digérés obtenus ont également été analysés par dépôt sur gel d'électrophorèse (0,8 % d'agarose en tampon Tris-acétate-EDTA) et visualisés selon la méthode GelRed (Biotium, Hayward, CA).

b. L'analyse du contenu protéique

i. Analyse protéomique

Cette analyse s'est effectuée en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'IBSLor. Afin de préparer les échantillons, 100 ng de pepsine (Sigma) sont ajoutés à 10 µL de MEC-GW, en triplicata, sur la nuit, à 4 °C. Les échantillons digérés sont ensuite séchés par une incubation de 2 heures à l'aide d'un concentrateur (SpeedVac Vacuum Concentrator, ThermoFisher Scientific). Ils sont ensuite resuspendus dans 10 µL d'urée 6 M, Tris 50 mM à pH 8 et traités selon le protocole suivant : les résidus cystéines sont réduits par ajout de Dithiothreitol (DTT) à 4 mM pendant 45 minutes, alkylés par ajout d'iodoacétamide (IAA) à 40 mM pour 45 minutes qui est ensuite bloqué par une étape de 10 minutes de DTT à 40 mM. 90 µL de Tris 100 mM, CaCl₂ 10 mM sont ajoutés avec 1/40 de trypsine grade protéomique (poids trypsine/poids extrait protéique) (Promega) pour une incubation sur la nuit à 37 °C. Les échantillons sont ensuite acidifiés par ajout de 5 µL d'acide trifluoroacétique 10 % puis fractionnés

par nanoHPLC à l'aide d'un appareil UltiMate3000. 5 µL de chaque échantillon est injecté et élué par un gradient acetonitrile 2-45 % sur 90 minutes à 300 nl/min. 226 fractions sont ainsi récupérées et mixées à de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Brucker). La quantification relative des peptides est ensuite effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse Autoflex speed MALDI-TOF/TOF (Brucker). Les résultats sont analysés à partir de l'analyse MS du logiciel ProfileAnalysis (Brucker) avec un alignement temporel et une normalisation par quantile, exigeant une valeur minimale de 3 pour mettre en évidence les changements significatifs entre échantillons indépendants.

ii. Quantification de différentes protéines d'intérêt

Dosage des protéines totales : le dosage BCA

Le dosage des protéines totales est effectué par la méthode de BCA (Bicinchonic Acid Assay) sur chacune des MEC-GW extraites afin d'évaluer leur contenu protéique. Cependant il est à noter que ce dosage sous-estime fortement la concentration réelle de la matrice en protéines puisque ce test ne permet pas de doser le collagène, protéine majoritaire de la MEC-GW. En effet, ce dosage BCA se base sur la détection optique de la réduction du cuivre principalement due à 4 acides aminés que sont la cystéine ou cystine, la tyrosine ainsi que le tryptophane (187). Cependant le collagène est une protéine formée d'hélices composée de séquences répétées de glycine suivie fréquemment de proline ou d'hydroxyproline (188). Tout cela implique une faible affinité du test BCA pour la quantification du collagène présent dans un échantillon.

La concentration de l'échantillon est déterminée selon une gamme étalon comprenant 8 concentrations croissantes en albumine de sérum bovin (BSA), allant de 0 à 2000 µg/mL effectuée en triplicata. La droite d'équation obtenue suit une fonction affine et permet ensuite de calculer la concentration en protéines des échantillons testés. La gamme étalon est produite en plaque 96 puits, en diluant une solution mère de BSA à 2 mg/mL dans de l'eau distillée pour un volume final de 25 µL par puits. Les échantillons sont également déposés en triplicata à raison de 25 µL par puits. Parallèlement, la solution de réactif est préparée en ajoutant 1 volume de CuSO_4 à 50 volumes d'acide bicinchronique, et 200 µL de cette solution sont ajoutés dans chacun des puits. La plaque est ensuite incubée 30 minutes à 37 °C, à l'abri de la

lumière puis l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific).

Dosage du collagène : le dosage de Bradford amélioré

Afin de pouvoir quantifier la quantité de collagène présente au sein de la MEC-GW, j'ai utilisé une méthode bien connue de quantification de protéines qu'est la méthode de Bradford. Cependant, tout comme le dosage au BCA, cette technique dans son protocole de base, ne permet pas non plus de quantifier le collagène présent dans l'échantillon. En revanche, un variant de ce protocole établi par Lopez *et al* et publié en 1993 permet d'obtenir, via l'ajout de SDS à 0,0035 %, une détection de la quantité de collagène présente dans l'échantillon (189).

La concentration de l'échantillon est établie, en plaque 96 puits, en comparaison d'une gamme de collagène de concentrations croissantes allant de 0 à 0,7 µg/µL, effectuée en triplicata en acide acétique 0,5 M. Les échantillons de MEC-GW sont testés purs et dilués 2 et 5 fois en acide acétique 0,5 M également. Pour mener à bien ce test, 1 L de réactif de Bradford (5x) est préparé extemporanément en solubilisant 100 mg de Bleu de Coomassie G-250 dans 50 mL d'éthanol 95 % sous agitation pendant 2 heures, puis en y ajoutant 100 mL d'acide phosphorique 85 % et la quantité d'eau distillée nécessaire pour obtenir 1 L de solution. Ensuite, le réactif de Bradford 5X est dilué 5 fois en eau distillée et supplémenté de 0,0035 % de SDS. Une fois les échantillons et la gamme préparés, 250 µL de la solution de Bradford-SDS sont ajoutés dans chacune des puits et l'absorbance de la plaque est mesurée à 595 nm dans les 30 minutes.

Dosage des glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés

La concentration en GAG sulfatés de la MEC-GW extraite a été quantifiée par une méthode spectrophotométrique et déterminée selon une courbe standard (190). Les dilutions standard ont été préparées en diluant en série une solution standard de Chondroïtine-6-Sulfate (C4384-1G, Sigma) à 1 mg/mL avec un tampon TRIS (50 mM, pH 8) afin d'avoir une gamme allant de 0 à 250 µg/mL. Pour préparer les échantillons, 1 mL de chaque ECM a été séché pendant 48 heures à 56 °C. Ils ont ensuite été digérés sur la période d'une nuit à 60 °C dans une solution tampon de 200 µL (NA₂HPO₄ : 20 mM, EDTA : 1,4 mM, Dithiotreitol (DTT) : 0,2 mM) à laquelle sont ajoutés 10 µL d'une solution de papaine à 6 mg/mL (Papain from papaya latex, P4762-

100MG, Sigma). Le lendemain la réaction est arrêtée par ajout de 10 μ L d'une solution d'acide iodoacétique (Merck, L328074 009) à 0,22 M) et de 380 μ L de tampon TRIS (50 mM, pH 8). 20 μ L de chaque préparation d'échantillon et de standard sont ensuite placés en triplicatas dans une plaque à 96 puits à fond transparent. Après ajout de 250 μ L de solution de Goldberg dans chacun des puits (obtenue en dissolvant 32 mg de 1,9-DiméthylrnythyleneBlue (DMB, Polysciences Inc 23481-50-7) dans 5 ml d'éthanol), la densité optique (DO) de chaque puits est mesurée à 525 nm à l'aide d'un lecteur de plaque automatisé (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific).

c. Le dépôt de la MEC-GW, méthodes d'obtention (dip coating) et d'observation.

Afin d'obtenir un coating de MEC-GW, 400 μ L de la solution en acide acétique 0,5 M sont déposés en puit de plaque de culture 24 puits pour une incubation de 24 h à 37 °C. À la fin de l'incubation, la solution de MEC-GW est aspirée et chaque puits est abondamment rincé en eau distillée par 3 lavages consécutifs d'une durée de 5 minutes. Afin de permettre l'analyse du dépôt obtenu en AFM ou en microscopie confocale, une lamelle de verre traitée de 14 mm de diamètre est préalablement déposée au fond de chacun des puits. Ce traitement de polarisation du verre consiste en l'immersion des lames de verre en solution de SDS 0,1 % à 60 °C sous agitation pendant 20 minutes. Trois lavages à l'eau MQ sont ensuite effectués et les lames sont incubées 20 minutes dans une solution de HCL 0,1 M à 60 °C. Trois lavages à l'eau MQ sont de nouveau appliqués et les lamelles sont ensuite stockées à 4 °C en eau MQ. Dans le cas de coating de plaques 48 puits ou 96 puits, sont déposés respectivement 200 μ L et 100 μ L de MEC-GW en solution.

i. Observation du dépôt par marquage fluorescent de la MEC-GW

Le dépôt de la MEC-GW est observé par marquage des amines primaires de protéine de la matrice en utilisant le réactif NH₂-Sulfo-NHS-Biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-biotin, ThermoScientific 21331). Pour cela, la MEC-GW sous sa forme liquide est incubée sur la nuit à 4 °C sous agitation avec le réactif NH₂-Sulfo-NHS-Biotin à une concentration de 0,48 mg/mL. Le lendemain la réaction de liaison est stoppée par l'ajout de 50 mM de Tris-Base. 400 μ L de la MEC-GW marquée sont ensuite déposés en triplicata en plaque 24 puits pendant 24 heures à 37 °C. Chaque puit est ensuite lavé 5 fois à l'eau distillée stérile et incubé 30 minutes à TA avec la Streptavidin-AlexaFluor™ 488 conjugué d'Invitrogen (ThermoFisher Scientific, S11223) à une

dilution de 1/200. Après la période d'incubation, les dépôts sont lavés à l'eau distillée et observés par microscopie à épifluorescence et par microscopie confocale (en collaboration avec la plateforme d'imagerie IBSLor) respectivement à l'aide des appareils : Leica DMI 3000B et Leica TCS SP5 X.

ii. Observation du dépôt par microscopie à force atomique (AFM)

Ces expériences d'AFM ont été effectuées en collaboration avec le Dr. Gregory FRANCIUS (LCPME, UL). Avant chaque mesure, les échantillons frais déposés sur une lame de verre ont été abondamment rincés avec de l'eau milli-Q, puis lentement et complètement figés à l'azote. Les expériences d'AFM ont été réalisées avec l'instrument MFP3D-BIO (Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Allemagne). Les cantilevers en nitrure de silicium utilisés pour ces expériences sont des Peakforce-HIRS-SSB de forme conique et ont été achetés chez Olympus (Bruker). Les expériences ont été réalisées à l'air et à TA. Les images AFM ont été enregistrées à TA en mode contact. Toutes les images ont été recueillies avec une résolution de 512x512 pixels à une fréquence de balayage de 1 Hz.

d. L'étude de la cytocompatibilité du coating de la MEC-GW

Afin d'étudier la cytocompatibilité de la MEC-GW, celle-ci est évaluée par des tests de prolifération cellulaire, d'activité métabolique et de cytotoxicité sur des hCSM-GW ensemencées sur la coating obtenu à l'aide de notre MEC-GW. Ces tests sont effectués après 1, 7 et 12 jours de culture en milieu α -MEM. Les résultats sont comparés à une condition contrôle pour laquelle les cellules sont déposées sur coating de collagène de culture de type 1 (Corning, 354236). Ce dépôt est effectué en déposant 400 μ L de collagène de culture à une concentration de 0,1 mg/mL dans chacun des puits. Cette solution est laissée incubée 1 heure à 37 °C à la suite de quoi les puits sont lavés

i. L'activité métabolique des hCSM-GW

L'activité métabolique des hCSM-GW est évaluée par un test MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Rapidement, les cellules sont ensemencées à une densité de $1,5 \cdot 10^3$ cellules par cm^2 en plaque 24 puits préalablement « coatés » avec la MEC-GW. L'activité métabolique des cellules est évaluée après 1, 7 et 12 jours de culture. Pour cela, la solution de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma M2128-5G) est préparée par dissolution du sel de

tetrazolium MTT dans du PBS à une concentration de 2 mg/mL. Cette solution est ensuite ajoutée dans les puits contenant 100 µL de milieu α -MEM pour une incubation de 4 heures à 37 °C. Le milieu est ensuite lentement récupéré et les cristaux de formazan présents dans les différents puits sont dissous en 5 minutes dans 200 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO). 100 µL sont transférés, en duplicata, dans une plaque 96 puits et la mesure de l'absorbance est effectuée pour une longueur d'onde de 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific).

ii. La prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est analysée par mesure de la quantité d'ADN au cours du temps par un test de Hoechst en utilisant le kit *Hoechst 33258 fluorescent dye assay* (Invitrogen, H3569, France). Pour cela les hCSM-GW sont ensemencées à une densité de $1,5 \cdot 10^3$ cellules par cm^2 en plaque 24 puits préalablement coatés avec la MEC-GW. Au 1^{er}, 7^{ème} et 12^{ème} jour de culture le milieu α -MEM est retiré de chacun des puits, et les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation-décongélation dans du tampon Hoechst. Pour la préparation de 250 mL de ce dernier, il faut mélanger 302,8 mg de Tris-base (10 mM) avec 93 mg d'EDTA EDTA (1 mM) et 1,461 g de NaCl (0,1 M), compléter le volume à 250 mL avec de l'eau distillée puis ajuster le pH de la solution à 7,4 avec de l'HCl. 900 µL d'une solution de Hoechst à 0,1 µg/mL sont ajoutés dans chacun des puits et 300 µL (en triplicata) sont transférés en plaque noire de 96 puits. La fluorescence à 458 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific) pour une longueur d'onde d'excitation de 356 nm. La quantité d'ADN est calculée par extrapolation par rapport à une courbe obtenue à l'aide de 8 points de gamme générée avec de l'ADN de thymus de veau (Sigma, D3664).

iii. La cytotoxicité de la MEC

Parallèlement à cette étude de la prolifération cellulaire, la cytotoxicité potentielle du coating de la MEC-GW est évaluée par mesure de la lactate deshydrogénase (LDH) à l'aide du kit *LDH assay Cytotoxicity Detection Kit^{plus}* (Roche, 04744934001). La LDH est une enzyme cytosolique relarguée dans le milieu de culture à la suite d'une atteinte de la membrane plasmique. À chaque point de la cinétique établie, 100 µL de chaque puits (en triplicata) sont transférés en plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 100 µL de la solution de réaction (préparée en mélangeant un volume de *Catalyst* avec 45

volumes de *Dye Solution*). Après une incubation à TA de 20 minutes sous agitation et à l'abri de la lumière, l'absorbance des puits pour une longueur d'onde de 490 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific).

e. [Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW](#)

Cette étude comporte l'évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW sous sa forme de dépôt. Cette caractéristique est mesurée en utilisant la méthode de génération de thrombine, en collaboration avec le laboratoire « Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique » (DCAC, UMR-S 1116, Université de Lorraine).

Afin d'évaluer la thrombogénicité de la MEC-GW celle-ci est utilisée pour « coater » des puits en plaque 96 puits. Après avoir abondamment rincé les puits à l'aide de PBS 1x, 10µL de tampon salin HEPES (HBS) sont ajoutés dans chacun des puits, 40 µL de plasma humain (pool provenant de trois donneurs différents ainsi que des vésicules phospholipidiques (Avanti Polar Lipids, USA) à une concentration finale de 4 µmol/L. La coagulation est déclenchée par ajout de facteur tissulaire humain recombinant (Innovin®, Dade Behring) à une dilution de 1/30 000. La génération de thrombine est monitorée par la quantification d'un substrat fluorescent spécifique à la thrombine, P2Rho (Synapse B.V.), au sein d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent (LabSystem). Une mesure de fluorescence est effectuée toutes les 15 secondes sur une période de 50 minutes, selon les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 390 nm et 460 nm. Les résultats obtenus sont ensuite analysés à l'aide du logiciel dédié « Thrombinoscope® » (Synapse, Maastricht), et exprimés en potentiel de thrombine endogène (ETP), mesure directement corrélée au potentiel thrombogénique de l'échantillon (191).

f. [Étude de l'effet de l'application du coating de MEC-GW sur la surface luminale du greffon](#)

Afin de déterminer l'impact d'un recouvrement de la surface luminale de l'artère avec la MEC-GW sur la cellularisation de celle-ci, j'ai entrepris une étude permettant d'observer la propagation cellulaire de hCSM-GW à la surface luminale, au cours du temps. Pour cela 3 artères ombilicales de plus de 20 centimètres ont été isolées puis sectionnées en leur centre afin de procéder aux deux conditions de l'expérience sur chacune des artères. Le protocole de fabrication du greffon (explicité plus bas, dans

la partie « [La production du greffon SMILING](#) » de ce chapitre) a été appliqué à chacun de ces segments artériels avec pour seule différence, l'application ou non du coating de la MEC-GW à leur surface luminale. Ainsi, pour chacune des trois artères ombilicales humaines utilisées dans cette étude, nous avons obtenu un segment dont la surface luminale a été coatée et l'autre non. Chacun de ces segments a ensuite été cellularisé à avec une solution de cellules en suspension d'une densité cellulaire de 70 000 cellules/cm avec la même souche de hCSM-GW préalablement marquées au Dil. Les segments artériels ont ensuite été mis en culture pendant 14 jours, période au cours de laquelle le milieu α -MEM était changé trois fois par semaine. La vitesse de cellularisation était observée tous les jours et des photos aux 1^{er}, 2^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème}, et 9^{ème} jour ont été prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Après 9 jours de culture les différents segments artériels cellularisés ont également été observés en macroscopie à fluorescence afin d'obtenir des images plus représentatives de l'état de cellularisation de la surface luminale.

3. Le projet MHUFIN ou la fonctionnalisation de la MEC-GW

a. Ajout d'une composante anticoagulante

i. Incorporation directe de l'héparine

La solution d'héparine utilisée pour la préparation des MEC-GW héparinées est une héparine sodique non fractionnée, conditionnée à une concentration de 5000 UI/mL (Héparine Choay®). Les MEC-GW héparinées sont préparées aux différentes concentrations 0,05 UI/mL ; 0,5 UI/mL ; 1 UI/mL ; 2,5 UI/mL, 5 UI/mL et 50 UI/mL.

ii. Validation du dépôt de la MEC héparinée

La validation du dépôt de la MEC-GW héparinée se fait selon le même protocole précédemment décrit dans la partie « [Observation du dépôt par marquage fluorescent de la MEC-GW](#) » :

Le dépôt de la MEC-GW héparinée est observé par marquage des amines primaires de protéine de la matrice en utilisant le réactif NH₂-Sulfo-NHS-Biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-biotin, ThermoScientific 21331). Pour cela, la MEC-GW héparinée sous sa forme liquide est incubée sur la nuit à 4 °C sous agitation avec le réactif NH₂-Sulfo-NHS-Biotin à une concentration de 0,48 mg/mL. Le lendemain la réaction de liaison est stoppée par l'ajout de 50 mM de Tris-Base. 400 μ L de la MEC-GW marquée sont ensuite déposés en triplicata en plaque 24 puits pendant 24 heures à 37 °C. Chaque

puit est ensuite lavé 5 fois à l'eau distillée stérile et incubé 30 minutes à TA avec la Streptavidin-AlexaFluor™ 488 conjugate d'Invitrogen (ThermoFisher Scientific, S11223) à une dilution de 1/200. Après la période d'incubation, les dépôts sont lavés à l'eau distillée et observés par microscopie à épifluorescence.

iii. Cytocompatibilité de la MEC héparinée

La cytotocompatibilité de la MEC-GW héparinée se fait selon le même protocole précédemment décrit dans la partie « L'étude de la cytotocompatibilité du coating de la MEC-GW ».

iv. Étude du relargage de l'héparine active par le coating de MEC-GW héparinée

Le but de ce test est en premier lieu d'étudier la capacité de notre coating de relarguer l'héparine mais aussi de vérifier l'efficacité de cette dernière après relargage, d'une manière indirecte, en dosant le facteur X_a dans le milieu de culture. Le dosage de l'héparine active s'effectue selon le kit Coamatic® Heparin (82 3393 63, Chromogenix), en comparaison d'une courbe gamme produite à partir d'échantillons de plasma sanguin humain supplémenté en héparine Choay® à une concentration de 0,8 UI/mL. Ce plasma est ensuite dilué à l'aide de plasma normal pour obtenir des concentrations en héparine à 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8 UI/mL. Ces points de gamme sont ensuite dilués au quart dans du plasma sanguin normal et 50 µL sont déposés en plaque 96 puits en triplicata.

Ce dosage est effectué sur les MEC-GW héparinées en solution acide avant et après dépôt, ainsi que sur le surnageant de culture ayant été déposé sur le coating de MEC-GW héparinées après 4 h d'incubation, 24 h et 48 h. Afin de préparer les échantillons pour l'analyse, 200 µL d'échantillons sont tout d'abord concentrés jusqu'à évaporation complète par une incubation au SpeedVac Vacuum Concentrator (ThermoFischer) (incubation sur la nuit) puis resuspendus dans 50 µL d'eau distillée. Les 50 µL d'échantillons sont ensuite déposés en plaque 96 puits aux cotés des puits de gamme, en triplicata et la plaque est incubée 5 minutes à 37 °C. Dans l'ordre, 50 µL des réactifs S-2732 et du Facteur X_a préchauffés sont ajoutés dans chacun des puits et la plaque est mise sous agitation durant 2 minutes à TA. L'absorbance des puits est ensuite lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific) à la longueur d'onde de 405 nm.

v. Test de thrombogénicité du coating de MEC-GW héparinée

L'activité anticoagulante du coating de la MEC-GW héparinée est testée sur différentes conditions en fonction du temps et comparée à la condition MEC-GW native. Pour cela trois différentes concentrations en héparine ont été testées : 0,05 UI/mL ; 2,5 UI/mL et 5 UI/mL, sur une cinétique s'étendant de J0 à J3. 200 µL de chacune des MEC-GW héparinées ou non sont déposés en plaque 96 puits à 37 °C sur une période de 24 h. Une fois le coating effectué, l'excès de MEC-GW non sédimentée est retiré et les puits sont lavés vigoureusement à l'aide de PBS 1x. Chacune des conditions est effectuée en duplicata et est comparée à une condition plasma témoin.

La thrombogénicité de la MEC-GW héparinée s'effectue selon le même protocole de génération de thrombine précédemment décrit dans la partie « [Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW](#) ».

b. Ajout d'une composante immunomodulatrice

i. Optimisation du sécrétome anti-inflammatoire des hCSM-GW

Traitements pro-inflammatoires des hCSM-GW

Trois souches différentes de hCSM-GW à P3 sont décongelées et réensemencées en plaque de culture 24 puits en 500 µL de milieu α -MEM complet à une densité de 10000 cellules par puits. Le milieu est renouvelé à j2, et à j4 le milieu ajouté est complété selon les conditions suivantes retrouvées dans la bibliographie :

- Non stimulées
- IL-1 β à 1 ng/mL ; 10 ng/mL ; et 20 ng/mL
- TNF α à 10 ng/mL ; 20 ng/mL ; et 50 ng/mL
- IFN γ à 10 ng/mL ; 30 ng/mL ; et 50 ng/mL
- Mix 1 (IL-1 β 10 ng/mL, TNF α 20 ng/mL et IFN γ 30 ng/mL)
- Mix 2 (TNF α 20 ng/mL et IFN γ 30 ng/mL).

Chacun des traitements a été testé sur une période de 24 et 48 heures. Une fois le traitement terminé, les différents surnageants ont été récoltés puis poolés selon la condition et la souche pour ensuite être centrifugés à 500 g pendant 5 minutes. Une fois les débris culottés, les différents pools de surnageants sont aliquotés à raison de 500 µL par cryotube conservés à -80 °C. Pour chaque condition, les cellules présentes dans 3 puits ont été récupérées par grattage et congelées à sec à -80 °C.

Analyse du milieu par Multiplex (LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1, BioLegend 740808)

L'analyse de la concentration des différentes cytokines inflammatoires s'effectue en plaque 96 puits à filtration, en comparaison à une gamme produite par dilution en cascade (facteur de dilution de 4 par étape) de 100 µL *Lyophilized Human Inflammation Panel 1* préalablement reconstitué avec 250 µL d'*Assay Buffer*. Les puits de gammes sont préparés en duplicata en y déposant 25 µL de la solution de concentration connue avec 25 µL d'*Assay Buffer*. Les échantillons sont préalablement dilués au demi à l'aide de l'*Assay Buffer* et déposés selon le même protocole que les puits de gamme. 25 µL de la solution *Premixed Beads* sont ajoutés à chacun des puits, la plaque est ensuite scellée et mise à agiter 2 heures à 500 rotations par minute (rpm) dans l'obscurité. Les puits sont ensuite aspirés à l'aide du *MultiScreen Vacuum Manifold* (Millipore) puis lavés 2 fois par ajout de 200 µL de *Wash Buffer* dans *chacun des puits*. À la suite de cette étape de lavage, 25 µL de *Detection Antibodies* sont ajoutés dans chaque puit, la plaque est scellée et mise à incuber 1 heure à l'obscurité sur un mélangeur de plaque à 500 rpm. 25 µL de la solution *SA-PE* sont ensuite ajoutés dans chaque puits puis la plaque est scellée et mise à agiter à 500 rpm pour 30 minutes à l'obscurité. La plaque est ensuite rincée et lavée selon le protocole d'aspiration précédemment décrit. Le contenu des puits est ensuite suspendu dans 150 µL de *Wash Buffer* par flux et reflux consécutifs à l'aide d'une micropipette et transvasé en tube de polypropylène pour cytométrie en flux. Les tubes sont ensuite analysés à l'aide d'un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter) sur une population standardisée de 4000 billes. Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel d'analyse *LEGENDplex™ Data Analysis* (BioLegend).

Analyse du milieu par la méthode ELISA

Ces analyses ont été effectuées sur les surnageants de culture récupérés suite aux différents traitements pro-inflammatoires appliqués aux hCSM-GW, explicités dans le chapitre consacré : « [Traitements pro-inflammatoires des hCSM-GW](#) ».

Afin d'étudier la sécrétion de certaines cytokines anti-inflammatoires, 4 kits ELISA sandwich pour IDO, VEGF, l'IL-6, MCP-1 (kit DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), ont été utilisés, selon les protocoles décrits par le fabricant et en combinaison avec le kit DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Les

gammes étalons pour les différentes cytokines analysées étaient de 30 à 0,469 ng/mL pour IDO, de 2000 à 31,3 pg/mL pour VEGF, de 600 à 9,38 pg/mL pour IL-6, et de 1000 à 15 pg/mL pour MCP-1. Les surnageants ont été testés purs pour IOD et VEGF, et dilués 20 fois pour l'IL-6, et 10 fois pour MCP-1. Rapidement, les puits sont coatés à l'aide de 100 µL de la solution *Capture Antibody* de la concentration indiquée selon le protocole fournit. L'incubation s'effectue sur la durée de la nuit, à TA. Le lendemain matin les puits sont aspirés et lavés vigoureusement à l'aide de la solution de lavage (*Wash Buffer*). Les puits sont ensuite bloqués par une incubation d'une heure à TA avec 300 µL de la solution de *Reagent Diluent* puis lavés vigoureusement à l'aide du tampon de lavage. 100 µL des solutions de gammes, et des échantillons sont déposés en duplicata et incubés 2 heures à TA. La plaque est ensuite lavée et 100 µL de la solution *Detection Antibody* dilués à la concentration indiquée (variable selon le kit DuoSet utilisé) sont déposés dans chacun des puits pour une durée de 2 heures à TA. Après un nouveau lavage de la plaque, 100 µL de la solution *Streptavidin-HRP* sont ajoutés dans les puits pour une durée de 20 minutes, à l'abri de la lumière et à TA. Un dernier lavage est appliqué à la plaque puis 100 µL de *Substrate Solution* sont ajoutés pour une incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière et à TA. La réaction est alors stoppée par ajout de 50 µL du réactif *Stop Solution* et l'absorbance de chacun des puits est analysées à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Flash®, ThermoFisher Scientific) pour la longueur d'onde 450 nm. La valeur obtenue est corrigée selon la DO à 540 nm.

- ii. Production et caractérisation d'un pool de sécrétome anti-inflammatoire suite au traitement des cellules par Mix 2

Production du pool de sécrétome anti-inflammatoire d'hCSM-GW

Afin de produire un pool de sécrétome utilisable pour les expériences de fonctionnalisation 3 souches d'hCSM-GW en P3 sont cultivées en flasque T75 en milieu α -MEM complet, jusqu'à atteindre 80 % de confluence. Elles sont ensuite soumises au traitement Mix 2 (TNF α 20 ng/mL et IFN γ 30 ng/mL). Deux conditions sont effectuées, l'une consistant en une incubation de 24 heures suivie de la récupération du milieu contenant le sécrétome, et l'autre condition consistant en un traitement de 6 heures à la suite duquel le milieu est remplacé par du milieu frais pour une période de 24 heures pour ensuite être récupéré. Les différents sécrétomes sont

ensuite centrifugés 5 minutes à 300 g afin de culotter les potentiels débris cellulaires et aliquotés avant leur stockage à -80 °C.

Caractérisation du pool de sécrétome anti-inflammatoire d'hCSM-GW

Les différents sécrétomes sont décongelés et analysés afin de connaître leur concentration en cytokines IL-6 et MCP-1. Ces analyses sont effectuées par ELISA, expériences précédemment décrites dans le chapitre : « [Analyse du milieu par la méthode ELISA](#) ».

4. La production du greffon SMILING

Le protocole de fabrication du greffon SMILING s'effectue sur une période de 12 jours qui s'étend de la décellularisation de l'artère ombilicale, jusqu'au moment de l'implantation chez l'animal. Pour chaque opération prévue chez l'animal, deux greffons sont préparés en parallèle.

Le greffon est produit sur la base d'une artère ombilicale humain décellularisée. Pour cela, à J0 une artère ombilicale d'une longueur minimale de 10 cm est retirée du stock établi pour être rincée au PBS stérile. L'artère est perfusée à l'aide d'une solution SDS 0,5 % filtrée, solution dans laquelle l'artère est ensuite complètement immergée toute la nuit à 37 °C sous agitation. Le lendemain l'artère est abondamment rincée, par perfusion et immersion, tout d'abord par 3 lavages rapides en PBS puis par 3 lavages consécutifs d'une durée de 2 h chacun en PBS, sous agitation à 37 °C. A la suite de ces lavages, l'artère est ensuite perfusée et immergée en solution de benzonase (endonucléase, MERCK 1.01654.0001) à 5 UI/mL pour une incubation sur la nuit à 37 °C sous agitation, permettant ainsi la dégradation des fragments d'ADN libérés dans le tissu à la suite de l'étape de SDS. Le protocole de lavage intensif précédemment décrit est de nouveau appliqué le lendemain afin d'éliminer les résidus nucléiques ainsi que la benzonase de l'artère.

L'artère décellularisée est ensuite retournée afin d'exposer la surface luminale vers l'extérieur. Cette manipulation facilitera par la suite l'application du coating de la MEC-GW ainsi que l'ensemencement de la surface luminale. Afin de retourner l'artère, celle-ci est tout d'abord enfilée le long d'une sonde à gaver. Une fois l'artère en place, un fil de chirurgie 4-0 (VICRYL, ETHICON) est passé à l'intérieur de la sonde, puis un nœud est effectué autour d'une des deux extrémités de l'artère. Cette extrémité nouée est ensuite utilisée comme point de retournement, et cela en amenant délicatement, l'artère

à passer de l'autre côté du nœud. Une fois le retournement complètement effectué le fil chirurgical est laissé en place afin de rendre possible le second retournement de l'artère.

Une fois l'artère retournée, le coating de surface luminale s'effectue par immersion de l'artère pendant 24 h à 37 °C sous agitation, dans un volume de 10 mL de MEC-GW décongelée et ré-homogénéisée.

Parallèlement, une suspension cellulaire de hCSM-GW marquées est préparée. Pour l'obtenir, des hCSM-GW P3 sont trypsinées puis misent en suspension à une concentration de 1 000 000 de cellules/mL. Cette dernière est incubée 5 minutes à 37 °C avec 25 µL de 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetraméthylindocarbocyanine Perchlorate (Dil, Invitrogen, D3911) un marqueur membranaire, à 0,1 mg/mL. Les cellules sont ensuite lavées par deux étapes successives de centrifugation à 300 g de 5 minutes puis remises en suspension en milieu α -MEM.

Une fois la période d'incubation avec la MEC-GW terminée, l'artère décellularisée est ensuite coatée puis abondamment rincée en PBS stérile. Elle est ensuite immergée en tube Falcon 50 dans une suspension cellulaire de hCSM-GW marquées au Dil contenant 70 000 cellules par centimètre d'artère. Cette étape d'adhésion cellulaire à la paroi artérielle s'effectue sur la nuit, à 37 °C sous agitation. À la suite de cette étape, le greffon est ensuite placé en flasque T75 pour une période de 8 jours pendant laquelle les cellules prolifèrent jusqu'à recouvrir complètement la surface luminale de l'artère. Pendant cette période, le milieu est renouvelé 3 fois par semaine et l'avancée de la cellularisation est suivie par observation du recouvrement luminal en microscopie à épifluorescence (Leica DMI 3000B).

La veille de l'opération, les deux greffons préparés (dont les surfaces luminales externalisées sont complètement cellularisées) sont retournés une seconde et dernière fois afin de replacer leur surface luminale à leur place d'origine (face interne du vaisseau). Ils sont ensuite pré-conditionnés en bioréacteur par une étape de 6 heures, consistant à le soumettre à des conditions de contraintes de cisaillement laminaire croissantes, pour atteindre une valeur maximale de 20 dyn/cm². Ce bioréacteur consiste en une enceinte thermostatée au sein de laquelle les greffons, baignant dans le milieu de culture α -MEM sont perfusés en parallèle avec le même milieu. Cette perfusion est assurée par un circuit de tuyaux les reliant chacun à un

erlenmeyer contenant du milieu de culture α -MEM complétement et oxygéné au cours des 6 h de conditionnement. Un système capable de piéger de possibles bulles d'air est installé juste avant la chambre de perfusion. La circulation du milieu au sein de ces circuits est mue à l'aide d'une pompe péristaltique.

À la suite de cette étape de conditionnement, les greffons sont replacés en flasque T75 en milieu α -MEM frais et complet, jusqu'au lendemain, où l'un d'eux sera utilisé dans la cadre de l'étude *in vivo*, le deuxième étant prêt en suppléance.

5. La caractérisation du greffon vasculaire

a. Suivi histologique de la paroi vasculaire au cours de la production du greffon

Trois artères ombilicales humaines ont été préparées selon le protocole de fabrication du greffon SMILING précédemment décrits. À chaque étape de cette fabrication, un segment de 5 mm de longueur est prélevé et immergé en solution de PFA 4 % pendant 24 h sous agitation, à 4 °C. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains successifs en solutions d'éthanol de concentration croissantes pour enfin être inclus en paraffine. Des coupes histologiques de 5 μ m d'épaisseur sont récoltées auxquelles est appliquée une coloration HE dont le protocole est précédemment décrit dans la partie : « [Contrôle qualité des artères ombilicales par observation histologique](#) ». Le suivi est ensuite présenté sous la forme d'une planche histologique.

b. Analyse de la thrombogénicité du greffon au cours de sa fabrication

Afin de caractériser au mieux les différentes étapes de fabrication de notre greffon, j'ai mené une étude globale sur la thrombogénicité de celui-ci au cours de sa préparation, cela en collaboration avec l'unité INSERM U1116 : Défaillance cardiovasculaire aiguë et chronique. Durant cette étude, j'ai entrepris de comparer l'artère ombilicale humaine avec l'artère mammaire (gold standard dans le bypass coronaire). Pour des raisons pratiques, les artères mammaires utilisées étaient d'origine porcine et non humaine. J'ai donc comparé ces deux types d'artères en leur appliquant le protocole de fabrication de notre greffon. Pour cela, trois artères mammaires porcines ainsi que quatre artères ombilicales humaines ont été stockées en solution de HBSS à 4 °C avant leur utilisation dans cette étude. Un morceau de chaque artère a été prélevé à chaque étape de production afin d'étudier la thrombogénicité de l'échantillon au cours du processus de fabrication.

La thrombogénicité du greffon au cours de sa production a été étudiée par des analyses de génération de thrombine. Pour cette étude, un morceau de 35 mg de chaque artère a été prélevé aux différentes étapes de fabrication (T0 ; Décellularisation ; Coating ; Cellularisation). Toutes les artères ont été préparées en parallèle et les échantillons récupérés ont été placés directement à 4 °C en milieu de culture α -MEM jusqu'à récupération de l'ensemble des échantillons de l'étude. Les échantillons ont été rincés et placés à plat, en plaque 96 puits afin d'effectuer le test de génération de thrombine.

. L'analyse de génération de thrombine est ensuite effectuée selon le protocole précédemment décrit dans la partie : « [Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW](#) ».

c. Analyse des propriétés mécaniques du greffon au cours de sa fabrication

i. Test de pression à l'éclatement

Afin de permettre la mise en place de l'échantillon artériel ainsi que l'obtention d'une valeur pertinente, la longueur minimale de l'échantillon testé est de 5 cm. Une extrémité de celui-ci est hermétiquement close par la pose d'un clamp chirurgical, tant dis qu'une sonde à gaver est insérée dans la seconde avant de la sceller par de multiples nœuds effectués à l'aide d'un fil chirurgical 4-0 (VICRYL, ETHICON). Une fois l'échantillon mis en place, la sonde à gaver est reliée à un tensiomètre manuel et une pression croissante est appliquée au sein du segment artériel jusqu'à éclatement. La pression maximale applicable à l'aide de notre matériel est de 350 mmHg.

ii. Test d'étirement à la rupture

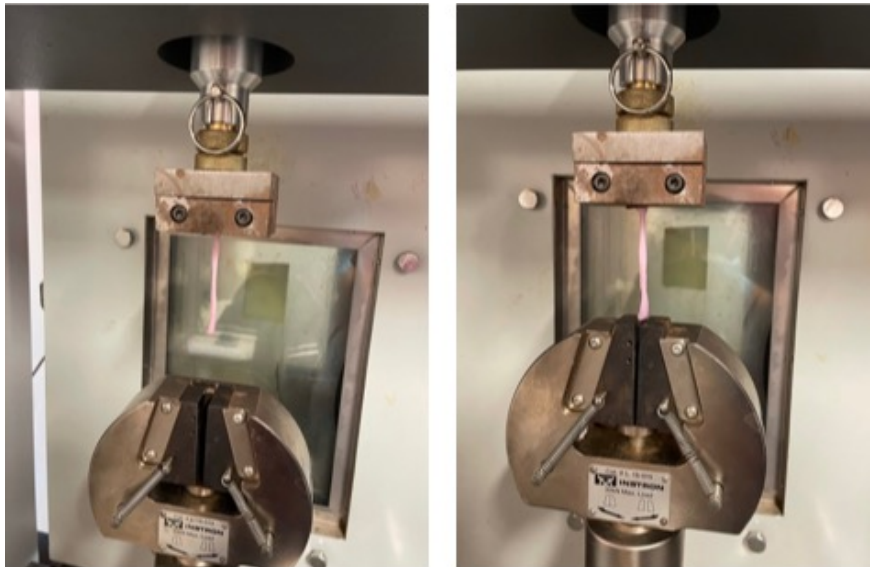


Figure 18. Mise en place des échantillons artériels entre les mors afin de réaliser les expériences d'étirement à la rupture.

Une fois les échantillons préparés, le diamètre de l'artère est mesuré au pied à coulisse. Des segments de 4 à 10 cm de longueur sont coupés, et uns à uns sont insérés entre les mors supérieur et inférieur de l'appareil de traction (MTS Criterion 4/ML). Le grip des mors sur les extrémités de l'échantillon est optimisé par l'ajout de papier ponce et de néoprène. Afin de placer l'échantillon, une extrémité de celui-ci est pincée dans le mors supérieur, le segment est ensuite maintenu à la verticale afin de permettre le pincement de sa seconde extrémité dans le mors inférieur. Une fois l'échantillon mis en place, le mors supérieur est éloigné progressivement jusqu'à tension visuelle de l'échantillon (Figure 18). La longueur utile de l'échantillon est alors mesurée au pied à coulisse. Le test est ensuite démarré et le mors supérieur s'éloigne à une vitesse constante de 50 mm/min. La force (exprimée en Newton (N)) opposée au mouvement, émise par l'échantillon, est alors constamment mesurée à l'aide d'un capteur de force de 50 N, et enregistrée à l'aide du logiciel « Testwork » jusqu'à rupture totale de l'échantillon. Le résultat obtenu se présente sous la forme d'une courbe de la force (N) en fonction du déplacement du mors (en mm).

L'analyse de ces résultats consiste en la conversion de la force en contrainte selon l'aire de la section ; ainsi qu'en la correction de la longueur utile en fonction de la distance parcourue par le mors supérieur avant observation d'un retour de force par

l'échantillon. Sont ainsi déterminés pour chaque échantillon : la déformation longitudinale à la rupture, la contrainte à la rupture (en MPa), ainsi que le module de Young (en MPa). Ce dernier étant le coefficient directeur (pente) de la partie linéaire de la courbe obtenue lors de la représentation de la contrainte en fonction de la déformation à l'élongation.

iii. Test de compression en DMA (Dynamic Mechanical analysis)

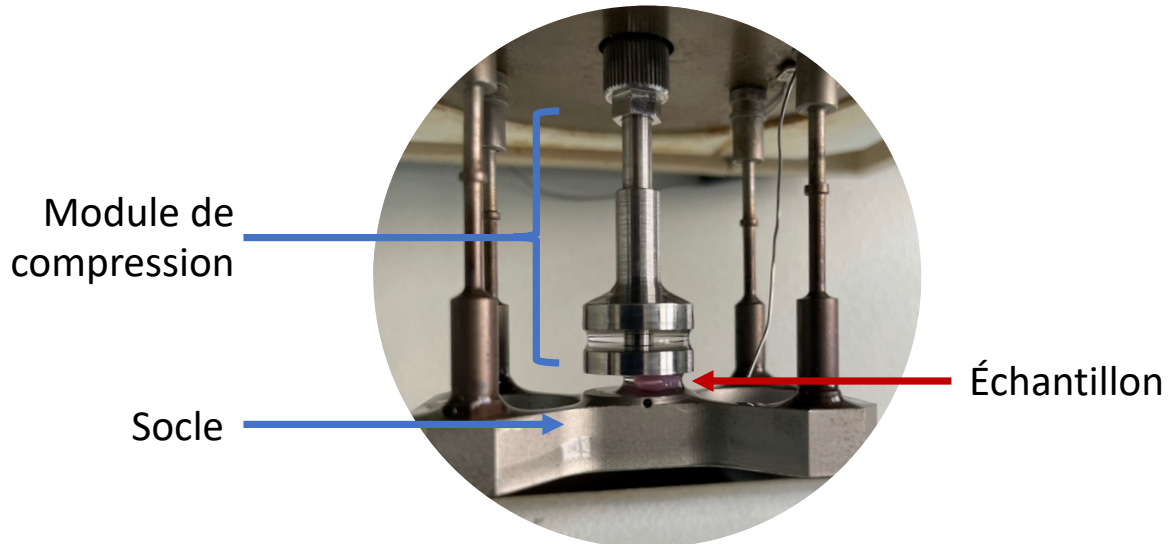


Figure 19. Mise en place des échantillons dans le cadre d'une analyse mécanique dynamique (DMA).

Afin de réaliser les tests de DMA, l'artère est coupée en segments de longueur égale à son diamètre interne, préalablement mesuré au pied à coulisse. Cette opération permet ensuite de considérer l'échantillon comme un parallélépipède une fois comprimé. Ces segments sont ensuite testés uns à uns en les plaçant au centre de la chambre de mesure de l'appareil (DMA 242C. NETZSCH) (Figure 19). L'expérience se faisant en milieu aqueux, un bac de sérum physiologique (0,9 % NaCl) maintenu à une température de 37 °C est mis en place avant chaque début d'expérience. Le comportement mécanique de l'échantillon est ensuite observé à l'aide du logiciel de suivi de DMA, au cours d'essais de compression dynamique d'une amplitude de 240 μm selon les fréquences 1, 5 et 10 Hz. Afin de nous affranchir de la variable géométrique, les différentes conditions sont analysées en fonction du facteur d'amortissement ($\tan \delta$) obtenu.

B. L'évaluation *in vivo* de notre greffon vasculaire

L'évaluation du greffon SMILING s'est effectuée *in vivo* chez le modèle porcin dans le cadre de remplacement artériel. Toute cette étude a été faite en collaboration avec l'École de Chirurgie de Nancy (numéro d'agrément D-57-547-5) ainsi qu'avec le service de « chirurgie cardio-vasculaire et transplantation » du CHRU de Nancy dirigée par le Professeur Pablo Moreira. Les cochons utilisés pour cette étude sont des cochons Landrace, ils proviennent de l'élevage Thiery situé à Crantenoy (54740). Ils sont exclusivement de sexe mâle, pèsent entre 40 et 50 kg au moment de l'implantation et sont hébergés pendant l'intégralité de l'étude à l'animalerie du campus Brabois-Santé (ACBS). L'intégralité du projet a fait l'objet d'une demande de saisine acceptée et référencée selon le numéro 201707031827208.

1. *Les points limites de l'étude*

Afin de limiter les souffrances potentielles de l'animale nous avons établi plusieurs points limites adaptés permettant de limiter la douleur de l'animal tout en ne remettant pas en cause les résultats potentiels de l'étude. Ces points limites sont l'apparition de signes locaux d'infection, ou la constatation d'un changement de comportement de l'animal, signes de souffrances psychologiques intenses que sont la cachexie, les tremblements, la paralysie, la prostration, l'arrêt de prise alimentaire, ainsi qu'une perte de poids supérieure à 20 %. Dès constatation d'un ou plusieurs de ces points limites, la souffrance physique ou psychologique de l'animal est arrêtée par la mise à mort de l'animal. Cela se traduit par une injection en intraveineuse de 4 g d'Exagon® sous anesthésie générale diminuant progressivement la fonction respiratoire de l'animal jusqu'à son arrêt complet, engendrant ainsi un arrêt cardiaque.

2. *La préparation préopératoire*

Afin de transporter les animaux dans les meilleures conditions jusqu'au bloc opératoire ceux-ci sont, au préalable, prémédiqués par injection intramusculaire de kétamine (10-15 mg/kg) et de midazolam (0,1 mg/kg) permettant l'association des effets antalgiques et amnésiantes de la kétamine avec les propriétés hypnotiques, sédatives et anxiolytiques du midazolam. Une fois l'animal placé sur la table d'opération, l'anesthésie est initiée par une injection par voie intraveineuse de propofol 1 % (10 mL), et est ensuite maintenue par voie inhalatoire en utilisant l'agent anesthésique isoflurane. Une fois l'animal placé dans une anesthésie générale il est intubé pour être

ventilé avec un volume courant de 10 mL/kg et branché à un moniteur multiparamétrique permettant le suivi de ses constantes vitales, notamment son rythme cardiaque, le pourcentage de saturation en O₂, la mesure, sa pression artérielle et sa température.

3. Les différents protocoles chirurgicaux effectués

L'étude *in vivo* menée au cours de ma thèse est divisée en trois parties, consistant en trois sites d'implantation différents. En premier lieu, et afin d'obtenir des preuves de concept, les opérations préliminaires ont consisté en des pontages mammo-coronaires permettant de valider la capacité du greffon à perfuser le muscle cardiaque. Une fois cette preuve obtenue, les premières opérations de greffe à long terme ont évalué la capacité du greffon dans le cadre d'un remplacement d'une portion de l'artère fémorale. Enfin nous avons également évalué l'efficacité de notre greffon dans le cadre d'un bypass carotidien.

a. Pontage de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) via l'artère mammaire

Cette opération a pour but de relier l'artère mammaire fonctionnelle à l'IVA par intégrant notre greffon dans la vascularisation de l'animal. Pour cela, l'animal est placé sur la table opératoire en position « décubitus dorsal » et une incision est effectuée au milieu du thorax, permettant ainsi de réaliser une demi-sternotomie allant de l'os xiphoïde jusqu'au manubrium. L'étape suivante consiste en l'ouverture du péricarde laissant ainsi le cœur exposé. Dans un second temps l'artère mammaire de l'animal est localisée, dégagée du tissu environnant, sectionnée, puis clampée dans sa partie distale afin d'établir la première anastomose entre cette artère et notre greffon. La perméabilité du montage est évaluée en retirant le clamp, libérant ainsi le passage du sang au sein du greffon. Le clamp est ensuite replacé afin d'effectuer la seconde anastomose, cette fois-ci avec l'IVA. Celle-ci se situant sur le cœur, un stabilisateur est utilisé afin de limiter les mouvements dus aux battements cardiaques. L'IVA est ensuite incisée afin d'y insérer un shunt de 2,75 mm permettant la réalisation de l'anastomose termino-terminale entre l'IVA et le greffon. Le clamp est ensuite retiré, et après confirmation de la perméabilité du pontage, l'IVA est ligaturée en amont de l'anastomose afin que la perfusion cardiaque ne soit dépendante que du greffon implanté. La validation du pontage est également vérifiée par une coronarographie permettant de confirmer la perméabilité du pontage artériel.

b. Remplacement d'un segment de l'artère fémorale

Afin de réaliser ce pontage, l'animal est placé sur la table opératoire en position décubitus dorsal. Une incision est effectuée sur la partie coxo-fémorale afin d'écartier les tissus recouvrant l'artère fémorale sur une longueur de 15 cm. Une fois l'artère à découvert 100 UI/kg d'héparine sont injectés à l'animal par voie veineuse et deux clamps sont placés de part et d'autre du segment artériel à extraire. Une fois l'extraction effectuée notre greffon est intégré à la circulation sanguine par une anastomose de la partie proximale à l'aide d'un fil 8-0. La qualité de la suture est validée après avoir retiré le clamp proximal et avoir vérifié l'absence de fuite au niveau de l'anastomose ainsi qu'au niveau de la paroi vasculaire du greffon. Le clamp en position proximale est alors remis et l'anastomose distale est réalisée afin de finaliser l'intégration complète du substitut dans le système circulatoire de l'animal. Celle-ci est validée en retirant les clamps précédemment positionnés. Nous pouvons ainsi constater l'étanchéité de la dernière anastomose réalisée ainsi que le passage du sang au sein du greffon. Des validations par échographie Doppler et angiographie sont ensuite réalisées, à la suite desquelles l'animal est ramené à l'ACBS.

c. Remplacement d'un segment de l'artère carotide

Le pontage carotidien est effectué selon protocole précédemment décrits dans le cadre du remplacement d'un segment de l'artère fémorale. Seule la localisation change, ici l'incision se fait au niveau du cou de l'animal afin de dégager et de remplacer un segment de l'artère carotide.

4. Le suivi post-opératoire

A la suite des opérations, l'animal est ramené à l'ACBS et des visites quotidiennes sont effectuées afin de vérifier l'absence de signes de souffrances physiques ou psychologiques. Il est traité quotidiennement par un antidouleur (Buprénorphine) et un anticoagulant (Lovenox) pendant les 10 premiers jours. Un antiagrégant plaquettaire (Kardegic, 75mg) est également donné tous les jours du 1^{er} jour post-opératoire jusqu'à la récupération du greffon suite à la période d'implantation. Cette récupération s'effectue à 2 ou 6 semaines après l'implantation, selon le protocole établi au préalable, et selon les mêmes précautions précédemment décrites, de transport et d'anesthésie de l'animal, au bloc opératoire.

Au cours de la période d'implantation plusieurs tests sont effectués afin de surveiller le comportement du greffon au cours du temps dans la circulation artérielle de l'animale. Des contrôles de perméabilités hebdomadaires sont effectués par échographie Doppler. Un suivi sanguin est également réalisé afin de surveiller notamment des phénomènes d'inflammation au cours de l'étude. Les prélèvements sanguins sont recueillis dans des tubes EDTA, et sont effectués avant et après l'opération, puis de manière hebdomadaire. Ces échantillons sont utilisés afin d'établir des numérations sanguines par analyse à l'aide d'un appareil d'hématologie ABX Micros 60 (HORIBA).

5. Analyses histologiques

Le greffon ainsi que le tissu environnant sont récupérés avant mise à mort de l'animal. Les échantillons sont rincés à l'aide de sérum physiologique et sont directement immergés en solution de PFA 4 % pour une période de 24 h à 4 °C. Une fois la fixation terminée, les échantillons sont inclus en paraffine et coupés selon le protocole décrit précédemment : « [Contrôle qualité des artères ombilicales par observation histologique](#) ».

a. Colorations hématoxyline-éosine (HE) et hématoxyline-éosine-safran

Les lames sont ensuite soumises à plusieurs colorations histologiques : *i*) une coloration HE dont le protocole a été précédemment décrit dans la partie : « [Contrôle qualité des artères ombilicales par observation histologique](#) » ; *ii*) ainsi qu'une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES). Pour cela les coupes sont déparaffinées puis réhydratées par immersion dans des bains d'alcools de degrés décroissants puis dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite mises en solution d'hématoxyline stabilisée (RAL Diagnostics) filtrée, pour une période de 12 minutes, rincées à l'eau distillée puis plongées 1 minute en 400 mL d'éthanol 70 ° dans laquelle a été ajouté 1 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 12 N (1 % HCl en éthanol 70 °). Les coupes sont rincées une nouvelle fois en eau distillée puis placées en eau du robinet pendant 10 minutes. Elles sont ensuite immergées 1 minute dans un bain d'éosine (312820, RAL Diagnostics) filtrée puis rincées en eau distillée. Les lames sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool de degrés croissant et immergées 5 min en solution de Safran (non filtrée) avant une dernière immersion en « Tissue Clear » (Sakura, 1426) permettant le montage des lames.

b. Marquage immunohistologique des macrophages porcins

Afin d'effectuer l'immunomarquage des macrophages porcins les lames sont tout d'abord déparaffinées puis réhydratées par immersion dans des bains d'alcools de degrés décroissants puis dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite soumises à une étape de démasquage des sites antigéniques à l'aide d'un tampon de citrate de sodium de 1 mM produit par dissolution de 2,94 g de sodium de citrate (Sigma, S-4641) dans 1 L d'eau distillée, le pH est ensuite ajusté à pH 6 par ajout de HCl, et 500 µL de Tween™ 20 (ThermoFischer Scientific, 85113) sont ajoutés. Pour effectuer l'étape de démasquage les lames sont placées en tampon de citrate sodium, puis misent à chauffer dans un micro-onde, à 750 Watts pour une période de 10 minutes. Le bac de lame est ensuite laissé à TA 30 minutes afin de permettre une diminution de la température des lames progressives. Les lames sont lavées par des bains de 2 minutes, une fois en eau distillée puis deux fois en solution de PSB 1x concentrée à 0,05 % de Tween™ 20. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par une incubation de 10 minutes en solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (Sigma, H1009) à la suite de quoi les lames sont rincées deux fois en PBS 0,05 % Tween™ 20 puis incubées 20 minutes avec une solution de 2,5 % Normal Horse Serum Blocking (ImmPRESS kit, Vector Lab MP-7500). L'anticorps primaire « Mouse anti pig macrophages Purified » (Bio-rad MCA2317GA, clone : BA4D5, isotype : IgG2b) dilué 250 fois en PBS est ensuite déposé sur chacune des coupes et les lames sont placées en chambre humide, à 4 °C sur la nuit. Le lendemain les lames sont lavées par deux bains de 5 minutes en PBS 0,05 % Tween™ 20, égouttées sur un sopalin, puis incubées avec « ImmPRESS HRP Reagent anti mouse/rabbit IgG (ImmPRESS kit, Vector Lab MP-7500). Enfin, les lames sont lavées par deux bains de 5 minutes en PBS 0,05 % Tween™ 20. Le marquage est ensuite révélé immédiatement par une méthode chromogénique utilisant la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) sur une période d'1 minute, à l'aide du kit « Permanent AEC Kit » (Zytomed, ZUC054-200). Une fois le marquage spécifique obtenu, les lames sont rincées rapidement 3 fois à l'eau distillée et immergées 10 secondes en solution d'hématoxyline stabilisée (RAL Diagnostics) filtrée. Elles sont ensuite abondamment lavées en eau du robinet sur une période de 20 minutes en renouvelant l'eau fréquemment. Les lames sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool de degrés croissant permettant le montage des lames.

Ce marquage est effectué en parallèle de deux conditions « contrôle » dans lesquelles les coupes ne sont pas mises en contact, soit avec l'anticorps primaire, soit avec l'anticorps secondaire.

C. Tests statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide de GraphPad Prism Version 8. Après vérification de la distribution normale des résultats obtenus par le test de Shapiro-Wilk ces données ont été analysées selon le test adéquat :

- Un test t non apparié dans le cas de comparaison de moyenne entre deux groupes.
- Une analyse de variance à une voie (ANOVA) suivie d'un test post hoc de Tukey dans le cas d'une comparaison de moyenne entre plusieurs groupes dans le cas où un seul facteur varie entre eux.
- Une ANOVA à deux voies avec test post hoc de Bonferroni dans le cas d'une comparaison de moyenne entre plusieurs groupes dans le cas plusieurs facteurs varient entre eux.

Les différences entre les groupes avec une valeur de probabilité supérieure à 95 % ($p < 0,05$) ont été considérées comme statistiquement significatives (p-valeur : * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$).

Les résultats peuvent être présentés sous la forme : *i*) moyenne \pm SEM (erreur type) afin de refléter l'analyse statistique effectuée ; ou *ii*) moyenne \pm SD (écart type) afin d'apporter un indicateur descriptif des échantillons analysés.

Résultats

A. Les études *in vitro*

1. Les composants du greffon vasculaire

a. Le scaffold

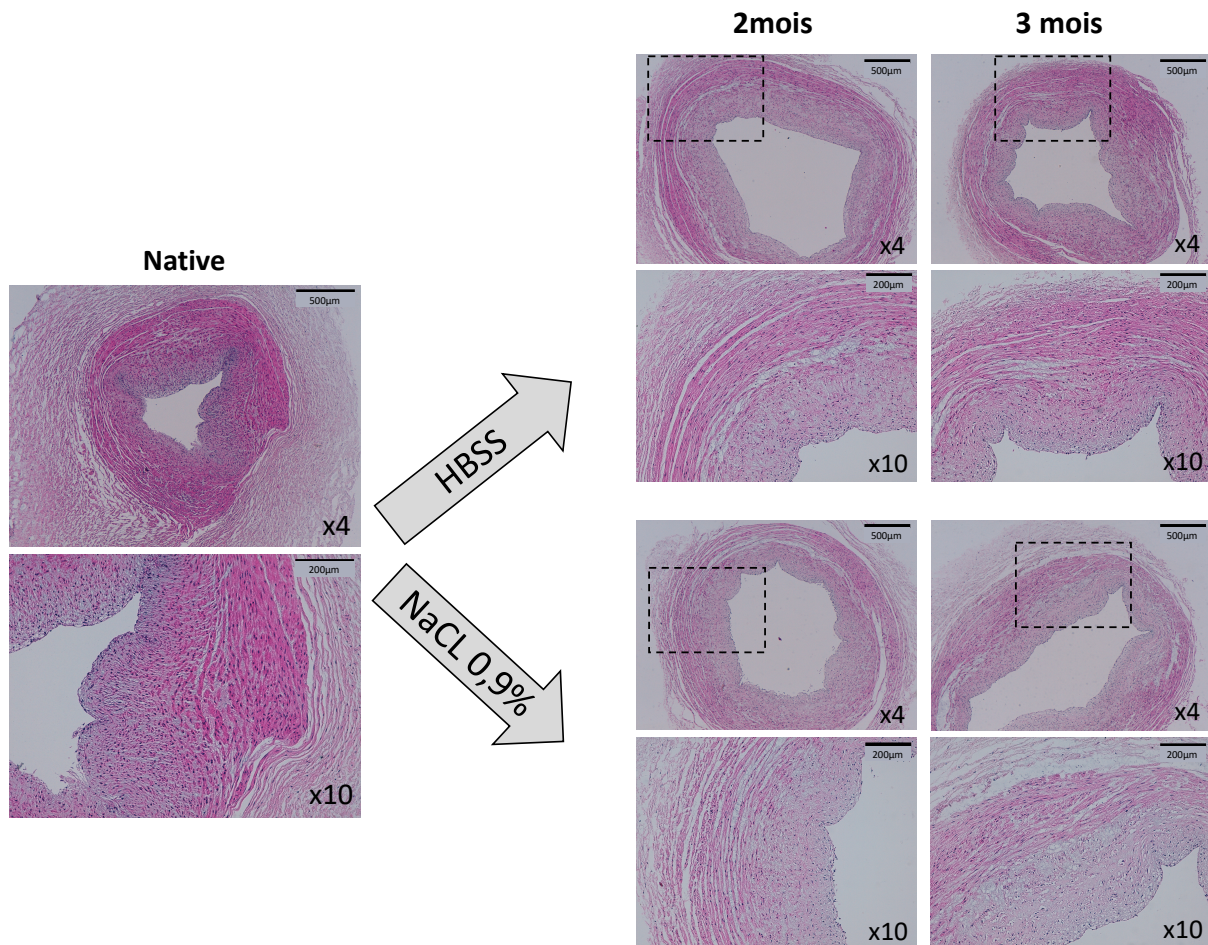


Figure 20. Étude histologique de l'intégrité de la paroi vasculaire au cours du temps selon le milieu de conservation utilisé par coloration hématoxyline-éosine.
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution. n=3

Afin de choisir le milieu le plus adapté pour le stockage des artères ombilicales après récupération, deux milieux retrouvés dans la littérature ont été comparés à l'aide d'une étude histologique du tissu au cours du temps de stockage. Une coloration hématoxyline-éosine a été effectuée afin de comparer l'intégrité de la paroi vasculaire au cours du temps dans les deux milieux de conservation testés : HBSS et NaCl 0,9 % (supplémenté à 2% d'antibiotiques). Pour une même artère, et à temps de

conservation égal, la coloration observée des segments conservés en solution de HBSS montre une coloration à l'éosine plus importante que ceux en NaCl 0,9 %. Dans ce même milieu de conservation, le tissu paraît plus intègre avec moins de lacunes par rapport à la paroi vasculaire conservée en NaCl 0,9 % (Figure 20). Ces observations nous ont mené à choisir le milieu HBSS avec antibiotiques pour la conservation des artères après isolement pour la suite de notre étude.

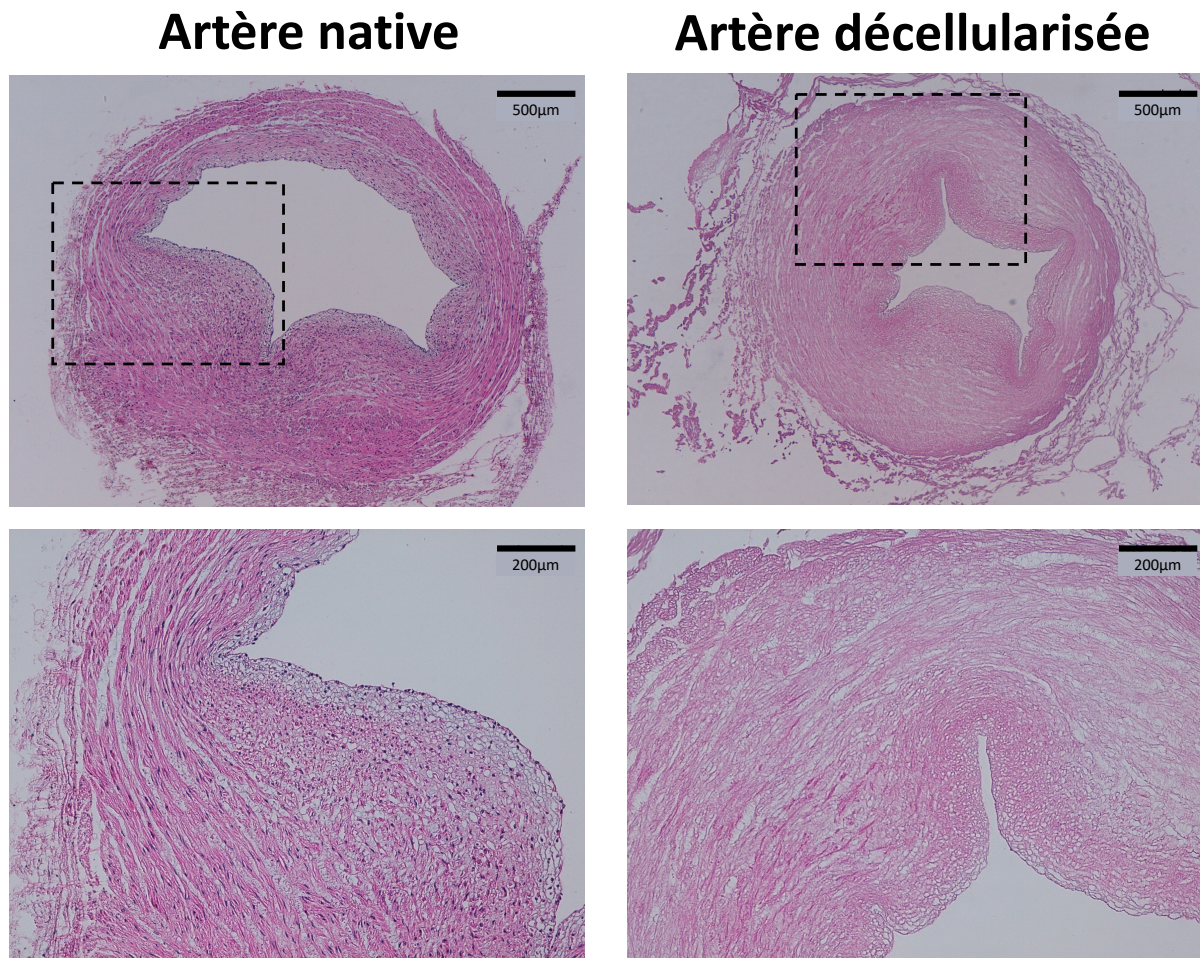


Figure 21. Coloration hématoxyline-éosine sur coupe d'artères ombilicales avant et après application du protocole de décellularisation.
n=3

Une étude histologique par coloration à l'hématoxyline éosine a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité du protocole de décellularisation appliqué lors de la fabrication du greffon vasculaire. J'ai ainsi préparé trois artères ombilicales humaines pour lesquelles des segments avant et après décellularisation ont été préparés et colorés. Nous pouvons observer que, par rapport à l'état natif, l'intima a été complètement

décellularisée à la suite du protocole. De plus, cette décellularisation est complètement efficace au niveau des autres couches de la paroi vasculaire dans lesquelles nous ne retrouvons plus aucun noyau, normalement coloré en violet à la suite d'une coloration à l'hématoxyline (Figure 21). Par cette vérification, le protocole de décellularisation est ainsi validé car permet d'obtenir un scaffold exempt de cellules.

b. La composante cellulaire, caractérisation par cytométrie de flux

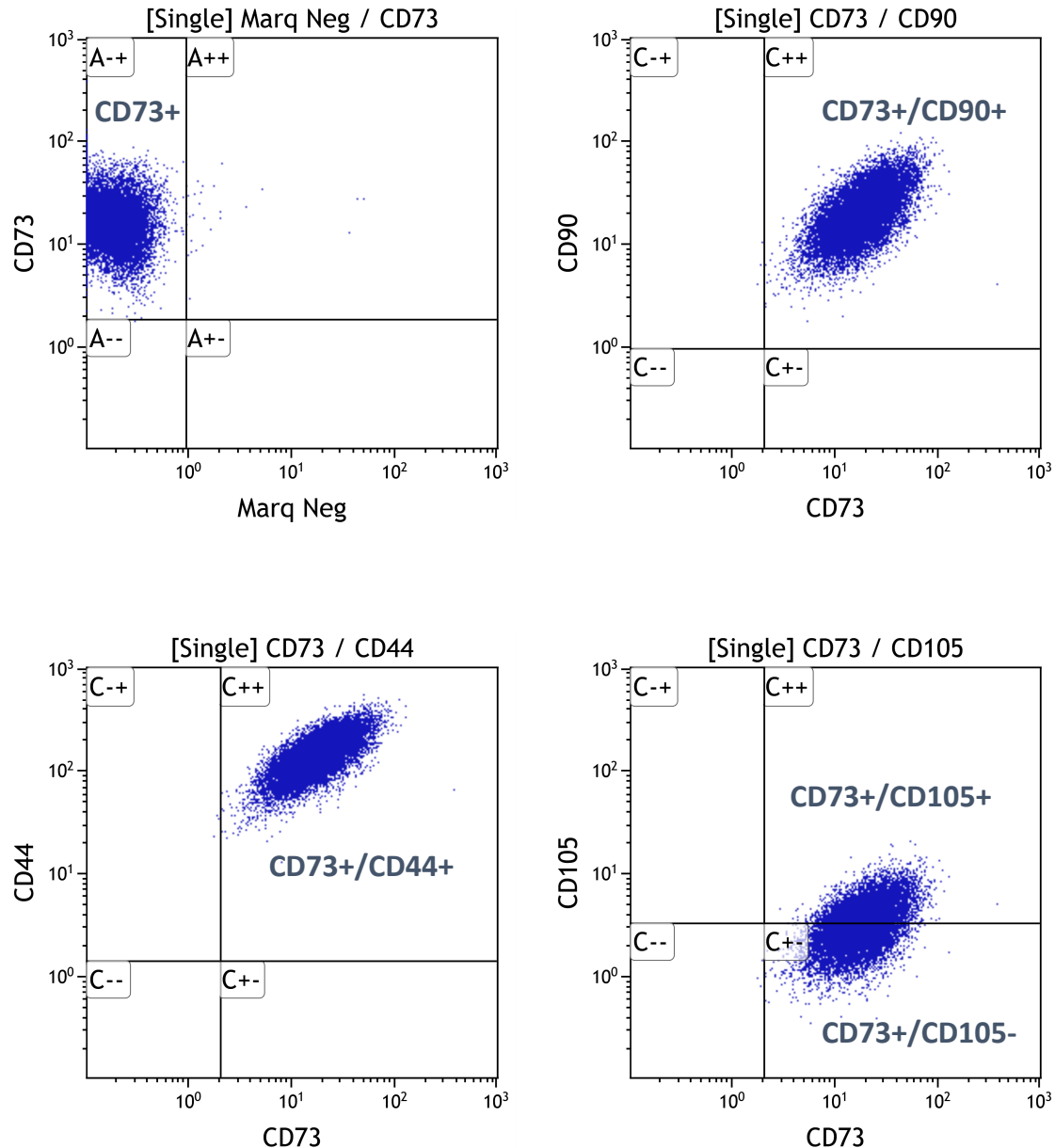


Figure 22. Exemple de la caractérisation des hCSM-GW par cytométrie en flux selon la combinaison de marqueurs spécifiques établit par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire :

À savoir : positives aux marqueurs CD73, CD90, CD44, hétérogènes quant à l'expression de CD105 et strictement négatives pour les marqueurs CD34, CD45, CD86, HLA-DR (Marq Neg).

Toutes les hCSM-GW extraites de cordons ombilicaux sont mises en expansion jusqu'à P3 puis caractérisées par cytométrie en flux suivant l'expression ou non des marqueurs définis par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire(159).

Les hCSM-GW montrent une homogénéité dans l'expression des marqueurs CD73, CD90, CD44. L'expression de CD105 quant à elle permet de distinguer deux sous populations dont une négative et l'autre exprimant faiblement CD105. De plus, ces cellules ne montrent aucune expression pour les marqueurs CD34, CD45, CD86, HLA-DR (Figure 22).

2. La caractérisation de la MEC-GW extraite en acide acétique

a. L'analyse du contenu en acides nucléiques

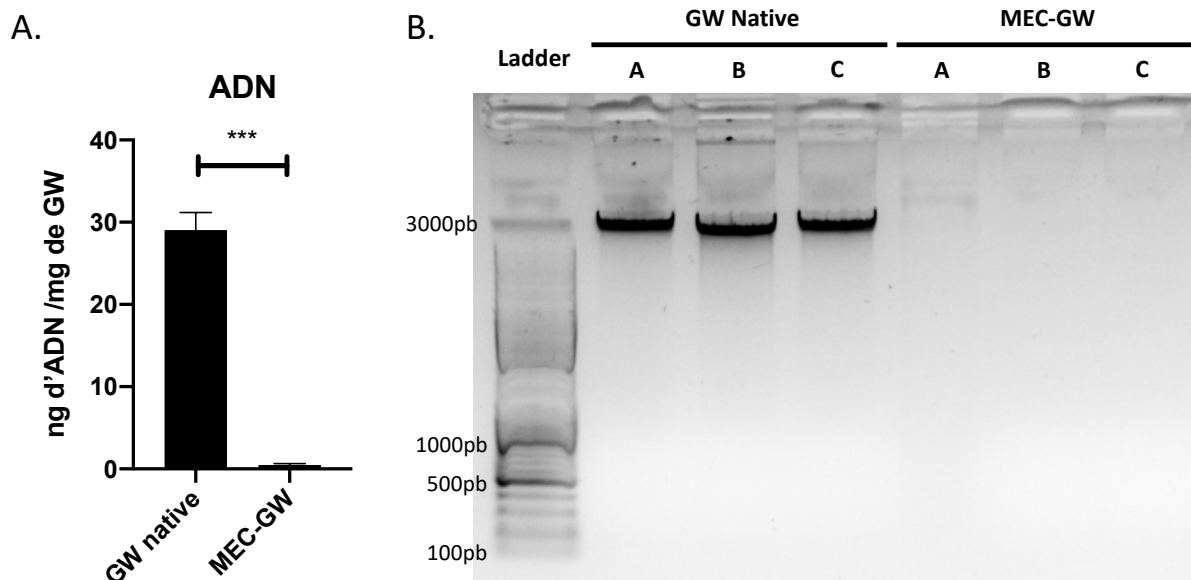


Figure 23. Analyse du contenu en acides nucléiques du tissu natif de la GW en comparaison à celui retrouvé dans MEC-GW après extraction en acide acétique 0,5 M. L'analyse statistique est effectuée selon un t-test. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM (p -value : *** < 0.001). $n=3$

Une étude du contenu en acides nucléiques des différentes MEC-GW a été effectuée pour évaluer l'efficacité du protocole de décellularisation. Les résultats sont mis en perspectives par comparaison de la quantité d'ADN présent dans le tissu avant extraction, puis dans la MEC-GW après extraction en acide acétique 0,5 M (Figure 23). Cette étude permet d'obtenir une quantité moyenne d'ADN présent dans le tissu natif de $29,06 \pm 3,689$ ng/mg de GW. Cette valeur diminue drastiquement dans le produit obtenu après extraction, au sein duquel on retrouve $0,424 \pm 0,3629$ ng

d'ADN/mg de GW (Figure 23A). Ce résultat est confirmé par une électrophorèse sur gel d'agarose montrant des bandes à 3000 paires de bases pour les échantillons de tissu natif tandis qu'aucune bande n'est observable pour les échantillons de MEC-GW (Figure 23B).

b. L'analyse du contenu protéique

i. Analyse protéomique

| Row | Accession | Scores | Protein | MW [kDa] | #Peptides |
|-----|-------------|--------|------------------------------------|----------|-----------|
| 1 | CO1A1_HUMAN | 4696.0 | Collagen alpha-1(I) chain | 138,9 | 87 |
| 2 | CO1A2_HUMAN | 3123.9 | Collagen alpha-2(I) chain | 129,2 | 54 |
| 3 | CO3A1_HUMAN | 2571.3 | Collagen alpha-1(III) chain | 138,5 | 46 |
| 4 | ACTH_HUMAN | 277.9 | Actin, gamma-enteric smooth muscle | 41,8 | 4 |
| 5 | LUM_HUMAN | 212.6 | Lumican | 38,4 | 5 |
| 6 | ACTB_HUMAN | 158.6 | Actin, cytoplasmic 1 | 41,7 | 3 |
| 7 | ALBU_HUMAN | 133.5 | Serum albumin | 69,3 | 4 |
| 8 | IGHG1_HUMAN | 87.9 | Ig gamma-1 chain C region | 36,1 | 3 |
| 9 | CO6A3_HUMAN | 85.4 | Collagen alpha-3(VI) chain | 343,5 | 2 |
| ★10 | DERM_HUMAN | 41.5 | Dermatopontin | 24 | 1 |
| ★11 | TAGL_HUMAN | 40.2 | Transgelin | 22,6 | 1 |
| ★12 | PGS2_HUMAN | 37.8 | Decorin | 39,7 | 1 |

Tableau 3. Analyse en spectrométrie de masse du contenu protéique des MEC-GW du pool établi pour la caractérisation du biomatériau. (Les protéines identifiées via un seul peptide sont annotées d'une étoile) n=3.

Afin d'identifier précisément les différentes protéines extraites de la GW et présentes dans la MEC-GW, 3 échantillons de chacune des MEC-GW d'un pool établi (lot de trois) ont été analysés en spectrométrie de masse. Pour chacun des échantillons, la protéine la plus représentée dans le biomatériau est le collagène avec une prédominance pour le collagène de type I suivi par le collagène de type III. Chacune des 3 MEC est également composée de différents protéoglycanes dont le lumican, la décorine, ainsi que d'autres protéines comme la dermatopontine et la transgeline (Tableau 3). Toutes ces protéines sont retrouvées en différentes proportions selon le lot de MEC-GW ce qui souligne une hétérogénéité inhérente au matériel de base dont sont extraites ces MEC, le cordon ombilical humain.

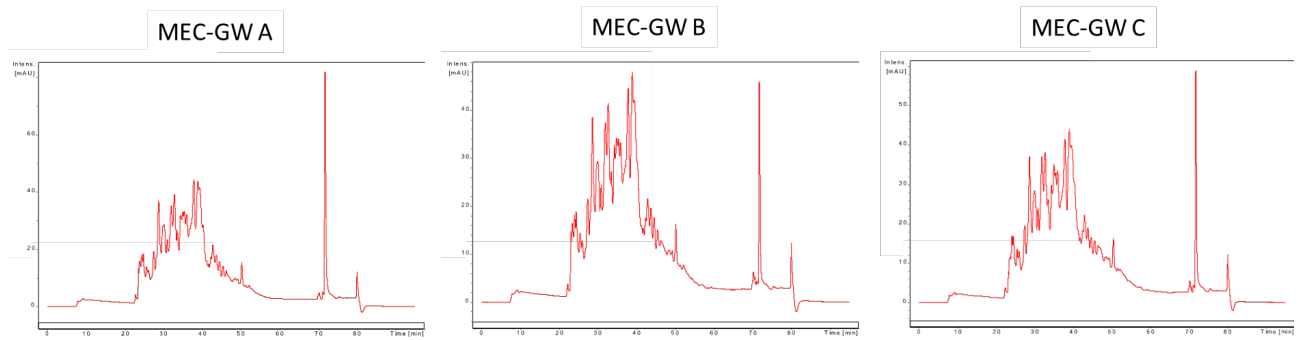


Figure 24. Profils Nano HPLC des différentes MEC-GW composant le pool de caractérisation n=3

L'analyse statistique ne suggère pas de différence significative entre les 3 MEC-GW (ni entre les répliques, si toutes les variables sont considérées). Cependant, l'analyse quantitative met en évidence une protéine dont la proportion varie entre les trois lots, c'est le cas de l'albumine sérique. La comparaison des profils Nano HPLC des différentes MEC du pool permet d'observer que, bien qu'ils soient différents en termes d'intensité, les trois profils montrent une certaine homogénéité quant à leur contenu. (Figure 24).

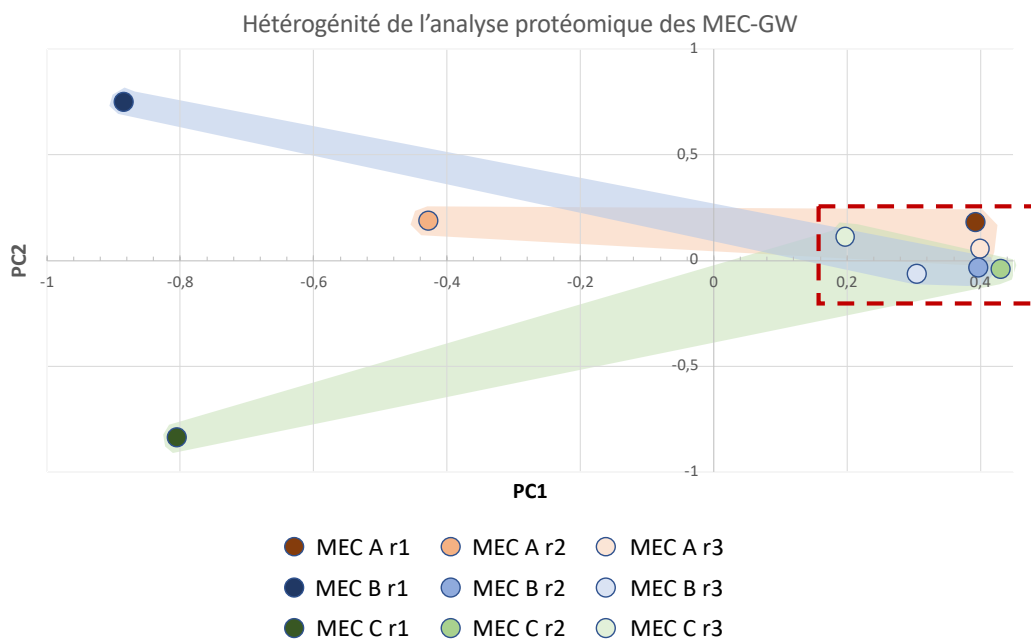


Figure 25. Analyse en composantes principales selon deux axes reflétant les différences entre les différents répliques des chacune de MEC-GW.

Les trois répliques effectués sur la MEC A sont en nuance orange, ceux de la MEC B en nuance bleue et les répliques de la MEC C en nuance verte. La zone colorée souligne l'hétérogénéité des résultats obtenus pour chacune des MEC GW (MEC A en orange, MEC B en bleu et MEC C en vert), le carré rouge souligne l'homogénéité de 2 répliques par échantillon entre les 3 MEC-GW. n=3

Une analyse en composantes principales comparant les différents réplicats obtenus par analyse protéomique a été effectuée (Figure 25). Celle-ci permet de représenter en deux dimensions les différents résultats obtenus et de les positionner en fonction des deux paramètres les différenciant le plus. Cette représentation permet d'une part d'observer une hétérogénéité entre les différents échantillons de MEC-GW testés, et d'autre part entre les réplicats d'une même MEC-GW. Il est à noter la proximité de deux réplicats sur trois pour chacune des MEC-GW, tous les six situés dans une zone relativement restreinte.

ii. Quantification de différentes protéines d'intérêt

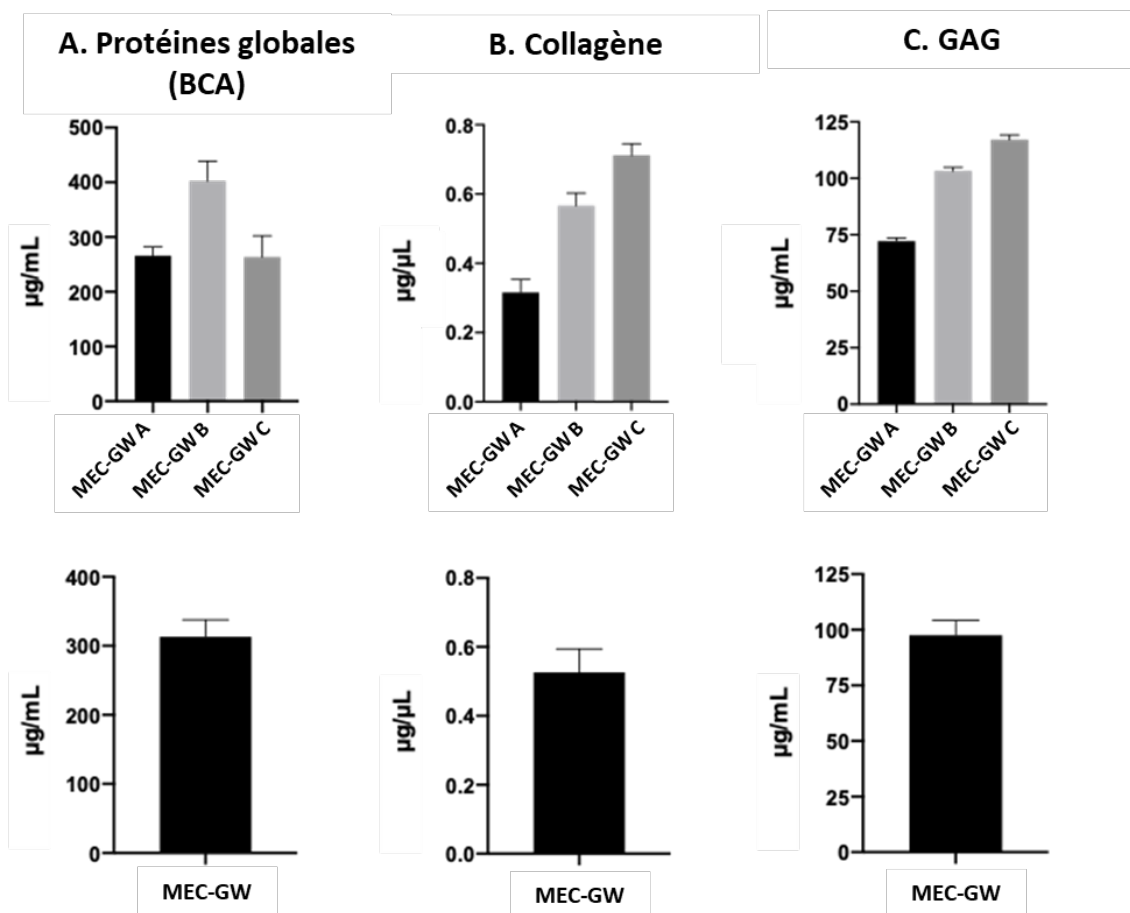


Figure 26. Analyses quantitatives de la MEC-GW, selon les différentes MEC-GW composant le pool (en haut), puis graphique représentant les résultats globaux (en bas).

(A) Quantité de protéines globales pour chacune des MEC du pool puis combinées. (B) Quantité de collagène pour chacune des MEC du pool puis combinées. (C) Quantité de GAG pour chacune des MEC du pool puis combinées. n=3

Afin de caractériser au mieux le contenu protéique de notre lot de 3 MEC-GW, leur analyse a été réalisée en trois étapes. La première expérience consistant en un dosage BCA permettant de déterminer le contenu global en protéines. Ce dosage,

bien qu'efficace, ne permet pas d'évaluer convenablement la quantité de collagène présent au sein de l'échantillon (explication dans la partie Matériels et Méthodes : « [Dosage des protéines totales : le dosage BCA](#) »). Ainsi, après analyse, les 3 lots de MEC-GW contiennent en moyenne 309,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A : 260,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B : 402,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C : 264,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de protéines hors collagène (Figure 26A).

La deuxième étape de caractérisation protéique de ces matrices consiste en la détermination de la quantité de collagène présent au sein de chacun des échantillons. Pour cela, le kit spécifique utilisé permet de quantifier la quantité de collagène soluble par l'intermédiaire de l'hydroxyproline, acide aminé retrouvé en grande proportion dans le collagène (188). Le dosage du collagène soluble effectué nous permet d'obtenir des valeurs moyennes de concentration en collagène pour nos 3 matrices de 0,592 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (A : 0,316 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; B : 0,749 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; C : 0,712 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figure 26B).

Enfin, la troisième expérience permet la détermination de la concentration en glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés de chacun de nos échantillons de MEC-GW (190). Cette analyse, se basant sur la liaison spécifique entre le DMB et les GAG sulfatés, permet de confirmer leur présence à une concentration de 97,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en moyenne avec pour chacune des différentes matrices respectivement 72,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 103,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 117,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 26C).

c. Le dépôt de la MEC-GW

Observation indirecte par fluorescence

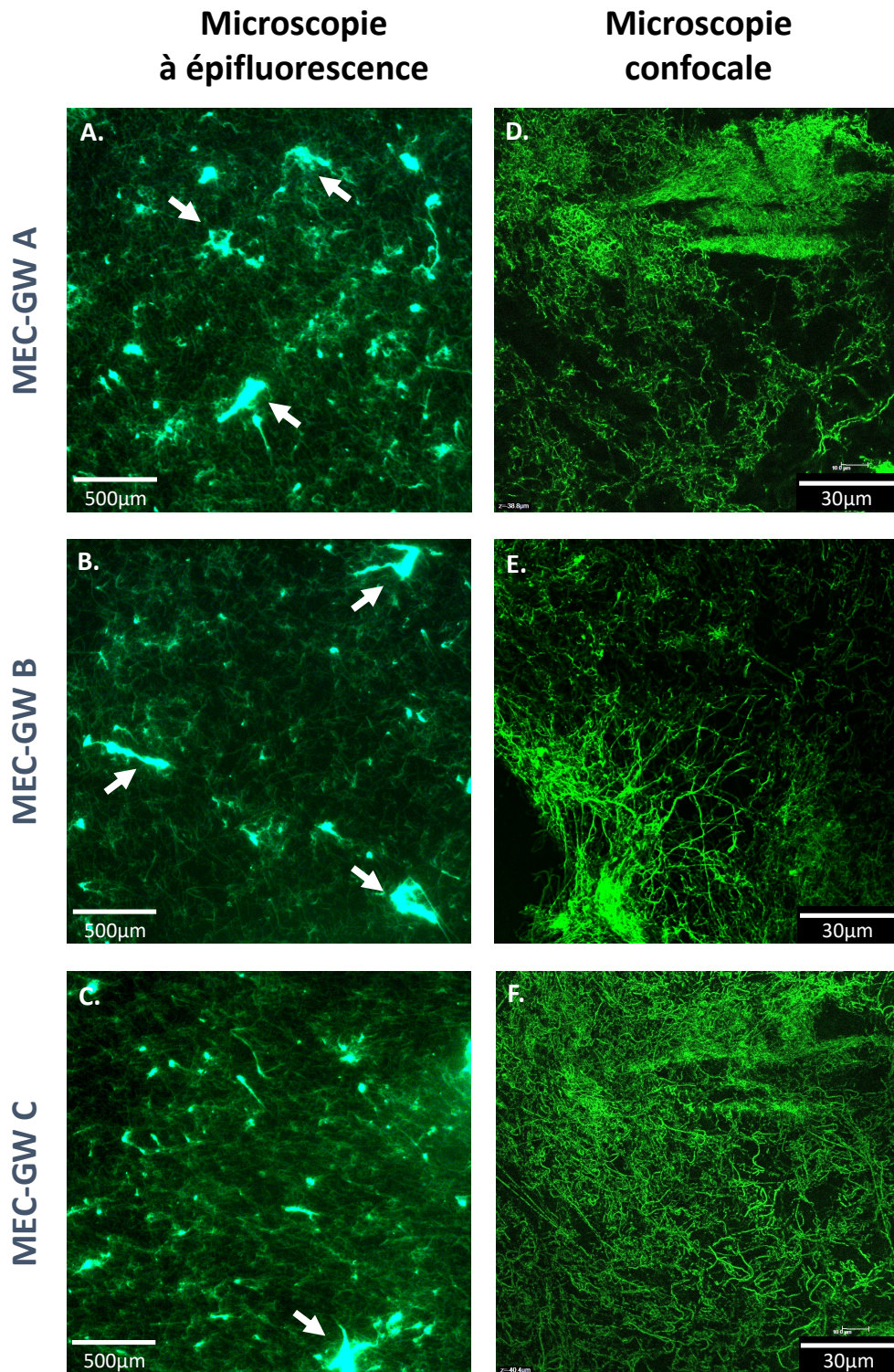


Figure 27. Observations en microscopie à fluorescence du dépôt obtenu avec la MEC-GW. (A, B, C) Images en microscopie à épifluorescence du dépôt des MEC-GW A, B et C respectivement. Les agrégats sont indiqués par des flèches blanches. (D, E, F) Observations en microscopie confocale du dépôt des MEC-GW A, B et C respectivement.

La biotinylation des amines présentes au sein des MEC-GW a permis le marquage fluorescent du dépôt protéique via l'ajout d'un fluorochrome AF488 lié à une streptavidine. Le dépôt des différentes MEC-GW a été tout d'abord observé en microscopie à épifluorescence 24 h après dépôt en plaque de culture 24 puits (Figure 27A, B, C). Parallèlement, ces dépôts ont également été effectués sur lames de verre, permettant leur observation en microscopie confocale et ainsi l'obtention d'images d'une meilleure résolution (Figure 27D, E, F). Ainsi, le coating obtenu pour les différents pools de MEC-GW se présente sous la même forme. En effet, pour les trois matrices, le dépôt est visualisé sous la forme d'un réseau dense de fibres au sein duquel sont présents de manière éparse des agrégats (indiqués par des flèches blanches, Figure 27A, B, C). Bien qu'homogène sur la forme, ces dépôts peuvent montrer des différences en termes de densité. Nous pouvons ainsi noter une densité supérieure de ce réseau dans le cas de la MEC-GW C en comparaison aux deux autres MEC-GW. Ce résultat peut être mis en résonance avec le précédent indiquant que cette MEC-GW C contient la plus grande concentration en collagène.

Observation directe par AFM

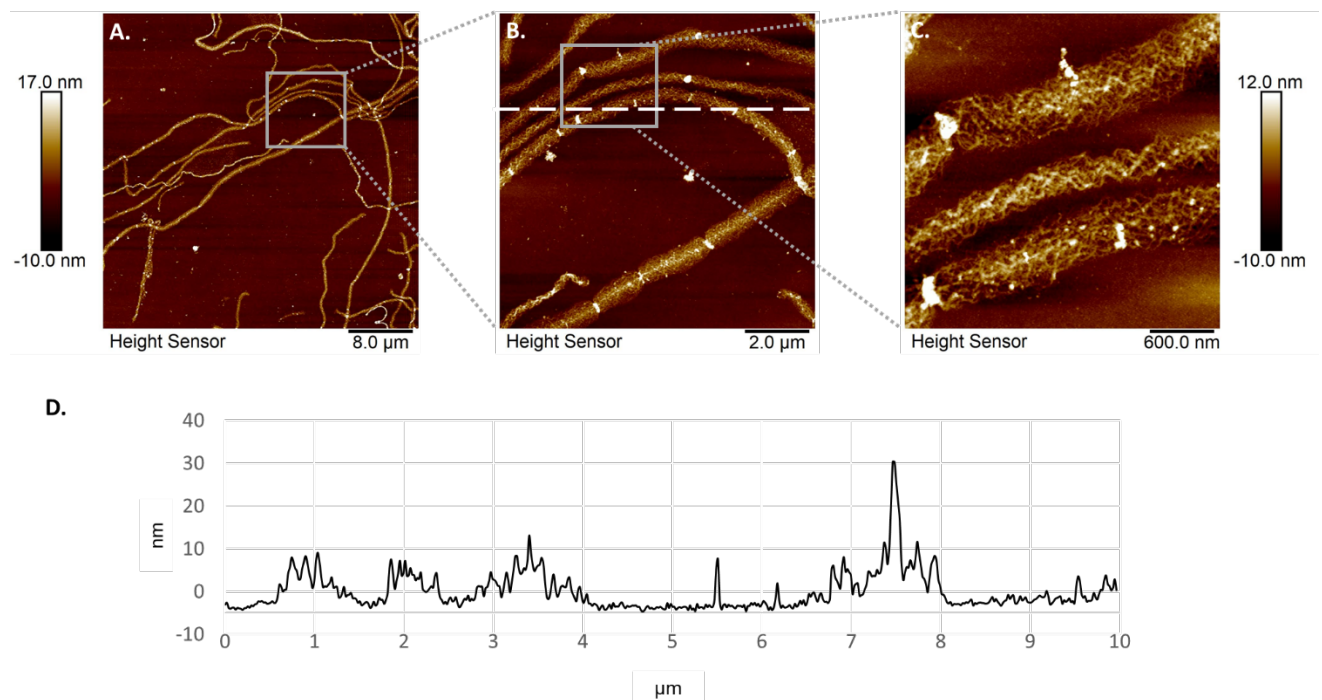


Figure 28. Analyse en microscopie à force atomique du dépôt de la MEC-GW sur lamelle de verre traitée.

(A, B, C) Observation d'une zone à une grossissement croissant. (D) Analyse topographique suivant la ligne en pointillés tracée sur l'image B.

Après observation du coating de nos MEC-GW par fluorescence, montrant qu'elles se déposent sous la forme d'un réseau de fibres disposées de façon aléatoire, nous avons entrepris d'observer plus spécifiquement la structure des fibres déposées. Pour cela, des expériences de dépôts sur lame de verre permettant l'analyse de ce dépôt par AFM ont été effectuées.

Ces analyses permettent d'abord d'observer que les fibres, bien que déposées aléatoirement sur la surface, présentent une structure leur étant caractéristique. Ces fibres ont une épaisseur d'environ 20 nm, une largeur de 1 μm et présentent des aspérités pouvant aller jusqu'à 40 nm (Figure 28D). Analysées à plus haute résolution, nous pouvons observer la structure interne de ces fibres. Elles semblent être la résultante de l'assemblage de plusieurs fibres plus petites entrelacées de manière hélicoïdale (Figure 28C).

d. Cytocompatibilité

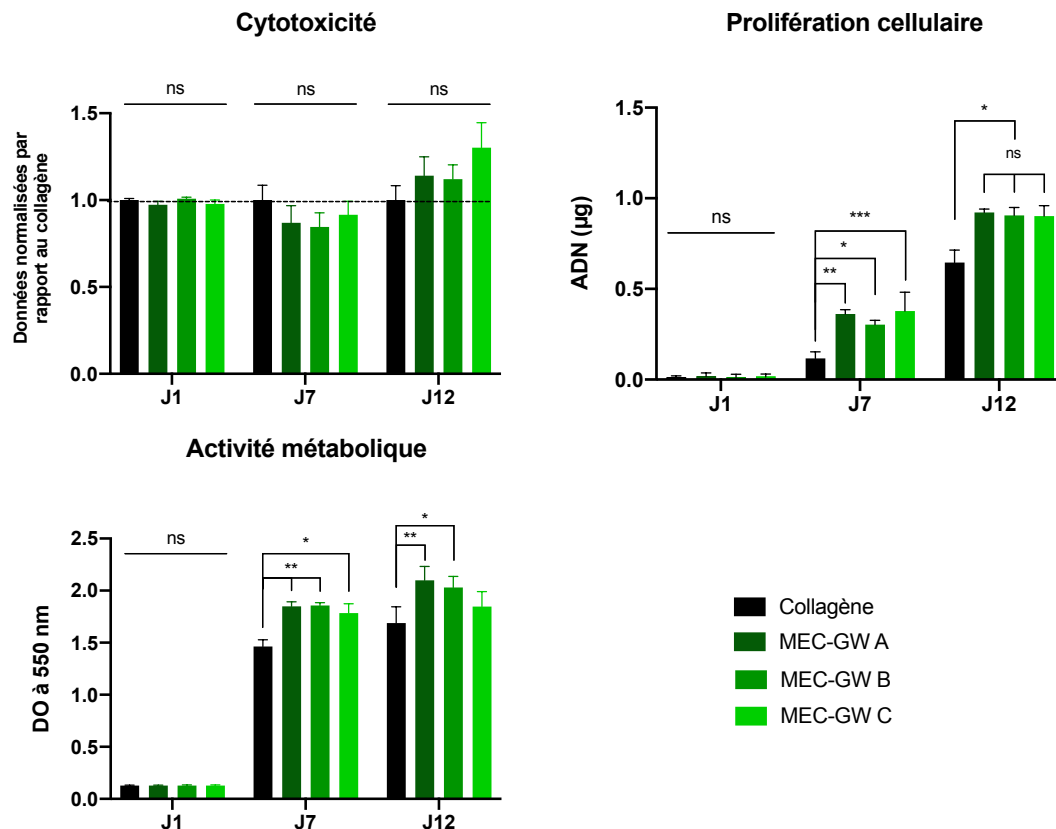


Figure 29. Étude de la cytocompatibilité du coating de la MEC-GW extraite en acide acétique sur une période de 12 jours de culture.

(A) Évaluation de la survie cellulaire par test LDH. (B) Évaluation de l'activité métabolique des hCSM-GW par test MTT. (C) Évaluation de la prolifération cellulaire par dosage de Hoechst. L'analyse statistique est effectuée selon un test ANOVA à 2 facteurs. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM (p -value : * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001). $n=3$

Afin d'examiner la cytocompatibilité de notre coating de MEC-GW, sa cytotoxicité, l'activité mitochondriale des CSM-GW humaines et leur prolifération, ont été analysées sur une période de culture de 12 jours pour les 3 lots de MEC-GW utilisés dans la caractérisation du biomatériau. Les résultats obtenus ont été comparés à une condition de coating contrôle consistant en un revêtement de collagène à une concentration de 0,1 mg/mL, valeur fréquemment utilisée afin d'obtenir un support pour l'adhésion et la prolifération cellulaire.

Pour évaluer la cytotoxicité potentielle de la MEC-GW utilisée en tant que coating, des tests LDH ont été réalisés sur des CSM-GW à 1, 7 et 12 jours de culture (Figure 29A). Pour chaque jour, les résultats cytotoxiques ont été analysés et normalisés par rapport à ceux obtenus dans la condition contrôle. Pour le jour 1 et le jour 7, les résultats normalisés obtenus pour les conditions MEC-GW sont respectivement de A : $0,973 \pm 0,021$; B : $1,008 \pm 0,01$; C : $0,978 \pm 0,023$; et A : $0,870 \pm 0,099$; B : $0,846 \pm 0,081$; C : $0,916 \pm 0,076$. À J12, les résultats cytotoxiques pour les cellulesensemencées sur le revêtement de MEC-GW ont montré une tendance à l'augmentation par rapport à ceux obtenus dans la condition de contrôle avec, pour les différentes MEC A, B et C respectivement, $1,141 \pm 0,10$; $1,121 \pm 0,082$ et $1,302 \pm 0,145$. Pour chaque jour, des analyses statistiques ANOVA à deux voies ont été effectuées sur les pourcentages standardisés et non standardisés. Celles-ci n'ont montré aucune différence significative entre la libération de LDH par les cellulesensemencées sur chaque MEC-GW par rapport à cellesensemencées sur le collagène de culture ; aucune différence n'a également été relevée entre les cellulesensemencées sur les différentes MEC-GW.

Pour chaque condition, un test MTT a été réalisé pour évaluer l'activité métabolique des cellules en fonction du revêtement appliqué. Pour chaque jour de l'expérience, l'absorbance à 550 nm obtenue est comparée à celle retrouvée en condition contrôle et ces valeurs sont statistiquement analysées en suivant une analyse ANOVA à deux voies (Figure 29B). À J1, aucune différence significative n'a été trouvée entre chacune des conditions. En considérant la période de culture, à J7, les DO enregistrées pour chacune des conditions MEC-GW A, B, C ainsi que pour le collagène sont respectivement de $1,850 \pm 0,044$; $1,857 \pm 0,028$; $1,784 \pm 0,090$; et $1,464 \pm 0,064$. Ces valeurs permettent de détecter une activité métabolique significativement plus élevée pour les cellules déposées sur les différentes MEC par rapport à celles

déposées sur du collagène (valeurs p : 0,0092 pour MEC-GW A, 0,0077 pour MEC-GW B et 0,0433 pour MEC-GW C). Au jour 12, aucune différence significative n'a été trouvée entre la condition MEC-GW C et la condition témoin avec des DO respectives de $1,846 \pm 0,145$ et $1,688 \pm 0,157$ (valeur P de 0,5779). Cependant, des différences significatives avec la condition collagène sont notées pour les conditions MEC-GW A et MEC-GW B pour lesquelles des DO de respectivement $2,099 \pm 0,133$ et $2,031 \pm 0,106$ sont observées. En termes de prolifération cellulaire, des différences significatives peuvent être observées au jour 7 et au jour 12 (Figure 29C). En effet, à J7, les CSM-GW déposées sur les MEC-GW A, B et C montrent une prolifération significativement accrue par rapport à celles déposées sur le collagène (respectivement $0,362 \pm 0,024 \mu\text{g}$ et $0,378 \pm 0,104 \mu\text{g}$ contre $0,117 \pm 0,036 \mu\text{g}$ d'ADN à J7). À J12, les résultats sont également homogènes pour les 3 lots de matrice et indiquent que les CSMensemencées sur la MEC-GW ont une prolifération significativement meilleure que celles déposées sur le collagène de culture (A : $0,922 \pm 0,02 \mu\text{g}$; B : $0,905 \pm 0,044 \mu\text{g}$; C : $0,902 \pm 0,057 \mu\text{g}$; Collagène : $0,645 \pm 0,069 \mu\text{g}$ d'ADN à J12).

e. Évaluation de la thrombogénicité de la MEC-GW

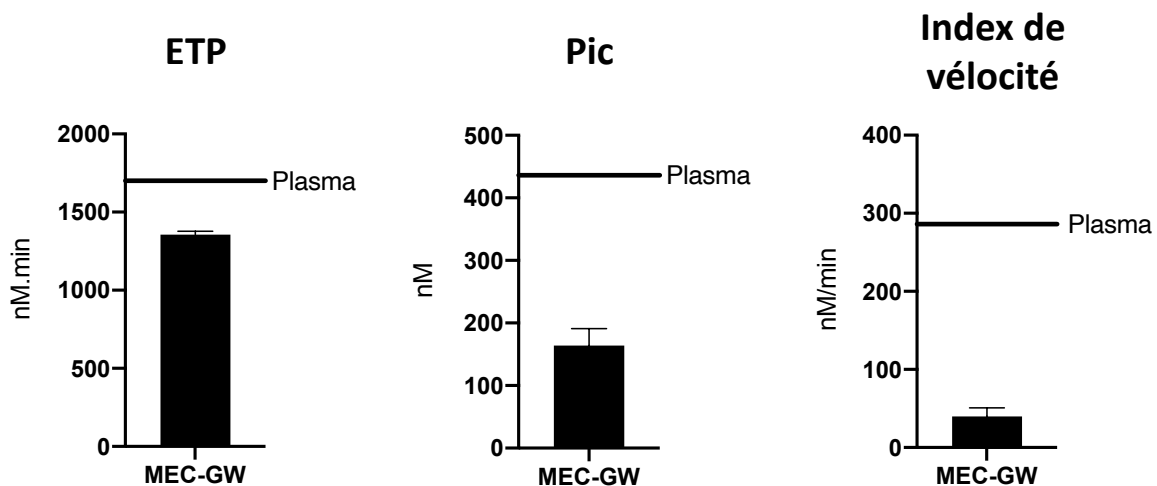


Figure 30. Thrombogénicité du coating de la MEC-GW.

ETP : Potentiel de Thrombine Endogène, reflet du potentiel thrombogénique de l'échantillon. Pic : Valeur maximale de thrombine active générée avec l'échantillon. Index de vélocité : reflétant la pente de la génération explosive de thrombine. Résultats présentés sous la forme de la moyenne \pm SD. $n=12$

Afin d'évaluer le potentiel thrombogénique de nos MEC-GW, différents lots de MEC ont été utilisés pour coater des puits en plaque 96 puits afin de soumettre les dépôts

obtenus à des tests de génération de thrombine en collaboration avec Mme. Véronique REGNAULT (DCAC, Université de Lorraine). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans une condition où seul le plasma utilisé pour l'expérience a été testé (Figure 30). Ainsi les valeurs d'ETP, de valeur maximale du pic ainsi que de l'index de vélocité observées pour le plasma de référence sont respectivement de : 1707 nM.min ; 436,45 nM et 286,51 nM/min. Pour le coating de MEC-GW, les caractéristiques thrombogéniques observées révèlent un ETP de $1355,833 \pm 73,734$ nM.min ; une valeur maximale de pic à $164,013 \pm 27,121$ nM ; et un index de vélocité de $39,923 \pm 10,897$ nM/min (Figure 30).

f. Étude de l'effet de l'application du coating de MEC-GW sur la surface luminale du greffon

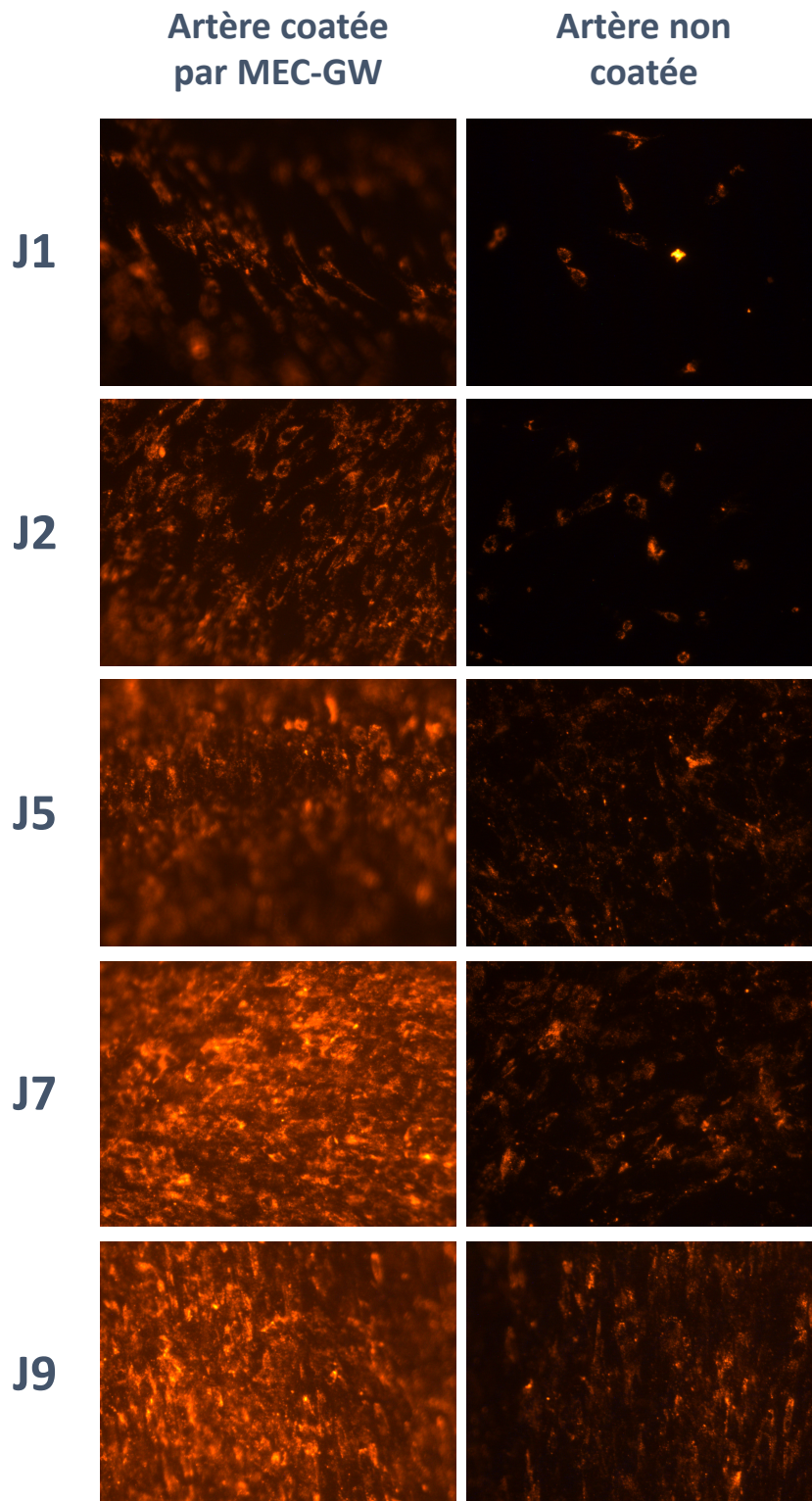


Figure 31. Suivi optique de la prolifération cellulaire à la surface luminale d'artère ombilicale humaine selon la présence ou non d'un coating de MEC-GW.
n=3

Afin d'observer l'effet de notre coating de MEC-GW, trois artères ombilicales d'une longueur de 20 cm ont été décellularisées, retournées puis coupées en deux segments de même longueur. L'un des deux segments a été coaté par immersion en solution de MEC-GW tandis que l'autre a été placé en attente en milieu α -MEM complet. Une fois l'étape de coating terminée, les 6 segments d'artères ont été cellularisés avec des CSM préalablement marquées au Dil selon le protocole de fabrication du greffon. L'évolution du recouvrement de la surface luminale par les cellules a été suivi sur les différents échantillons par observation du marqueur fluorescent Dil en microscopie à épifluorescence au cours d'une période de culture en milieu α -MEM complet (Figure 31).

Cette expérience a permis d'observer, pour une même densité d'ensemencement au départ, et pour une même artère, une augmentation du nombre de cellules ayant adhéré à la surface luminale (J1). Le suivi au cours de la période de prolifération cellulaire permet d'observer un recouvrement de la surface luminale plus important dans la condition coatée en comparaison aux segments artériels non coatés. A la fin de l'étude, après 9 jours de culture, le recouvrement total de la surface luminale n'est observable que pour les segments artériels ayant été coatés avec de la MEC-GW.

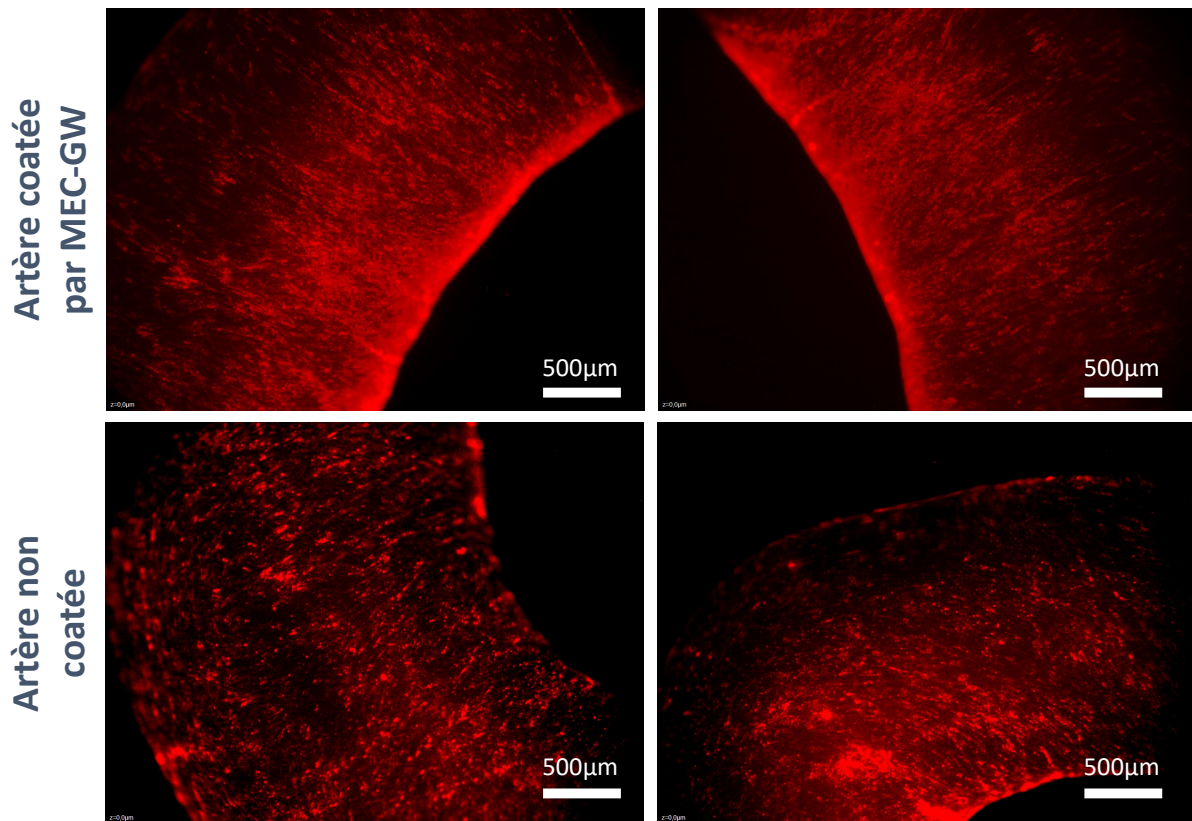


Figure 32. Observation en macroscopie à fluorescence, à J7 du recouvrement luminal d'artères ombilicales humaines selon l'application préalable ou non d'un coating de MEC-GW.

Pour permettre une visualisation plus globale du recouvrement luminal, les échantillons ont également été observés par macroscopie à fluorescence au cours de la période d'expansion cellulaire (Figure 32). Ces images en macroscopie prises à J7 mettent en exergue le recouvrement plus important par les CSM-GW de la surface luminale de l'artère ombilicale dans le cas où une étape de coating à l'aide de notre MEC-GW a été appliquée préalablement à la cellularisation.

3. La fonctionnalisation de la MEC-GW

Dans le but d'ajouter différentes propriétés à la MEC-GW, deux approches de fonctionnalisation ont été étudiées, l'une consistant en l'ajout d'une composante anticoagulante par intégration d'héparine, et l'autre visant à apporter une propriété immunorégulatrice par intégration du sécrétome d'hCSM-GW.

a. Ajout d'une composante anticoagulante pour le contexte vasculaire

i. Validation du dépôt des MEC-GW héparinées

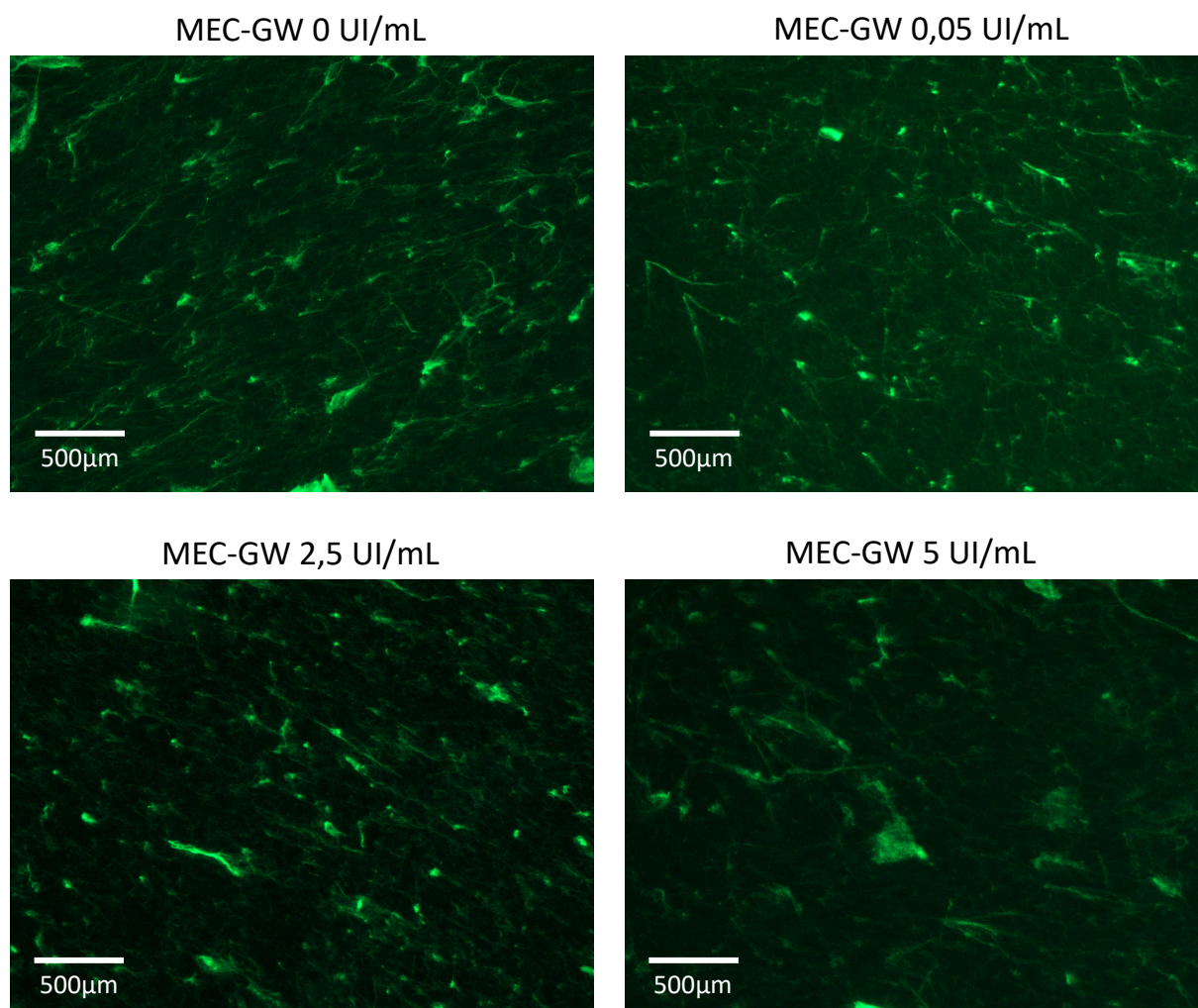


Figure 33. Observations au microscope à épifluorescence du dépôt obtenu selon le dosage d'héparine (0 ; 0,05 ; 2,5 ; et 5 UI/mL) appliqué à la MEC-GW. $n=3$

Dans le but de conférer une composante anticoagulante supplémentaire à notre MEC-GW, j'ai mené une étude d'incorporation d'héparine au sein de cette matrice. La première étape de cette étude consistait en l'observation et la validation du dépôt obtenu après ajout de l'héparine. Pour cela, plusieurs doses d'héparine sodique ont été testées selon les concentrations finales suivantes : 0,05 UI/mL ; 2,5 UI/mL et 5 UI/mL. Il est à noter que dans la condition de concentration 5 UI/mL, des précipités visibles sont apparus au sein de la matrice fonctionnalisée.

Après incorporation de l'héparine aux différentes concentrations citées, et biotinylation des amines de la MEC-GW, les différents échantillons ont été déposés en plaque 24

puits et le dépôt a été observé par microscopie à épifluorescence (Figure 33). Dans les conditions 0 UI/mL ; 0,05 UI/mL et 2,5 UI/mL, le dépôt observé se présente sous la même forme que décrit précédemment. En effet, on peut distinguer un réseau de fibres déposées au fond du puit avec la présence de quelques agrégats éparses. Cependant, dans le cas de la MEC-GW fonctionnalisée à une concentration de 5 UI/mL le dépôt semble altéré. En effet, on note la présence d'agrégats de plus grosse envergure, et en plus grand nombre. A cela s'ajoute l'absence d'une forte intensité du marquage fluorescent rendant moins évidente la présence du réseau de fibres caractérisant le dépôt de la MEC-GW native.

ii. Cytocompatibilité du coating de la MEC-GW héparinée

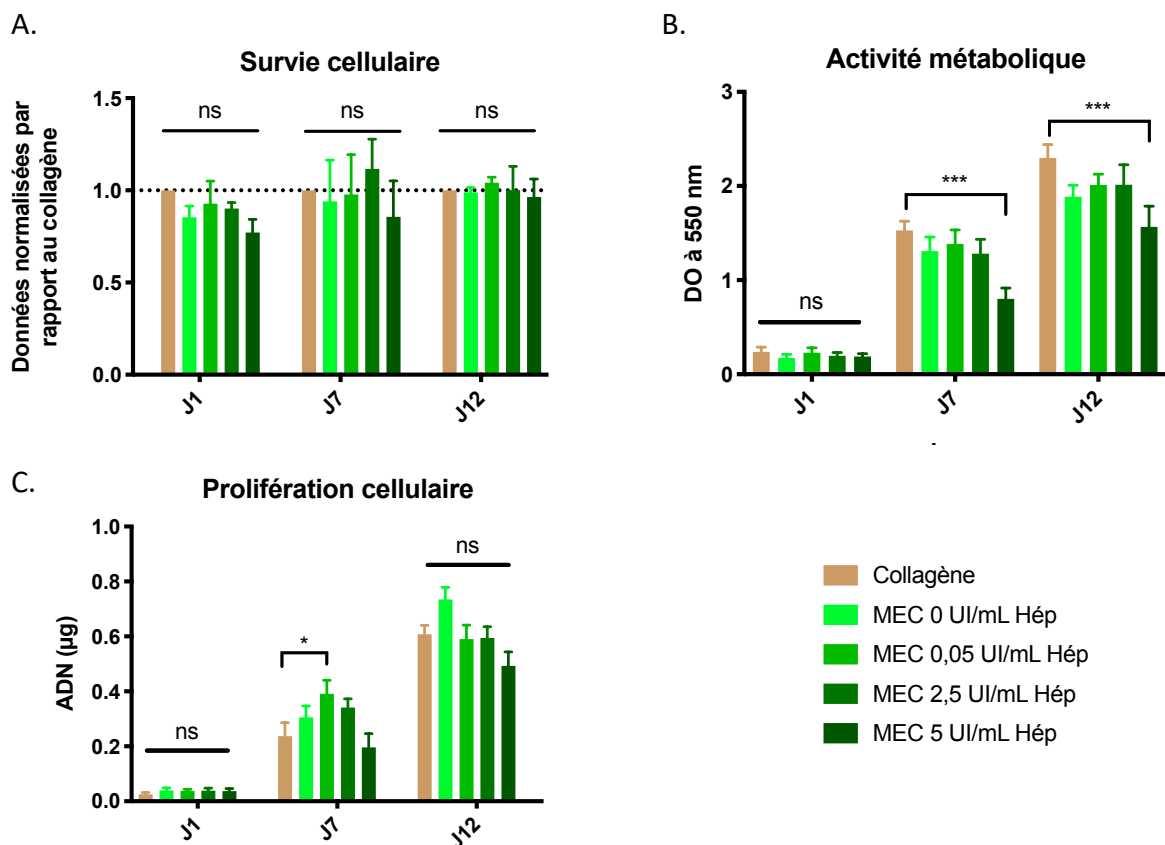


Figure 34. Étude de la cytocompatibilité du dépôt de MEC-GW à différentes concentrations d'héparine sur une période de 12 jours de culture.

(A) Évaluation de la survie cellulaire par test LDH. (B) Évaluation de l'activité métabolique des hCSM-GW par test MTT. (C) Évaluation de la prolifération cellulaire par dosage de Hoechst. L'analyse statistique a été effectuée selon un test ANOVA à deux voies. Les résultats sont affichés sous la forme de la moyenne \pm SEM (p -value : * <0.05 , *** <0.001). $n=3$

Après avoir étudié le dépôt des MEC-GW héparinées à différentes concentrations, j'ai décidé de mener une étude sur sa cytocompatibilité afin d'observer de potentiels impacts selon la dose d'héparine intégrée à notre MEC-GW.

En termes de survie cellulaire, et toujours par rapport à la condition contrôle de collagène, l'étude aux jours 1, 7 et 12 ne permet pas d'identifier de différence significative entre les différentes conditions (Figure 34A). A J1, nous pouvons ainsi observer une survie normalisée pour les MEC-GW à 0 ; 0,05 ; 2,5 ; 5 UI/mL respectivement de $0,855 \pm 0,061$; $0,928 \pm 0,122$; $0,901 \pm 0,032$; $0,772 \pm 0,072$. A J7 la normalisation des valeurs obtenues résulte en un rapport de $0,941 \pm 0,224$ pour la MEC-GW native ; $0,978 \pm 0,216$ pour une concentration en héparine de 0,05 UI/mL ; $1,117 \pm 1,161$ pour la MEC-GW à 2,5 UI/mL et $0,857 \pm 0,194$ pour la MEC-GW fonctionnalisée à 5 UI/mL d'héparine. Enfin, à J12 les rapports obtenus, de la MEC-GW native à celle concentrée à 5 UI/mL sont respectivement : $0,990 \pm 0,027$; $1,042 \pm 0,029$; $1,001 \pm 0,130$; $0,964 \pm 0,098$.

L'analyse de l'activité métabolique par test MTT permet de mettre en évidence une activité métabolique inférieure pour les cellules déposées sur le coating de MEC-GW à une concentration de 5 UI/mL et cela pour les jours 7 et 12, analysés en comparaison avec la condition contrôle (Figure 34B). En effet, à J7 et à J12, les DO à 550 nm pour la condition MEC-GW 5 UI/mL sont respectivement de $0,802 \pm 0,116$ et $1,567 \pm 0,219$ pour des valeurs contrôles de $1,528 \pm 0,099$ et $2,299 \pm 0,143$. En ce qui concerne les autres conditions, aucune différence significative avec le coating de collagène n'est révélée par cette étude. En effet à J7, pour les conditions 0 ; 0,05 et 2,5 UI/mL, les DO obtenues sont respectivement de $1,309 \pm 0,149$; $1,384 \pm 0,149$ et $1,280 \pm 0,155$; et à J12 : $1,886 \pm 0,122$; $2,012 \pm 0,113$; $2,014 \pm 0,212$. Nous pouvons cependant noter une activité métabolique ayant tendance à être plus faible en ce qui concerne les cellules déposées sur la MEC-GW native.

Enfin, l'étude de la prolifération cellulaire ne permet pas d'observer de différence significative entre les conditions testées que ce soit à J1 ou à J12 (Figure 34C). Avec des quantités d'ADN contrôle à J1 et J12 respectivement de $0,025 \pm 0,007 \mu\text{g}$ et $0,608 \pm 0,033 \mu\text{g}$ pour $0,040 \pm 0,009 \mu\text{g}$ et $0,735 \pm 0,044 \mu\text{g}$ dans la condition MEC-GW native ; $0,038 \pm 0,006 \mu\text{g}$ et $0,590 \pm 0,050 \mu\text{g}$ pour la MEC-GW concentrée à 0,05 UI/mL ; $0,039 \pm 0,009 \mu\text{g}$ et $0,594 \pm 0,041 \mu\text{g}$ pour une concentration de 2,5 UI/mL ; et

0,037 ± 0,009 µg et 0,493 ± 0,050 µg pour la MEC-GW à 5 UI/mL d'héparine. A J7 cependant, la condition MEC-GW 0,05 UI/mL montre une quantité d'ADN significativement supérieure à celle retrouvée dans la condition contrôle avec 0,391 ± 0,050 µg contre 0,237 ± 0,048 µg pour la condition de collagène. Les valeurs des autres conditions ne diffèrent pas significativement avec celle retrouvée pour le contrôle avec : 0,306 ± 0,041 µg pour la MEC-GW native ; 0,341 ± 0,032 µg pour la condition à 2,5 UI/mL ; et 0,196 ± 0,050 µg d'ADN pour la condition la plus concentrée en héparine.

Bien que les valeurs obtenues à J12 ne soient pas significativement différentes entre elles, nous pouvons toutefois noter une tendance supérieure en termes de quantité d'ADN à J12 pour la condition MEC-GW native. Ceci pourrait être à mettre en résonance avec la valeur d'activité métabolique retrouvée pour cette condition. En effet, une entrée à confluence des cellules au sein des puits engendrerait une diminution de la prolifération de celles-ci et pourrait se traduire par une diminution d'activité métabolique des cellules.

iii. Étude du relargage de l'héparine par le coating de MEC-GW héparinée

Après avoir étudié l'impact de l'ajout d'héparine sur la cytocompatibilité de la MEC-GW, j'ai voulu étudier sa disponibilité au sein du dépôt ainsi que la capacité de notre coating à la relarguer. Pour cela, j'ai tout d'abord mis au point une technique de dosage de l'héparine active permettant de vérifier le maintien de son activité après intégration dans la MEC-GW en solution.

J'ai ensuite validé la conservation de cette activité après une période de 48 h à 37 °C en milieu de culture α-MEM, ainsi qu'en solution de MEC-GW. Après vérification de ces deux conditions, j'ai effectué des dépôts d'une MEC-GW héparinée à 2,5 UI/mL pour lesquels des prélèvements du milieu de culture étaient effectués à 4 h, 24 h et 48 h. Le choix de cette concentration s'est basée sur la concentration maximale en héparine pour laquelle aucune interférence dans le dépôt de MEC-GW n'a été observée.

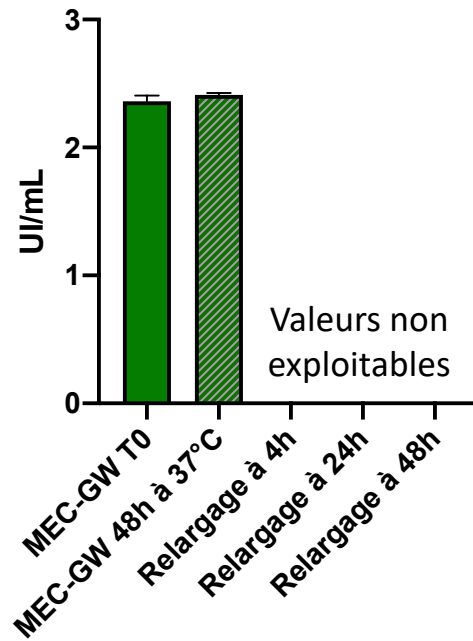


Figure 35. Analyse de la cinétique de relargage de l'héparine suite au dépôt de MEC-GW héparinée à 2,5 UI/mL.

Les résultats obtenus pour les conditions « MEC-GW » proviennent d'analyses effectuées sur la matrice en solution, en opposition aux conditions « relargage » pour lesquelles les tests ont été effectués sur le milieu de culture ayant été en contact avec le dépôt de la MEC-GW héparinée. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SEM. $n=3$.

Malheureusement, les valeurs obtenues pour chacune des conditions de relargage étant inférieures à celle du 1^{er} puits de gamme, cette étude n'a donné aucun résultat concluant. Aucune trace d'héparine active n'a été détectée dans le milieu de culture, que ce soit après 4 h, 24 h ou 48 h d'incubation avec le dépôt de MEC-GW héparinée (Figure 35).

iv. Évaluation de l'hémocompatibilité du coating de MEC-GW héparinée

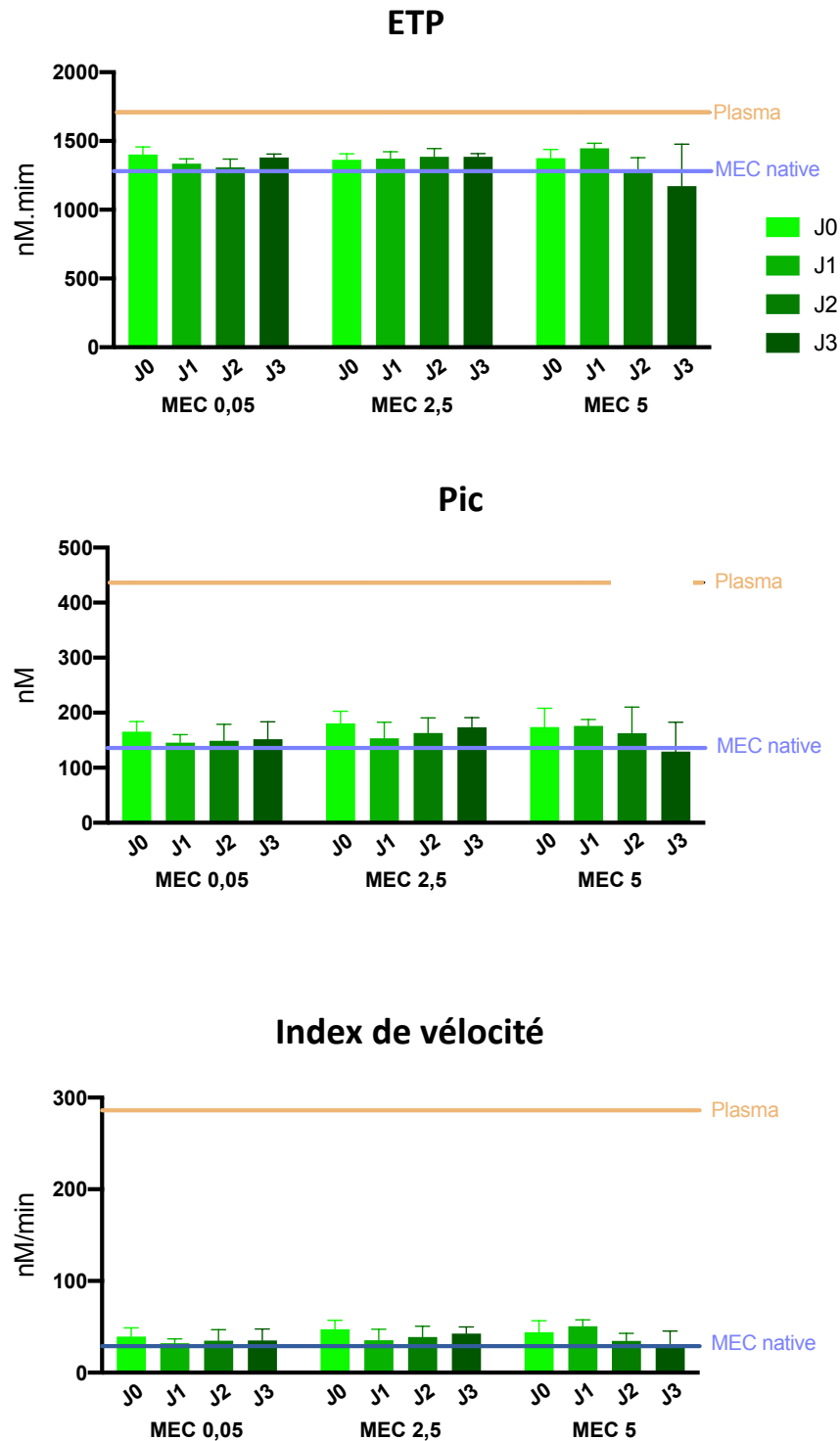


Figure 36. Cinétique de la thrombogénicité du coating de la MEC-GW en fonction de la concentration en héparine.

ETP : Potentiel de Thrombine Endogène, reflète le potentiel thrombogénique de l'échantillon. Pic : Valeur maximale de thrombine active générée avec l'échantillon. Index de vitesse : Pente de la génération explosive. L'analyse statistique est effectuée selon un test ANOVA à 2 facteurs. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SD. $n = 3$

Bien que l'observation d'un relargage d'héparine active n'ait pas été concluante, une possible rétention de l'héparine active pourrait tout de même conférer à notre MEC-GW une fonction anticoagulante supplémentaire. Afin d'étudier cela, j'ai mené des expériences de génération de thrombine en collaboration avec Mme Véronique REGNAULT (DCAC, UL) sur 3 MEC-GW à des concentrations d'héparine différentes (0,05 UI/mL ; 2,5 UI/mL ; 5 UI/mL) et sur une cinétique à 4 points : J0, J1, J2 et J3. Ces conditions sont comparées à une condition contrôle de MEC-GW native, ainsi qu'à une condition plasma (Figure 36).

Cette étude n'a montré aucune différence significative entre les différentes conditions de MEC-GW. En effet, l'ajout d'héparine dans la MEC-GW ne semble apporter aucun effet bénéfique à court terme sur le potentiel anticoagulant de la MEC-GW.

b. Ajout d'une composante immunomodulatrice

i. Analyse du sécrétome anti-inflammatoire des hCSM-GW, choix du meilleur traitement

Afin d'optimiser la composante anti-inflammatoire ajoutée à la MEC-GW, 11 conditions de stimulation pro-inflammatoire différentes ont été appliquées aux hCSM-GW, pour une période de 24 ou de 48 heures. Les sécrétomes produits ont ensuite été caractérisés afin de sélectionner le traitement le plus pertinent pour la production d'un sécrétome anti-inflammatoire. La caractérisation des différents sécrétomes a été effectuée en analysant la production de 12 cytokines différentes impliquées dans le processus de l'inflammation : IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 et IL-33. Afin de simplifier la présentation des résultats, je ne présenterai que les concentrations de cytokines permettant d'avancer dans la réflexion et le choix du traitement optimal

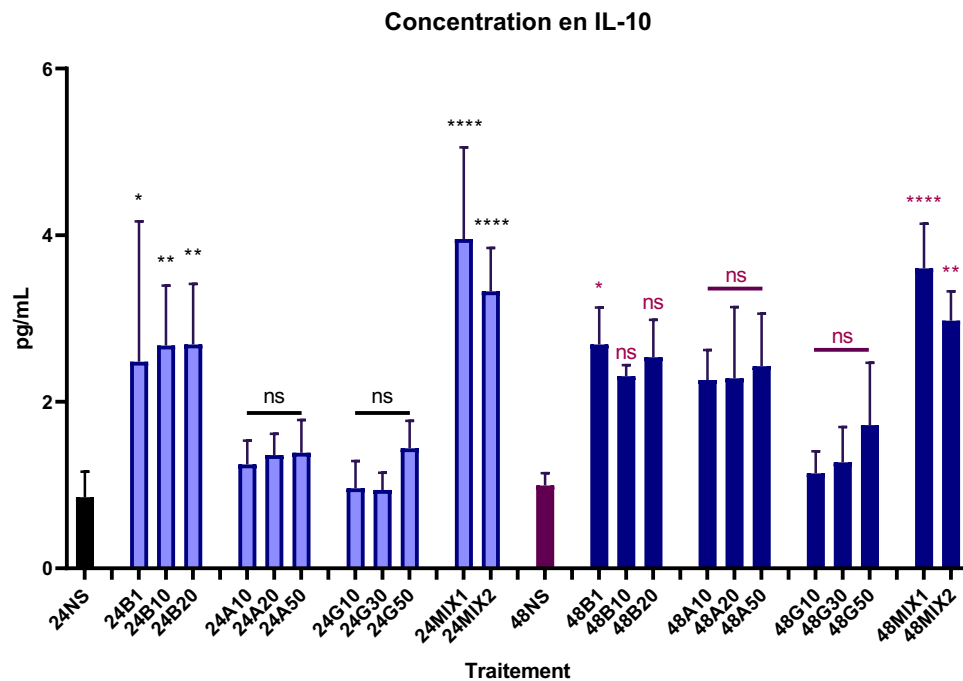
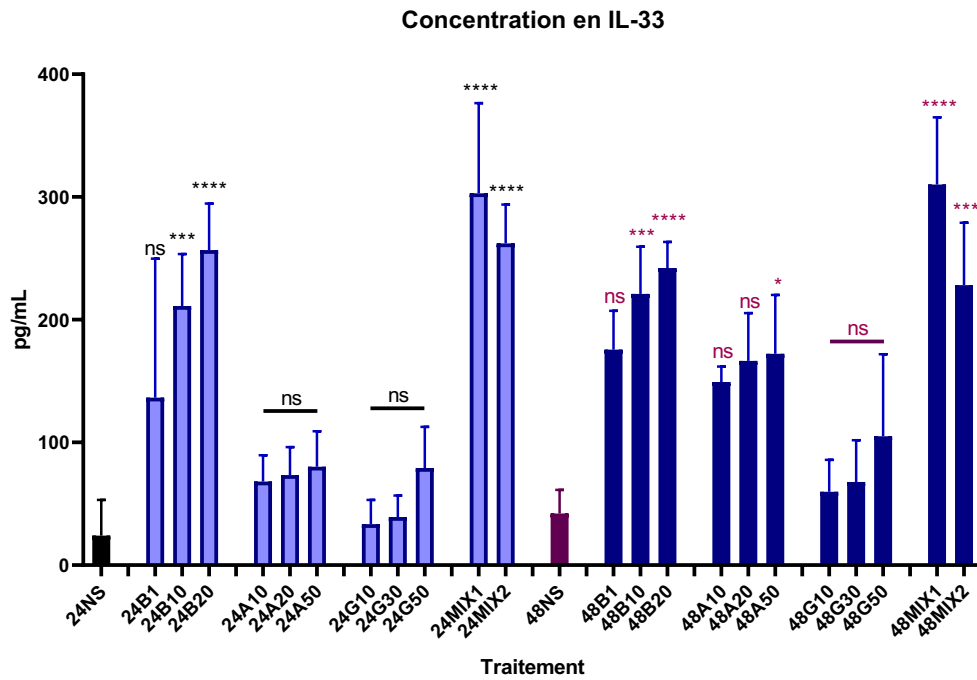
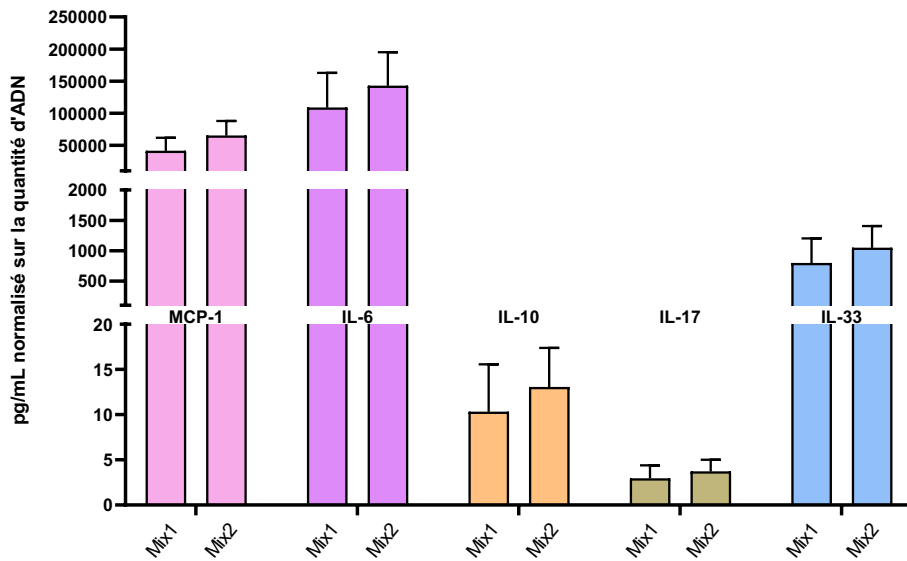


Figure 37. Analyse de la sécrétion d'IL-33 et d'IL-10 selon le traitement appliqué aux hCSM-GW.

Les traitements testés : Non stimulées (NS) ; IL-1 β (B) à 1 ng/mL, 10 ng/mL et 20 ng/mL ; TNF α (A) à 10 ng/mL, 20 ng/mL et 50 ng/mL ; et IFN γ (G) à 10 ng/mL, 30 ng/mL et 50 ng/mL ; Mix 1 (IL-1 β 10 ng/mL, TNF α 20 ng/mL et IFN γ 30 ng/mL) ; Mix 2 (TNF α 20 ng/mL et IFN γ 30 ng/mL). Chaque traitement est testé sur une période de 24 h et 48 h. L'analyse statistique a été effectuée selon un test ANOVA à 2 facteurs. Les résultats sont affichés sous la forme « moyenne \pm SEM » (p -value : * <0.05, ** <0.01, *** <0.001). Chaque condition est comparée à la condition Non Stimulées correspondante (24 h en noir, ou 48 h en rouge). $n=3$

Les premières analyses effectuées dans le but d'éliminer les traitements les moins pertinents se sont, entre autres, concentrées sur les cytokines anti-inflammatoires IL-33 et IL-10. Ainsi, pour 24 h et pour 48 h séparément, la sécrétion de ces cytokines en fonction des différents traitements appliqués a été comparée à celle retrouvée en conditions basales, sans traitement (Figure 37). Nous pouvons ainsi tout d'abord observer qu'à 24 h, les traitements à base de $TNF\alpha$ ou d' $IFN\gamma$ seuls, ne montrent aucune différence significative dans la sécrétion des cytokines IL-10 et IL-33. Parallèlement, un traitement à l'IL-1 β induit une augmentation de la sécrétion de ces cytokines, avec un effet dose dépendant croissant dans le cas de l'IL-33. Les conditions Mix quant à elles, induisent les plus importantes sécrétions de ces cytokines avec une tendance supérieure dans le cas d'un traitement Mix1 (IL-1 β 10 ng/mL, $TNF\alpha$ 20 ng/mL et $IFN\gamma$ 30 ng/mL) mais sans différence significative avec les valeurs obtenues de la cadre d'un traitement Mix2 ($TNF\alpha$ 20 ng/mL et $IFN\gamma$ 30 ng/mL). Les concentrations maximales sont d'ailleurs retrouvées pour ces deux traitements après une exposition pendant 24 heures. Je me suis donc concentré sur ces traitements Mix 1 et 2 pour des analyses plus poussées.

Analyse du sécrétome après 24h



Analyse du sécrétome après 48h

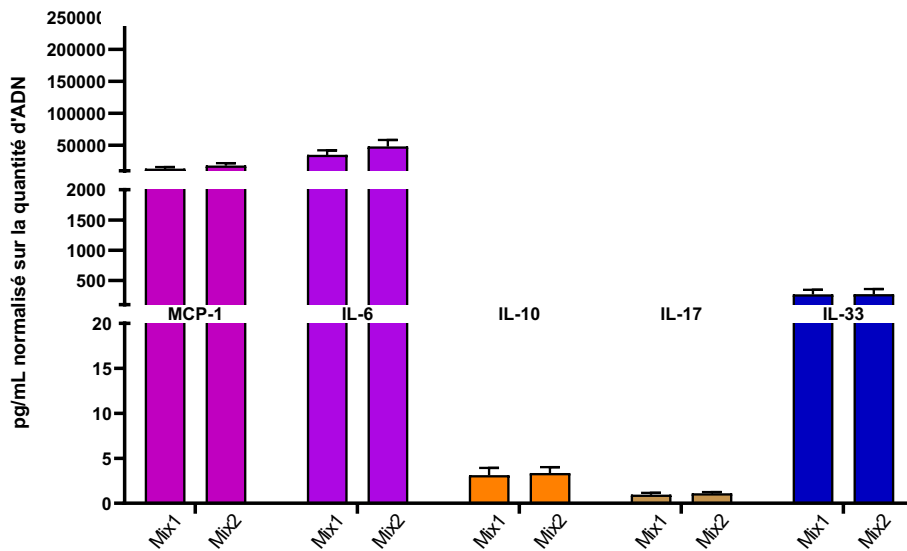
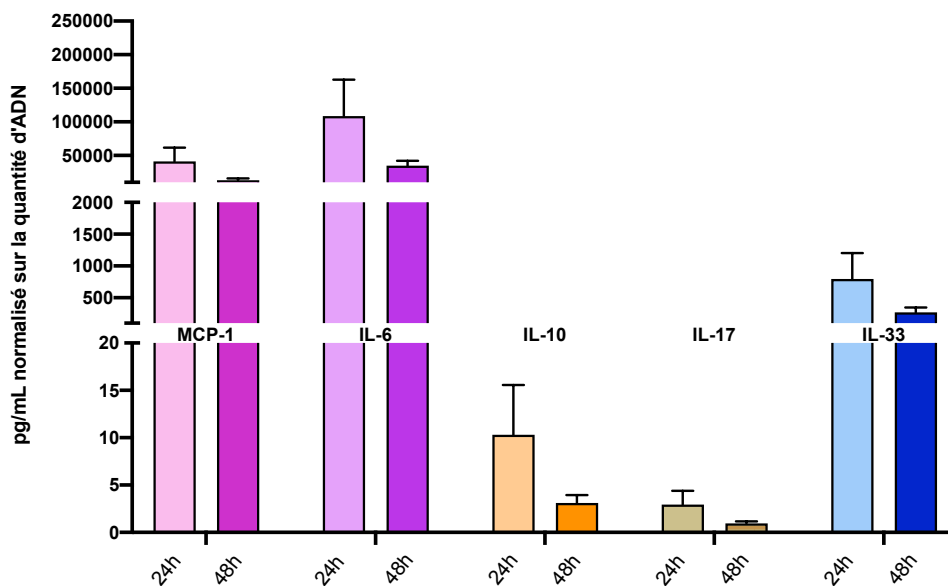


Figure 38. Analyses de la sécrétion des cytokines d'intérêt par les hCSM-GW (en pg/mL en fonction de la quantité d'ADN) selon les traitements retenus Mix 1 et Mix 2 à 24 h et 48 h. L'analyse statistique a été effectuée selon un test-t multiple. Les résultats sont affichés sous la forme « moyenne ± SEM ». n=3

Analyse du sécrétome de Mix 1 pour 24h et 48h



Analyse du sécrétome de Mix 2 pour 24h et 48h

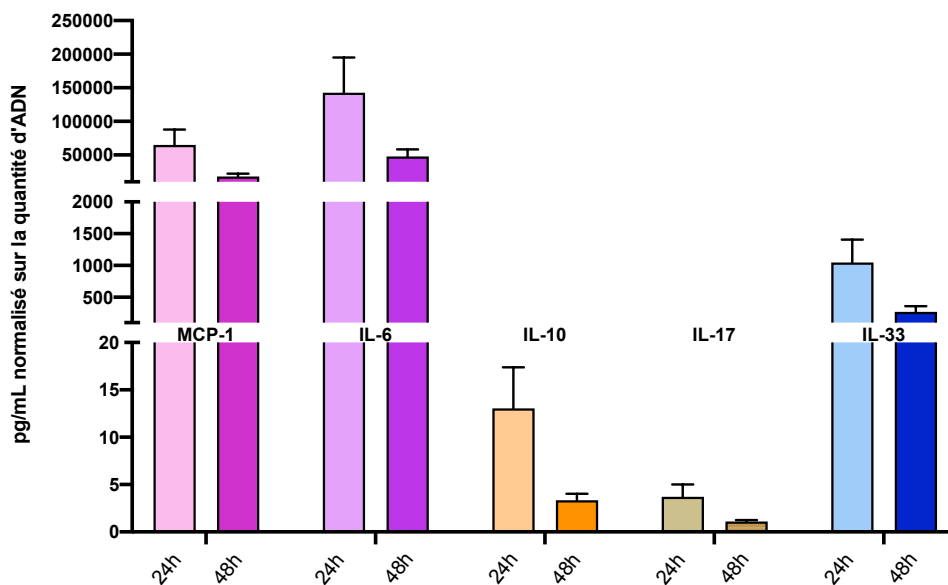


Figure 39. Analyse de la sécrétion des cytokines d'intérêt par les hCSM-GW (en pg/mL en fonction de la quantité d'ADN). Comparaison des conditions 24 h et 48 h pour le Mix 1 et Mix 2. L'analyse statistique a été effectuée selon un test-t multiple. Les résultats sont affichés sous la forme « moyenne ± SEM ». n=3

Les résultats normalisés par rapport à la quantité d'ADN retrouvée pour chacune des conditions permettent de comparer les différents traitements Mix 1 et 2 pour les conditions 24 et 48 heures. Après stimulation des cellules avec le Mix 1, on retrouve à 24 h et 48 h respectivement : $41,2 \pm 20,5$ ng/mL et $13,2 \pm 2,7$ ng/mL de MCP-1 ; $108,8$

$\pm 54,2$ ng/mL et $34,8 \pm 7,2$ ng/mL d'IL-6 ; $10,3 \pm 5,3$ pg/mL et $3,1 \pm 0,8$ pg/mL d'IL-10, $2,9 \pm 1,5$ pg/mL et $1,0 \pm 0,2$ pg/mL d'IL-17a et $794,9 \pm 409,2$ pg/mL et $269,3 \pm 78,0$ pg/mL d'IL-33 (Figure 39). Une stimulation avec le Mix 2 induit la sécrétion dans le surnageant à 24 h et 48 h respectivement de : $65,0 \pm 22,8$ ng/mL et $18,1 \pm 4,0$ ng/mL de MCP-1 ; $142,7 \pm 52,3$ ng/mL et $47,9 \pm 10,5$ ng/mL d'IL-6 ; $13,1 \pm 4,3$ pg/mL et $3,4 \pm 0,7$ pg/mL d'IL-10, $3,7 \pm 1,3$ pg/mL et $1,1 \pm 0,2$ pg/mL d'IL-17a et $1048,3 \pm 358,2$ pg/mL et $271,1 \pm 89,0$ pg/mL d'IL-33 (Figures 38 et 39).

Pour la totalité des cytokines d'intérêt, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux traitements Mix 1 et Mix 2, que ce soit après 24 h ou 48 h de stimulation. De plus, pour une même cytokine, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les valeurs observées à 24 h et 48 h. On peut cependant noter une tendance à la diminution de la concentration de cytokines retrouvées dans le surnageant à 48 h en comparaison des valeurs retrouvées à 24 h pour le même traitement (Figure 38). La condition retenue afin de produire un sécrétome anti-inflammatoire à partir de hCSM-GW est donc le traitement Mix 2, qui montre des résultats similaires à ceux obtenus après traitement Mix 1 mais qui implique l'utilisation de seulement deux cytokines pro-inflammatoires contre trois.

ii. Analyse du pool de sécrétome anti-inflammatoire produit en plus grande quantité

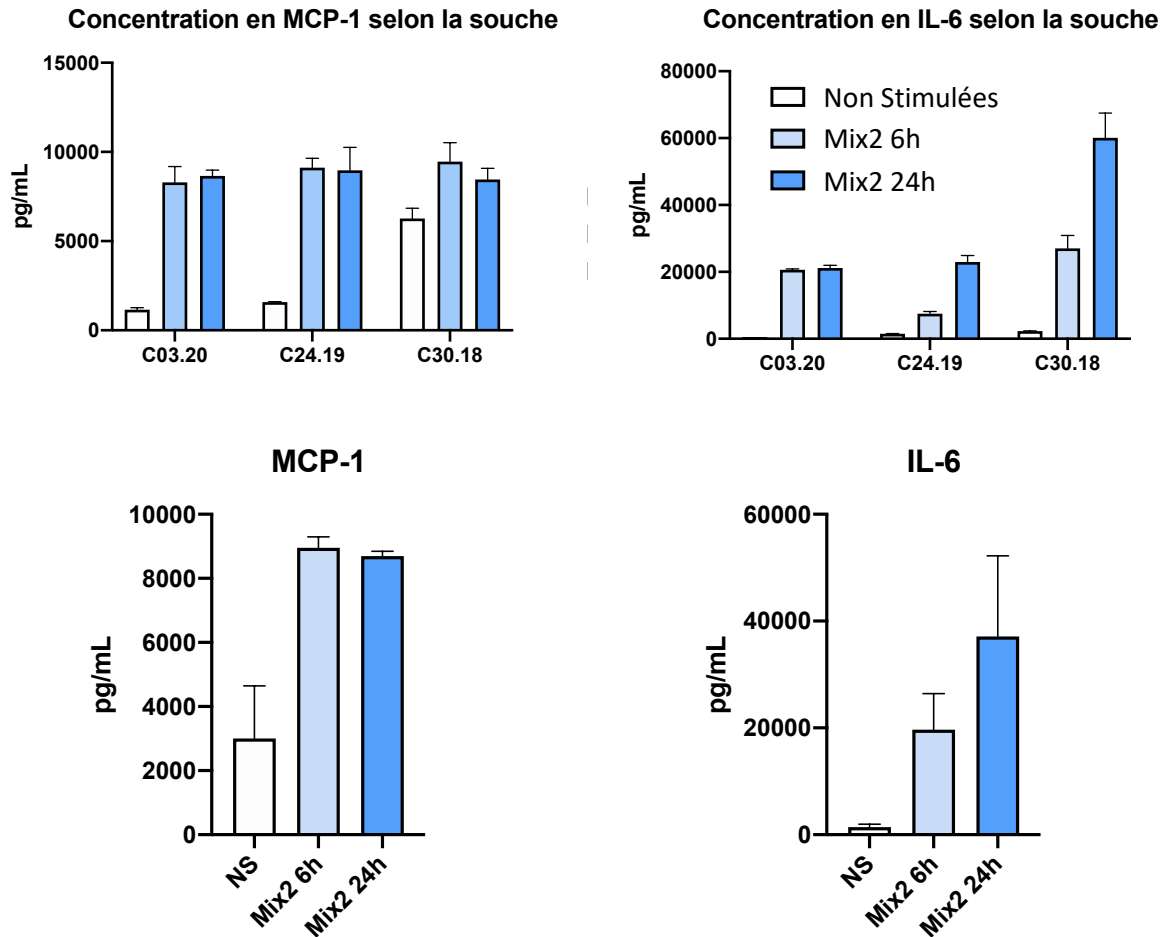


Figure 40. Concentrations en MCP-1 et IL-6 du pool de sécrétome anti-inflammatoire produit pour les essais de fonctionnalisation de la MEC-GW.

Les résultats sont présentés poolés (en bas) mais également selon la souche de hCSM-GW testée (C03.20 ; C20.19 et C30.18) NS : Non Stimulé. L'analyse statistique est effectuée selon un test ANOVA à un facteur. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM. $n=3$

Après avoir déterminé le traitement optimal pour la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les hCSM-GW, j'ai entrepris de produire ce sécrétome dans un plus grand volume afin de pouvoir le caractériser d'un côté, et d'en utiliser pour la suite des expériences d'incorporation dans la MEC-GW. La caractérisation de ce surnageant est ensuite effectuée selon son contenu en cytokines IL-6 et MCP-1, étant respectivement : la cytokine d'intérêt sécrétée à la plus haute concentration, et impliqué dans le recrutement de macrophages et promouvant l'angiogenèse. J'ai donc appliqué le traitement Mix 2 sur une période de 24 h à 3 souches différentes de hCSM-

GW. Parallèlement à cela, j'ai également tenté d'obtenir un surnageant exempt de d'IL-1 β , de TNF α et d'IFN γ en renouvelant le milieu de culture après 6 h de traitement Mix 2. Le milieu frais est laissé au contact des cellules 24 h puis récupéré afin de le soumettre à ces mêmes analyses de contenu en IL-6 et MCP-1. Ces expériences sont effectuées en comparaison d'un contrôle où les cellules n'ont subi aucun traitement (Figure 40).

Cette expérience permet d'observer une production statistiquement similaire en ce qui concerne MCP-1 selon le type de protocole appliqué pour administrer le traitement. Les différentes souches comparées entre elles, affichent également une production équivalente de cette molécule après traitement, alors que leur production basale est hétérogène, notamment la souche C30.18 qui montre une plus grande production sans stimulation. En ce qui concerne la production d'IL-6, aucune différence significative n'est relevée entre les deux protocoles de stimulation. Il est à noter que parmi les 3 souches testées, des différences de comportement en réponse aux deux protocoles de stimulation sont observées.

4. Caractérisation du greffon vasculaire développé par ingénierie tissulaire

a. Optimisation de l'étape de cellularisation

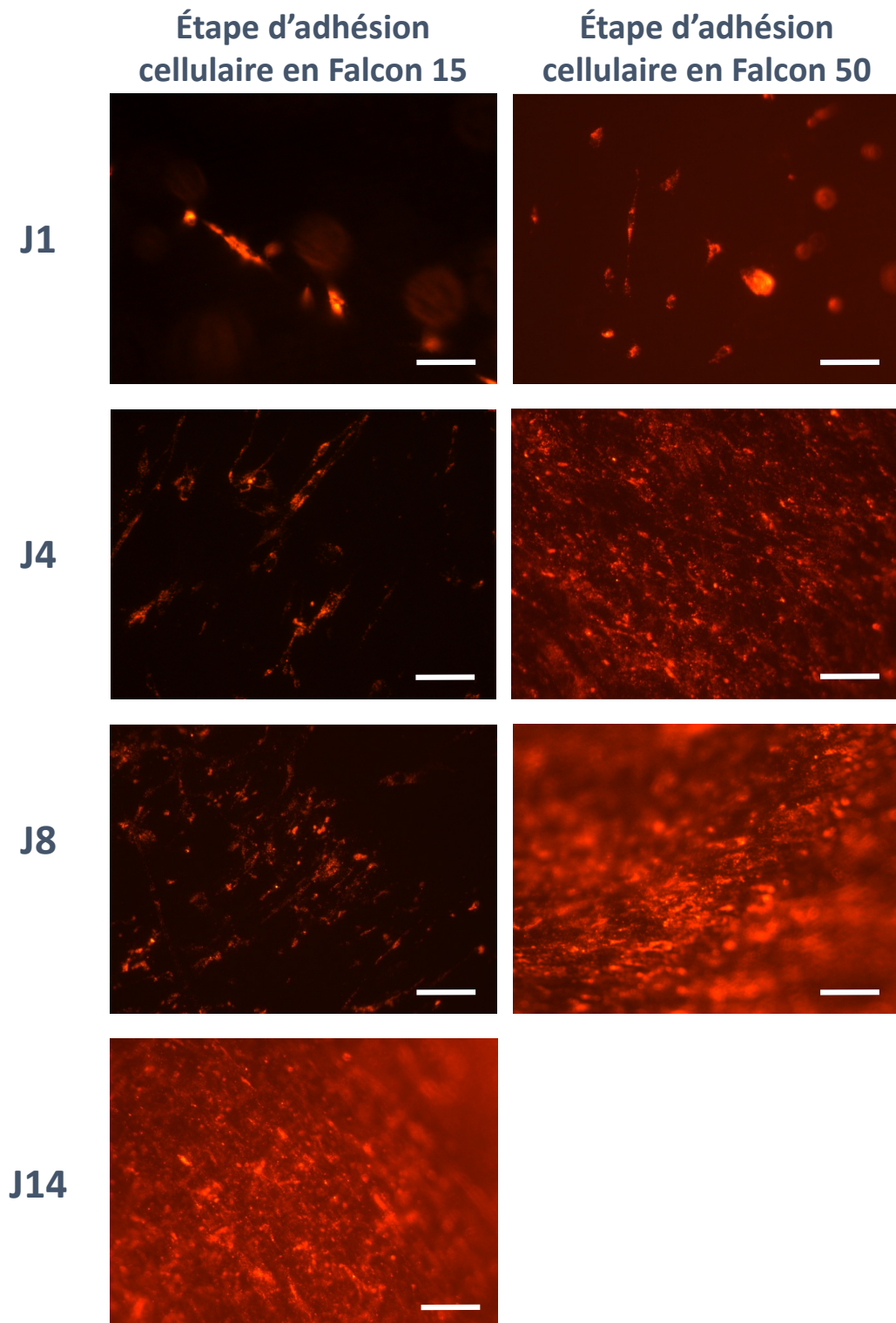


Figure 41. Suivi de la cellularisation à la surface luminale du greffon par observation en microscopie à épifluorescence de la surface luminale de la prolifération cellulaire via le marquage Dil.

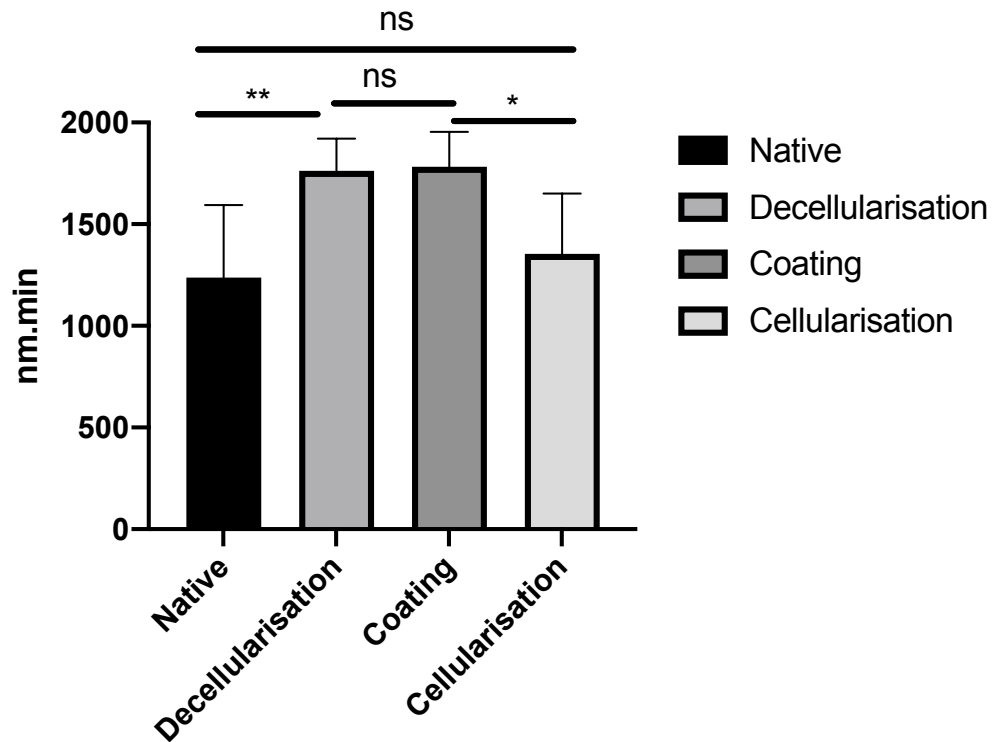
La barre d'échelle correspond à 500 μm .

Afin d'optimiser la période de cellularisation de la surface luminale du greffon, le moyen le plus efficace semblait d'augmenter le taux d'adhésion cellulaire à J0. Pour cela j'ai entrepris de comparer l'effet de l'augmentation du volume de milieu au cours des premières heures de cellularisation, toutes autres conditions restant identiques par ailleurs. En effet, l'augmentation du volume pour un même nombre de cellules impliquant une plus grande réserve de nutriments, et d'oxygène semblait être la meilleure option afin d'optimiser le taux de survie des cellules et ainsi l'adhésion cellulaire.

J'ai donc appliqué le protocole de production de notre greffon en effectuant l'étape d'adhésion en tube Falcon 15 ou en Falcon 50. J'ai pu ensuite observer la prolifération des cellules à la surface luminale au cours de la période de culture, à l'aide du marqueur Dil préalablement utilisé pour marquer les hCSM-GW (Figure 41). Ainsi à J1, un nombre inférieur de cellules ayant adhéré est observable dans la condition utilisant un Falcon 15 en comparaison à celle utilisant un Falcon 50. A J4, les observations effectuées par microscopie à épifluorescence permettent d'établir que le recouvrement cellulaire de la surface luminale est plus important dans la condition Falcon 50. Cette condition permet d'obtenir un recouvrement complet à J8, tant dis que dans le cas de l'utilisation d'un Falcon 15 celui-ci ne survient qu'à J14. Afin d'optimiser la production de notre greffon l'étape de cellularisation est donc par la suite effectuée en tube Falcon 50 et pour une durée de 8 jours.

b. Analyse de l'hémocompatibilité du greffon au cours de sa fabrication

A.



B.

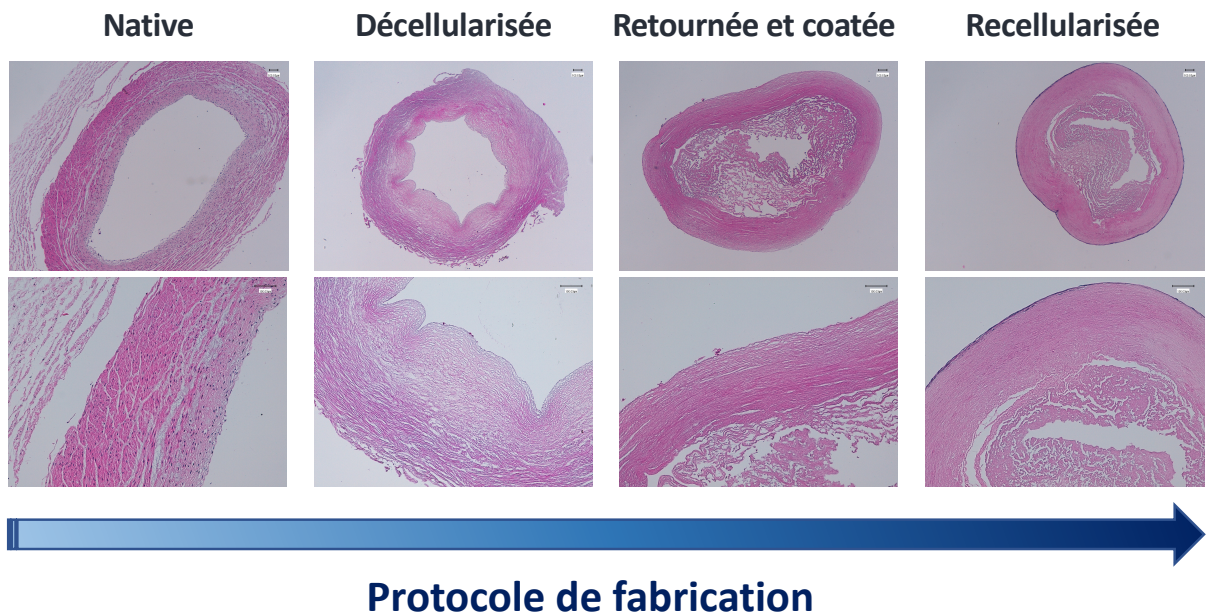


Figure 42. Suivi de la thrombogénicité de greffon au cours de sa production.

(A) Évaluation du potentiel de thrombine endogène de la paroi vasculaire selon les étapes de fabrication du greffon. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SD (p -value : * <0.05 , ** <0.01). $n=7$. (B) Planche histologique de la paroi vasculaire de l'artère ombilicale au cours du protocole de fabrication du greffon, coloration Hématoxyline-éosine. L'analyse statistique a été effectuée selon un test ANOVA à 1 facteur.

J'ai également mené une étude évaluant l'impact des différentes étapes de fabrication de notre greffon sur la thrombogénicité du substitut par des tests de génération de thrombine. Cette étude visait également à comparer les résultats obtenus selon le type d'artère utilisé au départ : l'artère ombilicale humaine (n=4) et l'artère mammaire porcine (n=3). Les résultats obtenus pour chacune des étapes de fabrication ne montraient aucune différence significative selon le type d'artère utilisé. Ainsi, les données présentées ci-dessus sont le résultat d'une mise en commun des données obtenues pour l'artère ombilicale humaine et l'artère mammaire porcine (n=7) (Figure 42A). Les différentes conditions testées sont également présentées sous la forme d'une planche histologique présentant l'évolution de la paroi vasculaire de l'artère ombilicale par coloration HES (Figure 42B). Cette étude de la paroi vasculaire du greffon au cours de sa fabrication a permis d'observer des variations en termes de potentiel de thrombine endogène. En effet, l'artère native, à l'état basal, présente un ETP de $1237,429 \pm 356,546$ nM/min, valeur augmentant significativement après décellularisation atteignant la valeur de $1763 \pm 158,211$ nM/min. L'étape de coating ne montre pas avoir d'effet sur la valeur d'ETP de la paroi vasculaire du greffon ($1783,143 \pm 170,906$ nM/min). Cependant, après recellularisation le potentiel de thrombine endogène diminue significativement pour atteindre $1354,857 \pm 295,725$ nM/min, valeur statistiquement identique à la valeur de départ retrouvée pour la condition « artère native ».

c. Analyse des propriétés mécaniques du greffon au cours de sa fabrication

i. Test de pression à l'éclatement

Pression à la rupture

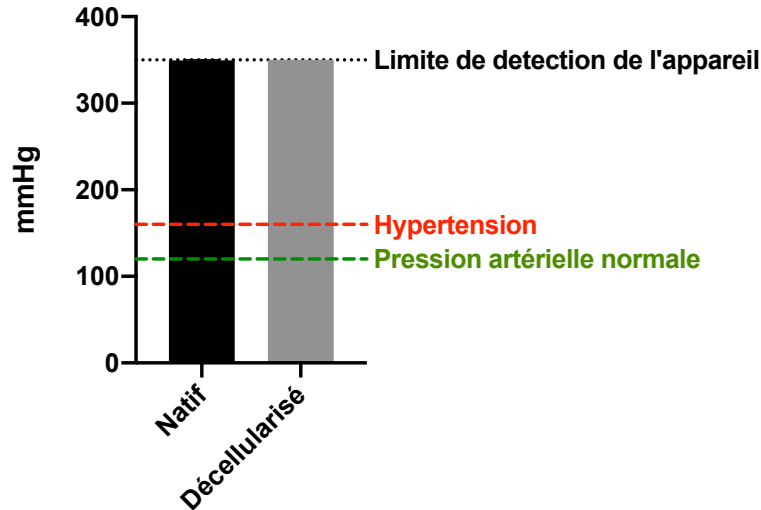


Figure 43. Impact de la décellularisation sur la résistance à la pression interne de l'artère ombilicale humaine.

Une simple étude a été menée pour vérifier l'impact de la décellularisation sur la résistance du greffon à la pression interne de l'artère ombilicale (Figure 43). Bien que les mesures aient été limitées par la valeur maximale de pression applicable par l'appareil (ne pouvant pas dépasser 350 mmHg), aucune artère ombilicale, à l'état natif ou après décellularisation, n'a montré de signe de rupture de la paroi. Si cette étude très basique n'a pas montré de valeur d'éclatement/déchirure, elle a été complétée par des tests plus performants en collaboration avec Mme Isabelle Royaud, M. Marc Poncot et M. Cyril Noirel de l'Institut Jean Lamour.

ii. Test d'étirement longitudinal à la rupture

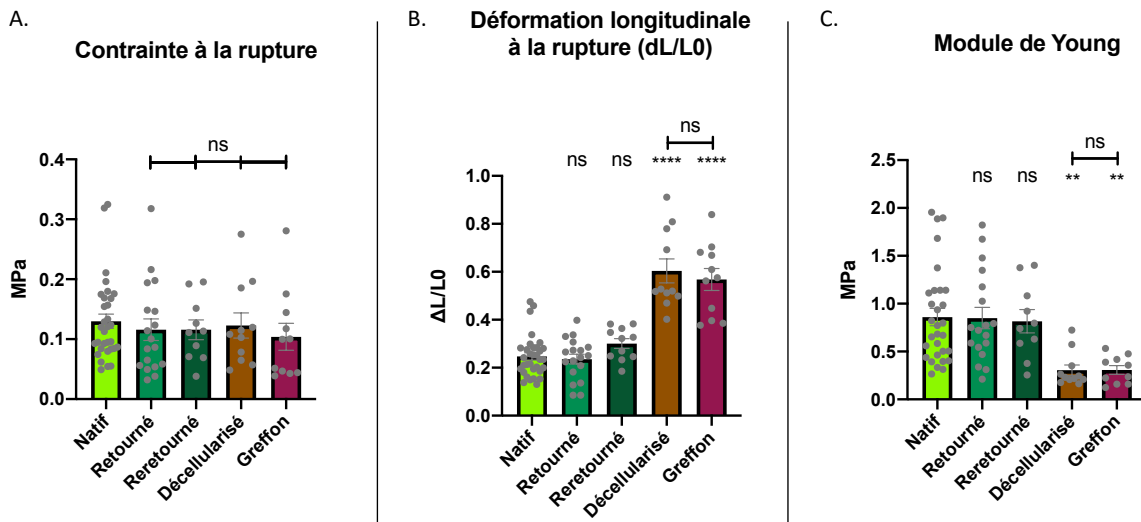


Figure 44. Test d'étirement à la rupture : Impact des différentes étapes appliquées au cours du protocole de fabrication du substitut vasculaire sur les propriétés mécaniques de l'artère ombilicale humaine.

(A) Valeurs de contrainte à la rupture pour chacune des conditions. (B) Valeurs de déformation longitudinale à la rupture pour chacune des conditions. (C) Valeur de Module de Young longitudinal obtenus pour chacune des conditions. Le nombre d'échantillons testés pour chacune des conditions est de : $n=25$ « natif » ; $n=18$ « retourné » ; $n=11$ « décellularisé » ; $n=10$ « greffon ». L'analyse statistique a été effectuée selon un test ANOVA à 1 facteur. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SEM (p -value : ** < 0.01 , **** < 0.0001).

Afin de déterminer le potentiel impact des différentes étapes du protocole de fabrication sur les propriétés mécaniques de l'artère ombilicale, différentes artères ont été testées dans le cadre d'expériences d'étirement à la rupture.

En termes de contrainte à la rupture, aucune différence significative n'a été relevée entre les différentes conditions et les valeurs obtenues pour chacune des conditions « natif », « retourné », « reretourné », « décellularisé » et « greffon » sont respectivement de : $0,1299 \pm 0,06689$ MPa ; $0,1157 \pm 0,07620$ MPa ; $0,1158 \pm 0,05220$ MPa ; $0,1229 \pm 0,06955$ MPa et $0,1039 \pm 0,07468$ MPa (Figure 44A).

Parallèlement, le calcul de la déformation longitudinale à la rupture ne montre aucune différence significative entre les artères ombilicales natives et celles ayant subi une ou deux étape (s) de retournement avec des valeurs respectives de $0,2468 \pm 0,08563$; $0,2356 \pm 0,08659$; et $0,3006 \pm 0,06729$. L'étape de décellularisation quant à elle, induit une augmentation significative de la déformation longitudinale à la rupture allant jusqu'à une valeur de $0,6036 \pm 0,1654$. Cette valeur obtenue en condition «

décellularisé » ne montre aucune différence significative avec celle retrouvée dans la condition « greffon » ($0,5678 \pm 0,1516$) (Figure 44B).

Le calcul du module de Young longitudinal permet de relever le même schéma de concordance entre les différentes conditions que celui concernant les valeurs de déformation à l'élongation. En effet, aucune différence significative n'est observée entre le module de Young en condition native, ou après une ou les deux étapes de retournement, avec des valeurs respectives de : $0,86 \pm 0,4934$ MPa ; $0,8166 \pm 0,3857$ MPa ; et $0,8493 \pm 0,4732$ MPa. Cependant, les modules de Young déterminés pour les conditions « décellularisé » ($0,3056 \pm 0,1802$ MPa) et « greffon » ($0,3077 \pm 0,1452$ MPa) montrent tous deux une diminution significative en comparaison à la condition « natif », mais ne sont pas significativement différents entre eux (Figure 44C).

iii. Test DMA en compression

Facteur d'amortissement

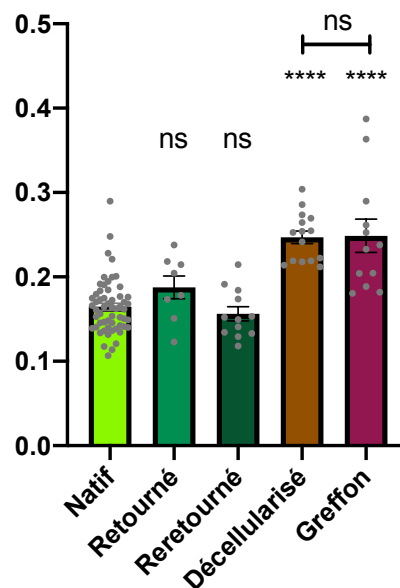


Figure 45. Analyse mécanique dynamique : Impact des différentes étapes appliquées au cours du protocole de fabrication du substitut vasculaire sur le facteur d'amortissement de l'artère ombilicale humaine.

Le nombre d'échantillons testés pour chacune des conditions est de : $n=57$ « natif » ; $n=8$ « retourné » ; $n=12$ « reretourné » ; $n=15$ « décellularisé » ; $n=12$ « greffon ». L'analyse statistique a été effectuée selon un test ANOVA à 1 facteur par rapport à la condition « natif ». Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SEM (p -value : **** <0.0001).

Afin de compléter les analyses mécaniques effectuées sur l'artère ombilicale au long du protocole de fabrication du greffon, des analyses de DMA ont été menées. Les

résultats obtenus permettent de suivre l'évolution du facteur de perte au cours du processus (Figure 45). À l'état natif, le facteur de perte mesuré pour une artère ombilicale humaine, sur une étude composée de 57 échantillons, est de $0,1646 \pm 0,03253$. Cette valeur ne montre aucune différence significative avec celles retrouvées pour les artères ayant été retournées une ou deux fois (conditions pour lesquelles les valeurs obtenues sont respectivement $0,1875 \pm 0,03837$ et $0,1562 \pm 0,02898$). La décellularisation du vaisseau quant à elle, entraîne une augmentation significative de ce facteur atteignant $0,2470 \pm 0,02901$. Valeur ne montrant aucune différence significative avec celle obtenue dans la condition « greffon » s'élevant à $0,2487 \pm 0,06826$.

B. L'étude *in vivo*

Au cours de ma thèse, l'étude *in vivo* de notre greffon vasculaire a été menée sur un total de 14 porcs (sont exclus les expériences ayant présenté un problème technique provenant soit de l'opérateur, soit d'une mauvaise réaction de l'animal). L'anesthésie et les actes chirurgicaux ont été réalisés par des professionnels à l'école de chirurgie de Nancy. Mon rôle a été de préparer les greffons, d'assister les chirurgiens, de récupérer les greffons à la fin de l'étude après explantation pour analyse. Pour chacun de ces animaux, deux greffons cellularisés et maturés par une étape de cisaillement ont été préparés afin de palier à toute éventualité. Afin de valider la conformité du greffon implanté, un segment du greffon préparé pour l'implantation est systématiquement récupéré, fixé, coupé afin d'effectuer une analyse histologique par coloration hématoxyline-éosine.

Je vais ici décrire les résultats obtenus pour trois d'entre eux, chacun dans un protocole expérimental différent mais reflétant les résultats globaux obtenus au cours de l'étude.

Le pontage coronaire direct a été abandonnée rapidement du fait d'une particularité anatomique du porc (la localisation reculée de l'artère coronaire sur le cœur), et afin d'évaluer les capacités du greffon vasculaire à perfuser le muscle cardiaque, les expériences préliminaires ont été menées afin d'intégrer notre greffon selon un pontage mammo-coronaire.

1. Pontages mammo-coronaires

Trois animaux ont été utilisés dans le but d'effectuer des pontages mammo-coronaires à l'aide de notre greffon vasculaire de petit diamètre. Deux d'entre eux ont été utilisés afin de vérifier la faisabilité du pontage en reliant ainsi directement l'artère mammaire (en proximal) directement à l'artère coronaire (en distal). À la suite de l'assemblage artériel, l'interventriculaire antérieure (IVA) était ensuite ligaturée afin d'établir une perfusion exclusive du muscle cardiaque par le sang provenant de l'artère mammaire de l'animal. L'animal était ensuite mis à mort.

Une fois la faisabilité de l'opération validée, un animal a été utilisé afin de réaliser ce pontage mammo-coronaire en intégrant notre greffon comme passerelle entre l'artère mammaire et l'artère coronaire. À la suite de l'intégration du substitut et de la ligature de l'IVA, la perfusion du cœur fut un succès pendant 4 heures après quoi le cœur de l'animal a fibrillé.

Ce modèle d'étude *in vivo* étant trop lourd pour l'animal et ne permettant pas un suivi post-opératoire optimal du fait de la quadrupédie de l'animal (difficulté de réduire la thoracotomie), il a été décidé de valider le comportement de notre greffon par d'autres schémas de pontages artériels. L'artère fémorale porcine possédant un diamètre inférieur à 6 mm, nous nous sommes dirigés vers des pontages fémoraux, modèle reflétant la problématique des pontages de vaisseaux périphériques chez l'Homme.

2. Pontages fémoraux

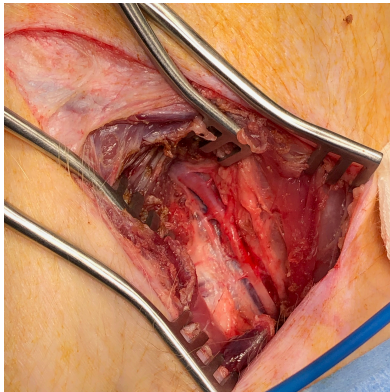
a. Nicolas, 2 semaines d'implantation

Afin d'obtenir rapidement des résultats préliminaires, nous avons décidé d'effectuer une intégration de notre greffon en position fémorale sur une période de 14 jours afin d'évaluer la perméabilité de celui-ci au cours des premières semaines de greffe.

Après le processus de préconditionnement sous contraintes de cisaillements en bioréacteur de 6 heures, une longueur de 5 cm de greffon a été implanté au niveau de l'artère fémorale de l'animal après résection d'une longueur équivalente d'artère native.

i. Perméabilité du greffon à l'implantation

Artère fémorale dégagée



Greffon intégré

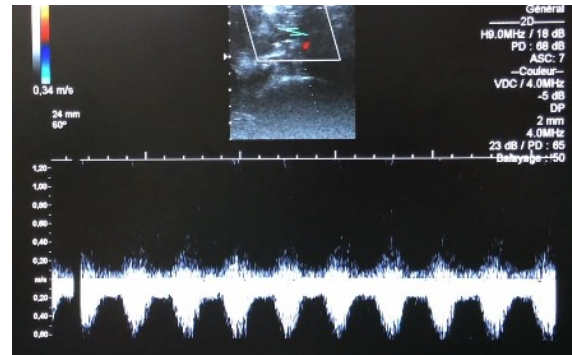
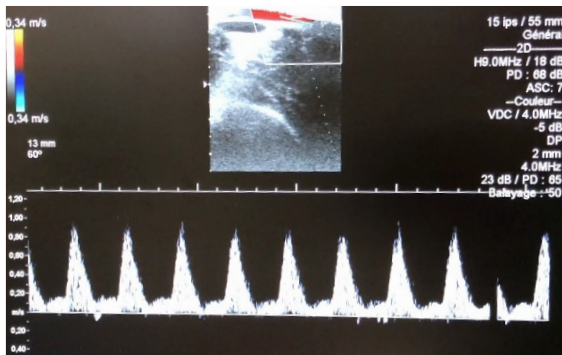
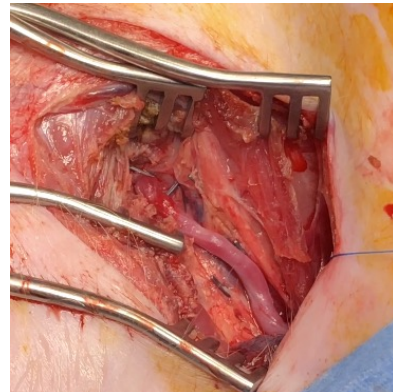


Figure 46. Observation du site d'implantation avant et après la greffe vasculaire, suivi de la validation de la circulation sanguine par échographie Doppler.

Après intégration du greffon vasculaire par deux anastomoses termino-terminales en position fémorale, la perméabilité du pontage est vérifiée par contrôle visuel, ainsi que par échographie Doppler. Une valeur contrôle est préalablement effectuée par échographie Doppler de l'artère fémorale native ce qui permet d'observer un flux sanguin contrôle d'une vitesse maximale de 0,90 m/s. L'échographie Doppler effectuée sur le substitut après avoir refermé le site, montre un flux sanguin dont le rythme est stable, avec une vitesse de flux allant jusqu'à 0,60 m/s (Figure 46). Le diamètre du greffon implanté a également été évalué par échographie Doppler à la suite de son intégration dans le système vasculaire de l'animal indiquant un diamètre interne de 4,1 mm.

ii. Suivi sanguin de l'animal

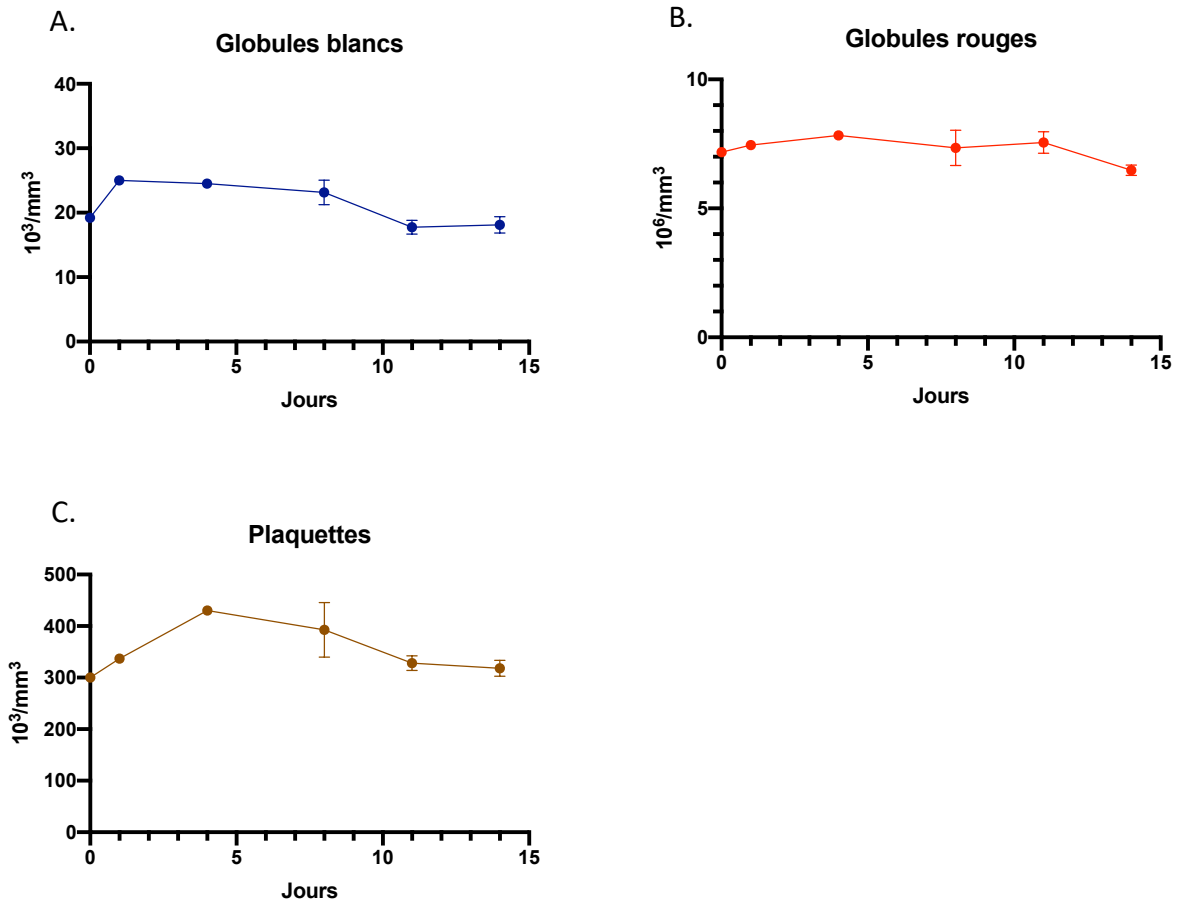


Figure 47. Suivi de la numération sanguine de l'animal sur une période de 14 jours après implantation vasculaire.

(A) Numération des globules blancs. (B) Numération des globules rouges. (C) Numération des plaquettes

Afin d'évaluer les variations en termes de numération formule sanguine (NFS) chez l'animal implanté, des prélèvements sanguins sont effectués à J1, J4, J8, J11 ainsi que lors de la récupération du greffon à J14. Tous ces prélèvements sont comparés à une situation basale de l'animal, obtenue par un prélèvement sanguin avant l'opération. Ces prélèvements sanguins permettent de monitorer plusieurs paramètres dont notamment le nombre de globules blancs, de globules rouges, ainsi que l'évolution du nombre de plaquettes au cours du temps. Ainsi, au cours de la période implantatoire, aucune variation n'est détectée quant à la population de globules rouges (Figure 47B). A contrario, des augmentations sont observées dans le cas des plaquettes ainsi que dans le cas des globules blancs. Dès J1, le nombre de plaquettes retrouvées dans le sang de l'animal augmente pour se stabiliser entre J4 et J8 aux alentours des $450 \cdot 10^3/\text{mm}^3$. À partir de J11, le nombre de plaquettes retrouve un état

basal situé aux environs de $300.10^3/\text{mm}^3$ (Figure 47C). Le nombre de globules blancs augmente également dès J1 mais se stabilise très rapidement à $25.10^3/\text{mm}^3$ jusqu'à J11 où l'on retrouve une numération inférieure à celle initialement observée (Figure 47A).

iii. Perméabilité du greffon à l'explantation

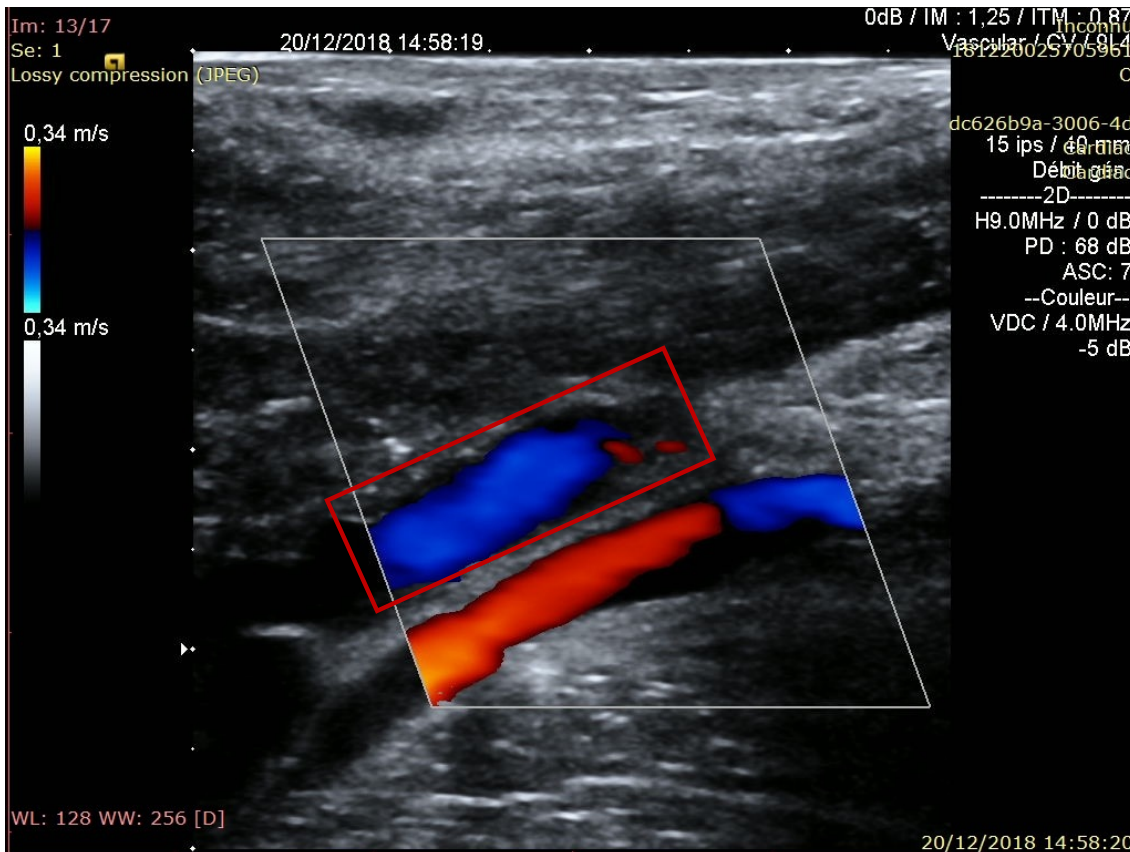


Figure 48. Échographie Doppler du greffon vasculaire après 2 semaines d'implantation. Deux vaisseaux sanguins sont observables, en bleu le greffon vasculaire et la veine adjacente en rouge.

À 2 semaines post-opératoires, et précédant la mise à mort de l'animal, une vérification de la perméabilité du greffon a été effectuée par échographie Doppler (Figure 48). Cette analyse permet d'observer le greffon perfusé (en bleu) après 2 semaines d'implantation en position fémorale.

iv. Analyse histologique du substitut récupéré après 2 semaines d'implantation

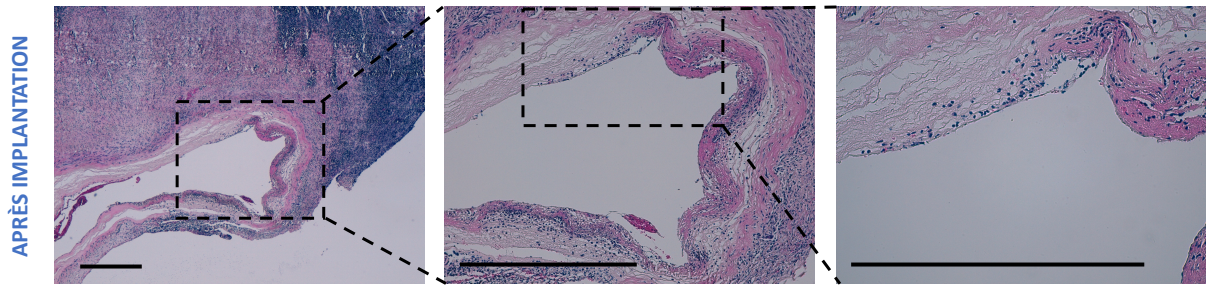


Figure 49. Observation histologique de la paroi vasculaire du substitut après 2 semaines d'implantation fémorale par coloration à l'hématoxyline-éosine. La barre d'échelle correspond à 500 μm .

À la suite de l'échographie Doppler, le greffon a été récupéré et l'animal mis à mort. Sur ce greffon vasculaire après une implantation de 2 semaines, l'analyse histologique par coloration HES nous permet d'observer une lumière ouverte dans laquelle on peut retrouver des globules rouges. On observe également la présence de cellules au sein de la paroi vasculaire, et plus précisément vers la surface luminale. L'on peut également noter la présence d'un tissu inflammatoire aux alentours du substitut vasculaire (Figure 49).

b. Implantation de 7 semaines

À la suite de cette réussite, et afin de poursuivre l'étude *in vivo* nous avons effectué deux implantations de greffon en parallèle sur deux animaux différents, sur une période de 50 jours d'implantation cette fois-ci. Les résultats obtenus pour ces deux animaux étant semblables, je ne vous présenterai ici les résultats obtenus que sur l'un d'eux.

i. Le greffon implanté

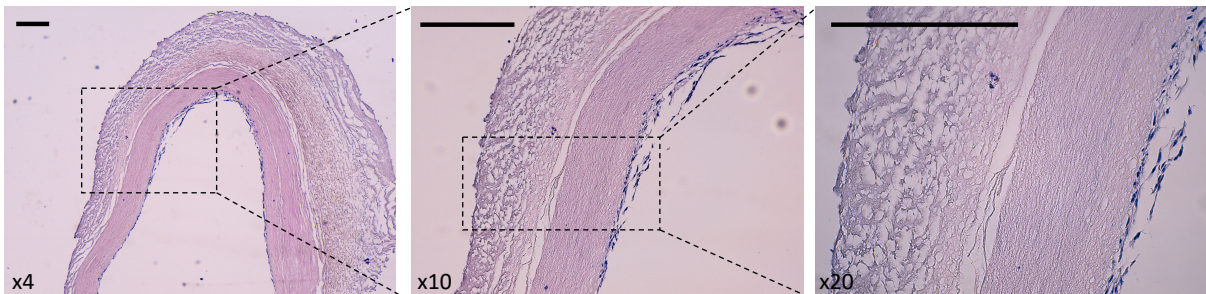


Figure 50. Observation histologique du greffon vasculaire implanté par coloration en hématoxyline-éosine. Montrant la décellularisation complète de la paroi vasculaire ainsi que la présence d'une couche cellulaire à sa surface luminale. La barre d'échelle correspond à 250 μm .

L'analyse histologique de ce greffon avant implantation permet tout d'abord de confirmer qu'aucun noyau n'est encore présent au sein de la paroi vasculaire, validant ainsi le processus de décellularisation de l'artère ombilicale (Figure 50). Nous pouvons également observer sur l'intégralité de la surface luminale et après cisaillement, la présence de cellules déposées et amplifiées, recouvrant la totalité de l'intima, au cours de la production du greffon.

ii. Perméabilité du greffon à l'implantation

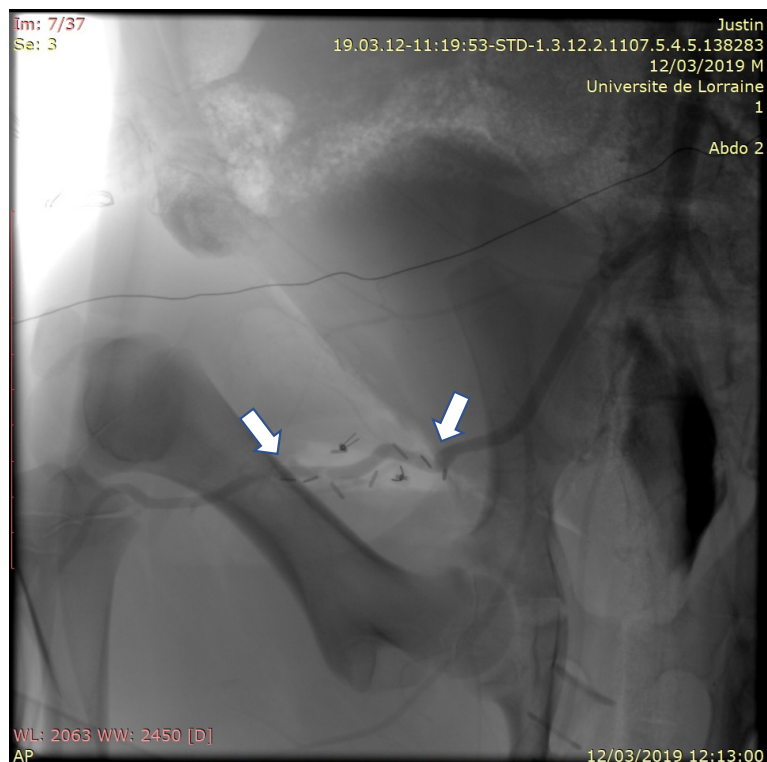


Figure 51. Contrôle de la perméabilité du greffon vasculaire par angiographie post-implantation.

L'extrémités du greffon sont indiquées par les flèches blanches.

À la suite de l'implantation vasculaire du greffon, une angiographie est réalisée afin de confirmer sa bonne intégration dans le système vasculaire de l'animal. Afin de pouvoir repérer le substitut sur les images, des agrafes chirurgicales sont placées dans le tissu environnant la zone de greffe (Figure 51). Nous pouvons ainsi observer le produit de contraste injecté s'écouler au sein du substitut vasculaire implanté confirmant sa perméabilité.

iii. Suivi sanguin des animaux

Au cours de la période d'implantation, des échantillons sanguins ont été prélevés à J0, J2, J7, J9, J13, J17, J21, J25, J28, J30, J35, J39, J46, ainsi que le jour de la mise à

mort de l'animal à J50. Ainsi le suivi de plusieurs données dont le nombre de globules rouges, de globules blancs (dont le pourcentage en lymphocytes et monocytes), ainsi que le nombre de plaquettes ont été monitorées.

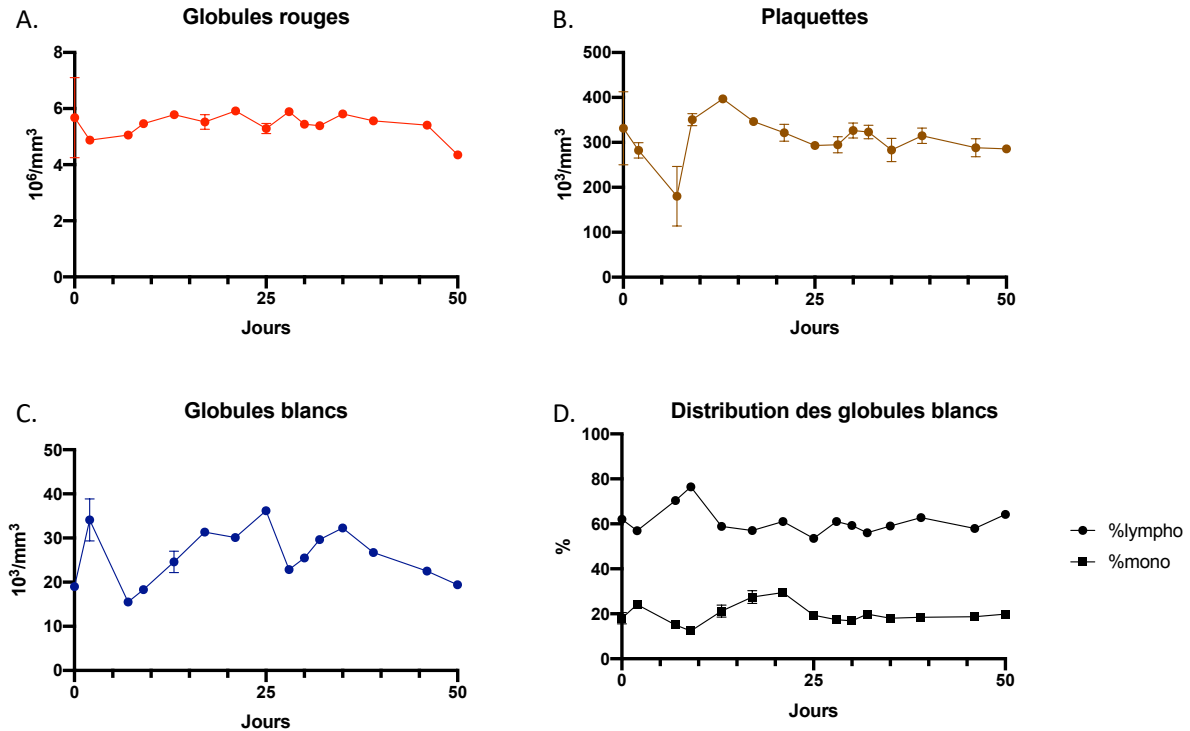


Figure 52. Numération sanguine au cours de la période de greffe vasculaire. (A) Suivi du nombre de globules rouges. (B) Suivi du nombre de plaquettes. (C) Suivi du nombre de globules blancs. (D) Suivi du pourcentage de lymphocytes (lympho) et monocytes (mono) au sein de la population des globules blancs.

Ainsi au cours de l'étude, on peut observer que la valeur obtenue pour la numération des globules rouges reste constante, aux alentours de $5.10^6/\text{mm}^3$ (Figure 52A). Cependant des variations concernant la numération des globules blancs montrent une hausse importante dans les 2 jours après l'implantation, passant de $19.10^3/\text{mm}^3$ à $36,85.10^3/\text{mm}^3$. Ce nombre revient à une valeur inférieure à celle obtenue avant implantation à J7 après quoi, on observe une hausse croissante jusqu'à J28 où le nombre de globules blancs atteint $36,2.10^3/\text{mm}^3$. Cette augmentation est représentative d'une infection qui est à mettre en corrélation avec l'apparition d'un hématome encapsulé localisable à proximité de la cicatrice laissée par l'intervention chirurgicale. Afin de palier à ce phénomène, des antibiotiques (Kesium) ont été administrés par voie orale pendant 5 jours (de J17 à J23) à l'animal, la zone d'encapsulation a également été vidée par ponction et désinfectée. À la suite de cette

épisode infectieux, un retour à la normale du nombre de globules blancs est observé avec une légère remontée entre J30 et J35 (Figure 52C).

Afin de détecter une potentielle réaction immunitaire engendrée par le greffon vasculaire, les taux de lymphocytes et de monocytes parmi la population des globules blancs circulants ont également été suivis au cours de l'implantation. Malgré des variations dans la numération des globules blancs, les taux de lymphocytes et de monocytes restent constants (Figure 52D).

Le suivi du taux de plaquettes dans le sang circulant a également été suivi pendant la période d'étude du greffon *in vivo* (Figure 52B). On observe une légère diminution de ce taux (de $331,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ à $227 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) au cours des sept premiers jours suivant l'implantation. Cette diminution est suivie d'une hausse atteignant $396,7 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ à J11 puis un retour à des valeurs normales jusqu'à la fin de l'implantation à J50.

iv. Suivi de la perméabilité par échographie Doppler

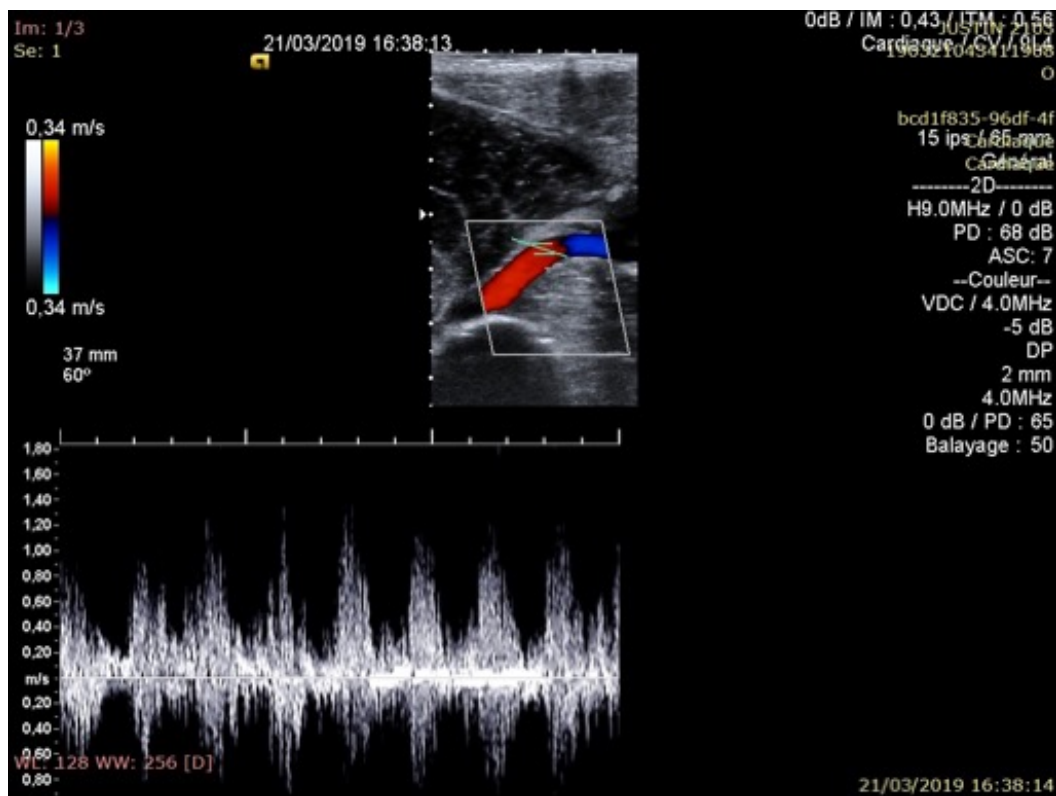


Figure 53. Contrôle de la perméabilité du greffon au cours de la période de greffe (J9) par une méthode non invasive : l'échographie Doppler

Au cours de l'implantation vasculaire, des vérifications de la perméabilité du greffon ont été effectuées à J9, J20 et J33 par échographie Doppler. Neuf jours après l'implantation vasculaire, le signal nous a permis de confirmer la perméabilité du substitut vasculaire, au sein duquel un flux sanguin circulait avec une vitesse maximale aux alentours des 1,30 m/s (Figure 53). Malheureusement, bien que très pratique à mettre en place, et n'amenant que peu de stress à l'animal, cette technique d'imagerie non invasive ne nous a pas permis de visualiser le greffon vasculaire à J20 et J33. Cela pouvait être dû à une zone d'encapsulation visible au niveau de la cicatrice laissée par la chirurgie, rendant la mesure par la sonde plus difficile et par conséquent la recherche en profondeur du greffon plus compliquée. Comme l'observation du comportement de l'animal ne montrait aucun signe de souffrance ni d'anomalie de comportement, ni au repos, ni en mouvement, il a été décidé de poursuivre le suivi post-opératoire jusqu'à la date prévue de mise à mort.

v. Récupération, imagerie et histologie

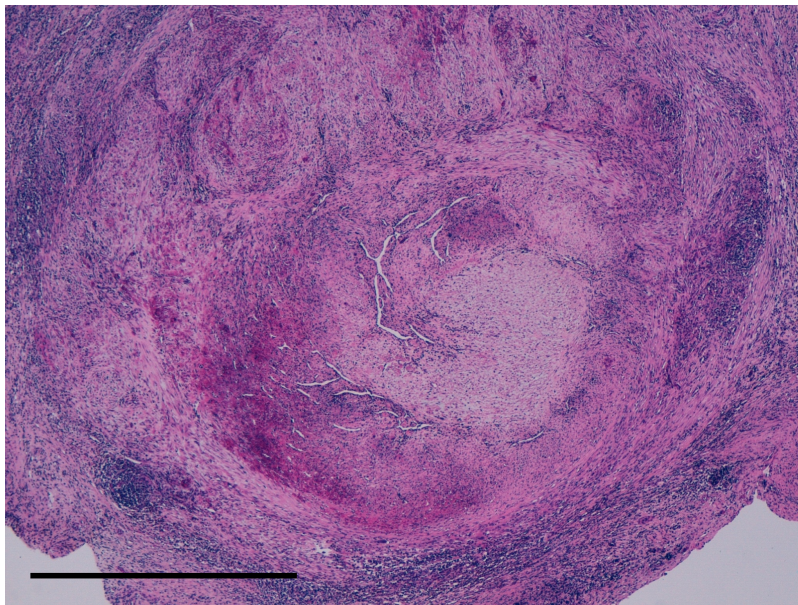


Figure 54. Analyse histologique par coloration en hématoxyline éosine de l'échantillon récupéré après 50 jours de greffe vasculaire. La barre d'échelle correspond à 1 mm.

Avant la mise à mort de l'animal, et après 50 jours d'implantation, nous n'avons pas été capable d'observer la perméabilité du greffon par angiographie. La récupération du greffon confirma une thrombose au sein du substitut, lequel a été récupéré et fixé afin d'établir une étude histologique.

Après fixation de l'échantillon j'ai effectué des colorations hématoxyline-éosine sur différentes coupes situées aux extrémités, ainsi qu'au centre de greffon récupéré. Le résultat obtenu pour chacune de ces coupes sont représentés par le champ présenté ci-dessus (Figure 54). En effet, quelque soit la localisation de la coupe, on peut observer un granulome inflammatoire développé. Il est par ailleurs impossible de distinguer au sein de cette zone la présence de la paroi vasculaire du greffon implanté 50 jours plus tôt.

Les résultats obtenus nous ont poussé à remettre en question le modèle de pontage fémoral et à réfléchir à une nouvelle piste pour l'étude de notre greffon. En effet, la localisation du greffon à proximité d'une masse musculaire assez importante n'est pas idéale, et pourrait expliquer le fait que ce dernier soit soumis à des forces mécaniques conduisant à son écrasement et sa thrombose. Nous nous sommes alors tournés vers un modèle de pontage carotidien permettant de palier à cette problématique.

3. Pontages carotidiens

Trois animaux ont été utilisés dans ce modèle de pontage carotidien sur une durée d'implantation de 6 semaines. Les résultats obtenus étant similaires, je vous présente ici les résultats d'imagerie obtenu pour l'un deux (Cyprien). Je vous présenterai cependant le suivi sanguin des trois animaux sur le même graphique.

a. Perméabilité du greffon à l'implantation

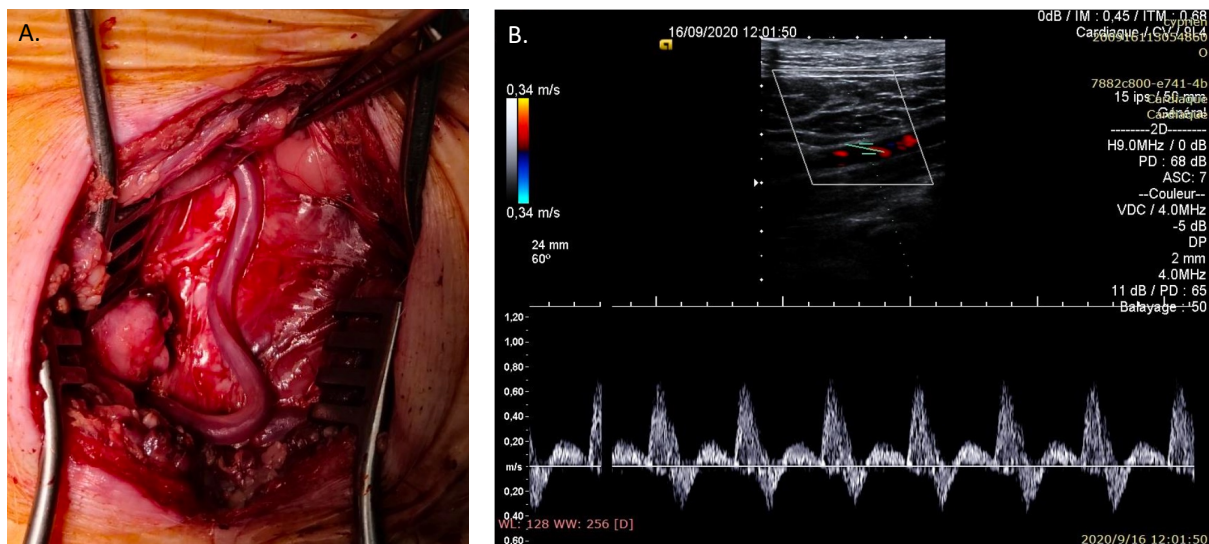


Figure 55. Implantation du greffon vasculaire.

(A) Photographie du pontage effectué. (B) Contrôle de la perméabilité du greffon par échographie Doppler.

Un greffon vasculaire a été préparé et implanté dans le cadre d'un pontage carotidien, sur une longueur de 10 cm (Figure 55A). Une fois intégré, un diamètre interne de 4,1 mm a été observé par échographie Doppler. Cette même technique a permis de valider la perméabilité du substitut après l'opération chirurgicale et indique un flux sanguin d'une vitesse aux environs de 0,70 m/s (Figure 55B).

b. Suivi sanguin des animaux

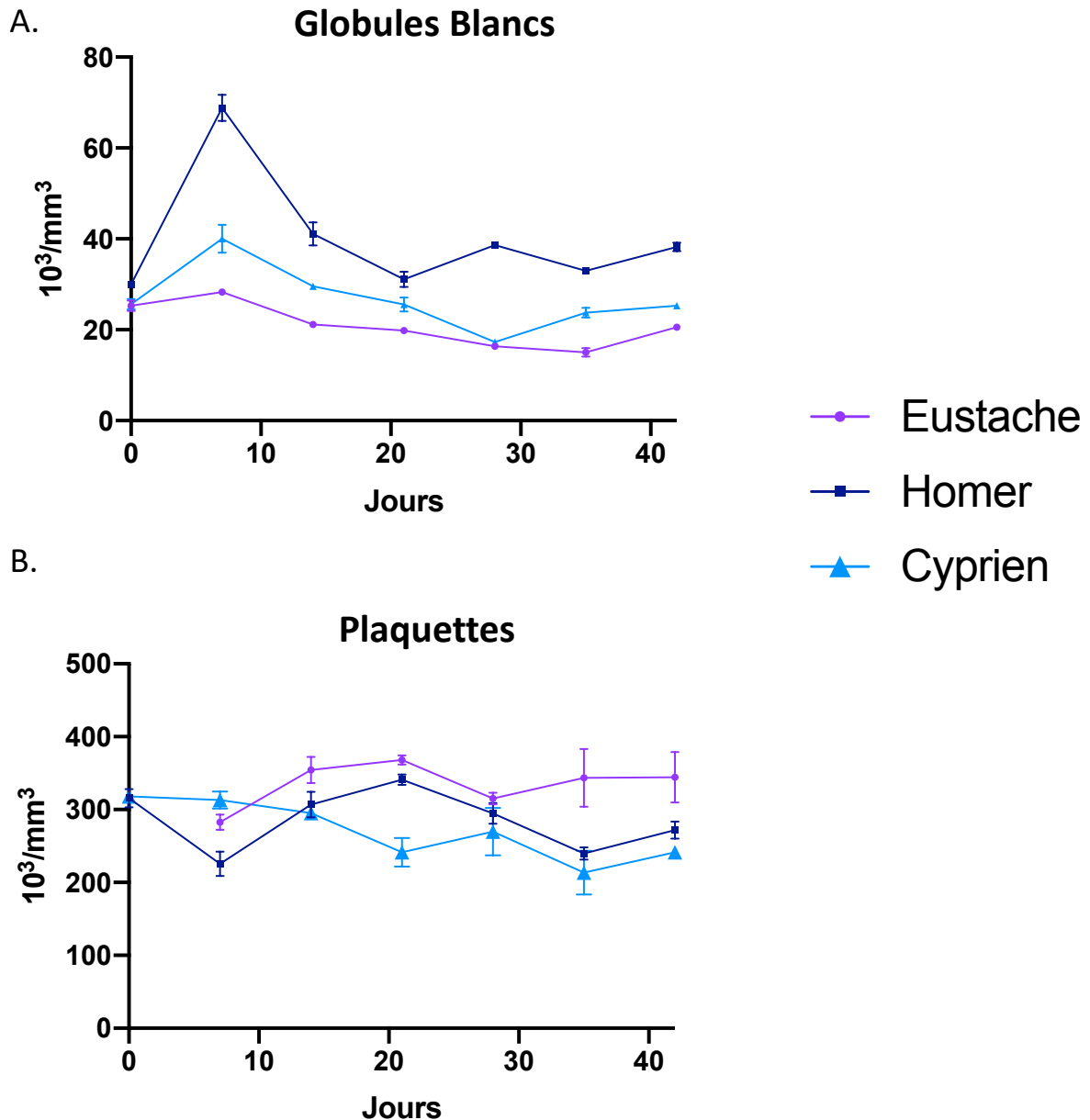


Figure 56. Numération sanguine des animaux implantés selon le modèle de pontage carotide. (A) Suivi du nombre de globules blancs au cours de la période d'implantation. (B) Suivi du nombre de plaquettes au cours de la période d'implantation. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SD des valeurs obtenues en triplicata.

Afin d'observer l'évolution de la composition sanguine des animaux au cours de l'implantation, des prélèvements sanguins ont été effectués et analysés à J0, J7, J14, J21, J28, J35, ainsi qu'au moment de la récupération de greffon à J42. Les analyses présentées ici montrent l'évolution du nombre de globules blancs (Figure 56A) et de plaquettes (Figure 56B) au cours du temps d'implantation. On peut tout d'abord observer la hausse naturelle du taux de globules blancs à la suite de l'opération chirurgicale, à noter que celle observée chez Homer (allant du simple au double) est beaucoup plus importante que celle observée chez les deux autres animaux. À la suite de cette phase, le nombre de globules rouges revient progressivement à des valeurs normales pour les trois animaux. Concernant le nombre de plaquettes sanguines, la valeur retrouvée pour chacun des animaux varie faiblement au cours de l'implantation et restent aux alentours des valeurs normales.

c. Suivi de la perméabilité par échographie Doppler

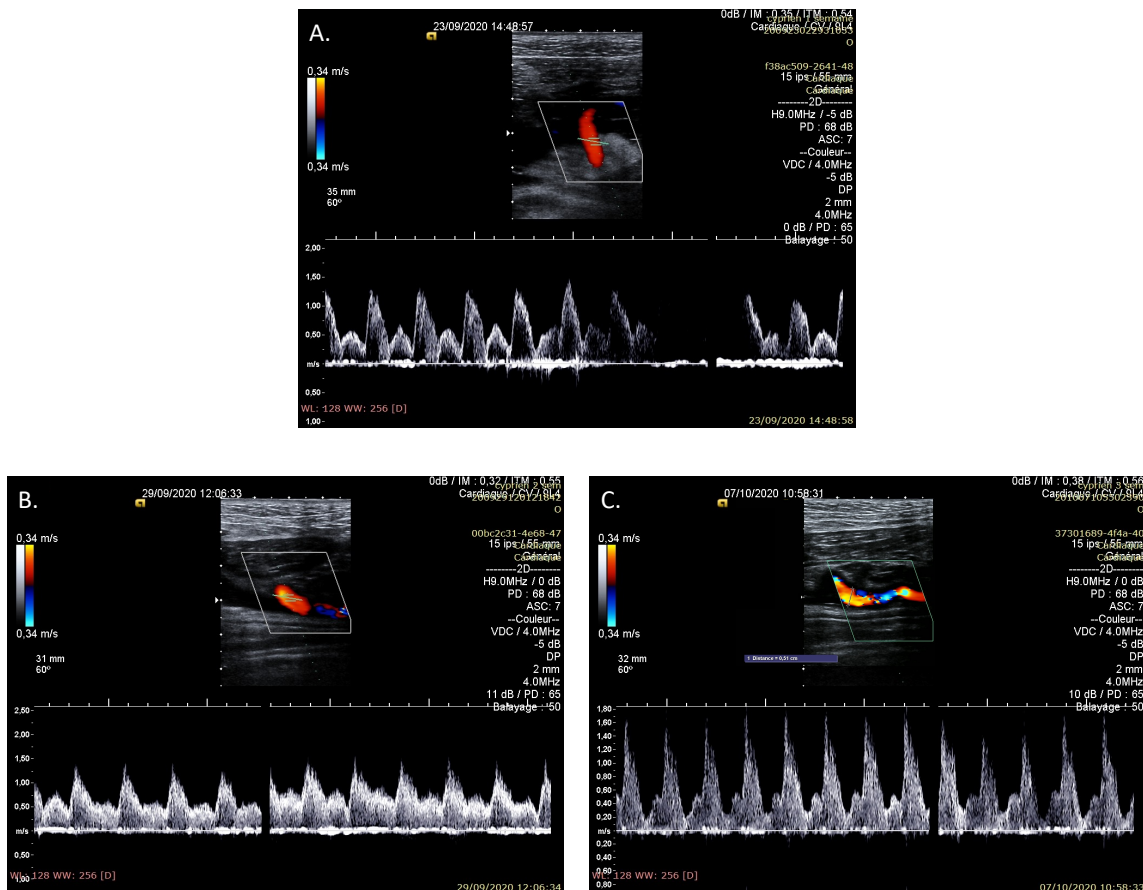


Figure 57. Suivi de la perméabilité de greffon par échographie Doppler. (A) à J7, (B) J14, et (C) J21.

Une fois par semaine, la perméabilité du greffon a été observée par échographie Doppler. Cette perméabilité a pu être confirmée à J7, J14, et J21 (Figure 57) dates auxquelles on peut observer une circulation sanguine au sein du greffon ayant une vitesse de 1,25 m/s ; 1,25 m/s ; et 1,60 m/s respectivement. À J21, le diamètre interne du greffon a pu être déterminé à 0,51 cm (Figure 57C). Cependant à partir de la 4^{ème} semaine, les échographies réalisées à J28 et J35 n'ont pas permis de retrouver le greffon. Le comportement de l'animal n'ayant pas montré de dégradation du comportement, l'étude s'est poursuivie jusqu'à J42, date à laquelle le greffon a été récupéré, et l'animal mis à mort.

d. Récupération, imagerie et histologie

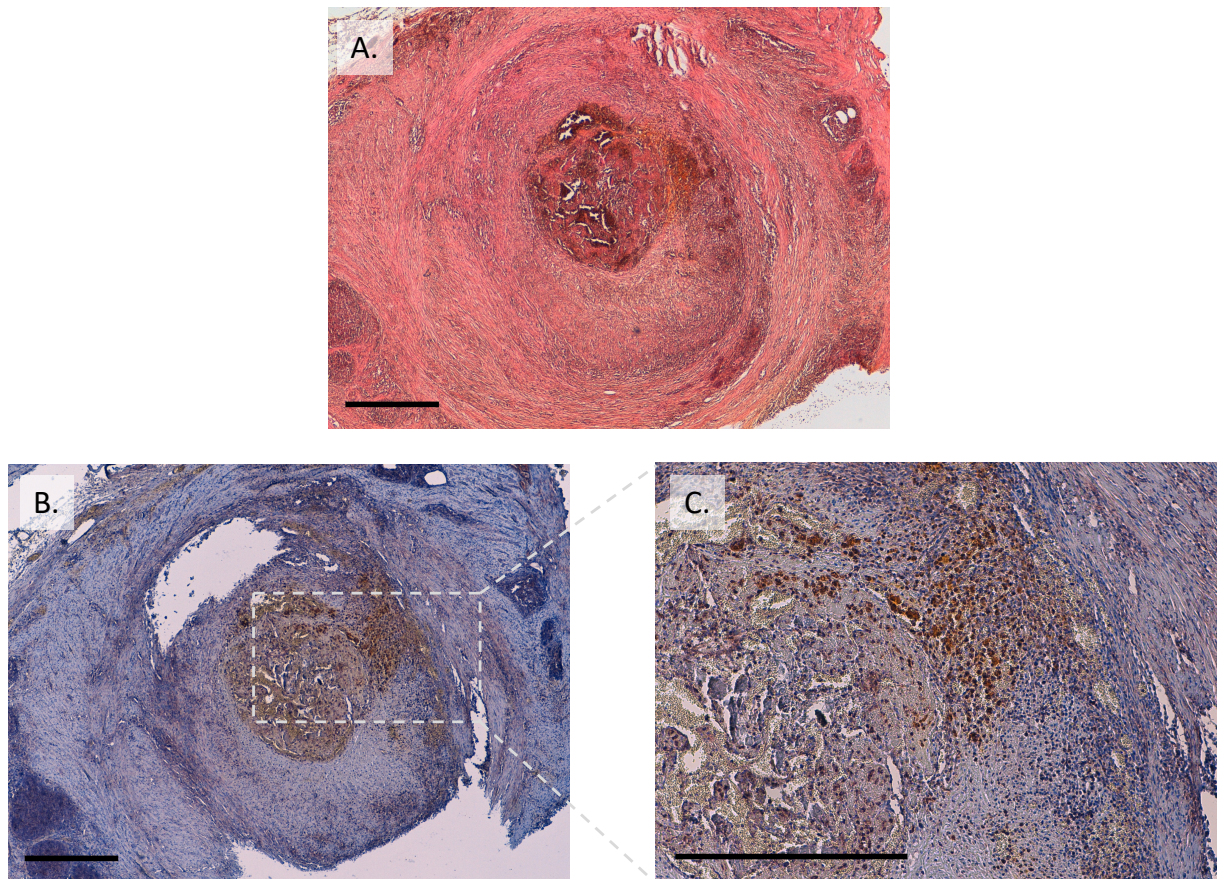


Figure 58. Planche histologique d'un greffon après 6 semaines d'implantation.

(A) Coloration hématoxyline-éosine-safran. (B et C) Immunomarquages des macrophages porcins à faible puis à fort grossissement. La barre d'échelle correspond à 500 μ m.

Après 6 semaines d'implantation en pontage carotidien, une étude histologique des greffons récupérés a été effectuée par coloration HES (Figure 58A) ainsi que par immunomarquage spécifique des macrophages porcins (Figures 58B et C). Les

coupes histologiques colorées en HES montrent un granulome inflammatoire au sein du greffon (Figure 58A). L'immunomarquage ciblant les macrophages porcins, effectué sur ces mêmes échantillons, permet de confirmer la présence importante de ces cellules au sein du granulome (Figures 58B et C).

Discussion et perspectives

I. L'étude de la MEC-GW

A. La caractérisation du biomatériau

Malgré les avancées technologiques dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, la recherche de nouveaux matériaux ainsi que de nouvelles combinaisons pour développer des substituts spécifiques innovants est toujours d'actualité (192). C'est dans ce contexte que nous proposons un nouveau matériau de revêtement, complexe, naturel et cytocompatible dont les propriétés pourraient permettre une synergie avec les cellules déposées ultérieurement. Au cours de mon doctorat, notre démarche scientifique s'est inscrite dans une volonté d'utiliser les CSM-GW pour cellulariser nos greffons vasculaires, cellules présentant un potentiel important dans le cadre d'implantation exogène (165,166). Ainsi, l'utilisation d'un coating issu du même tissu néonatal, la gelée de Wharton, semble être une approche originale pour obtenir une synergie revêtement/cellules.

Notre équipe a déjà décrit et caractérisé une MEC-GW extraite selon une méthode enzymatique (193). Cependant, afin de rapprocher la méthode de production de notre greffon vasculaire aux exigences du grade clinique, cette MEC-GW devait être remplacée par un biomatériau obtenu selon une méthode compatible avec une utilisation clinique. Plusieurs méthodes d'extraction des protéines matricielles ont déjà été décrites dans la littérature, selon des protocoles mécaniques, chimiques ou enzymatiques, afin de récupérer un produit reflétant au mieux le tissu d'origine (194–197). Ainsi la méthode enzymatique a été écartée et nous nous sommes tournés vers une méthode chimique, basée sur la solubilité du collagène dans l'acide acétique à une concentration de 0,5 M, efficace pour l'extraction du collagène (198). Nous décrivons ici une méthode combinant la décellularisation et l'extraction des protéines matricielles présentes dans la GW, connues pour favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire (199).

Dans la littérature, une analyse protéomique de la GW décellularisée a déjà été réalisée et a permis de déterminer que les trois composants principaux de ce tissu sont le collagène, la fibronectine ainsi que le lumican (200).

A l'exception de la fibronectine, ces protéines sont également retrouvées comme composants principaux de notre MEC-GW, validant ainsi l'intérêt que peut porter notre méthode de préparation. Il serait également intéressant d'investiguer la présence de facteurs de croissance (le facteur de croissance "insuline-like", le facteur de croissance fibroblastique et le facteur de croissance transformant bêta notamment) présents dans la GW, au sein même de la MEC-GW issue de notre protocole d'extraction (199). Ces facteurs étant promoteurs de la production de MEC, leur présence au sein d'un coating permettrait d'optimiser la colonisation d'un substitut, par la sécrétion de MEC de la part de cellules déposées par la suite (201–203). De plus, la quantité d'ADN présent au sein de notre MEC-GW étant infime et les résidus inférieurs à 300 paires de bases, son utilisation dans un contexte implantatoire est tout indiquée (204). L'analyse du dépôt obtenu à l'aide de cette nouvelle MEC-GW a permis de mettre en évidence un arrangement particulier des protéines à la surface sous la forme de fibrilles. La MEC-GW étant principalement composée de collagène, nous avançons que c'est cette même protéine qui se retrouve sous cette forme.

Cet arrangement des fibres de collagène formant un réseau de fibres de 20 nm dont la densité est hétérogène, semble être la résultante d'un auto-assemblage particulier des fibres de collagène, différent de celui habituellement décrit dans le cas du collagène. En effet, la structure usuelle obtenue par auto-assemblage de monomère de collagène est décrite comme une triple hélice (205,206). Dans ce cas, l'extraction à l'acide acétique démantèle la triple hélice de collagène permettant l'extraction des monomères de collagène (207). Nous supposons ici que le collagène de la GW, contrairement à l'auto-assemblage du collagène décrit dans la littérature, n'a pas la capacité de reformer la triple hélice. Bien que le collagène soit une protéine qui a été intensivement étudiée depuis longtemps, de nombreuses variations et sous-types de collagène sont encore découverts (208). En particulier, le collagène provenant de tissus fœtaux ou néonataux comme la GW semble présenter des spécificités (209,210). Malgré les recherches dans la littérature, la forme distinctive des fibres de collagène observée dans cette étude n'a pas encore été décrite. Elle pourrait être la conséquence d'une spécificité du collagène présent au sein de la GW.

Bien que présentant une structure non conventionnelle, le collagène et les autres protéines extracellulaires contenues dans notre MEC-GW permettent d'obtenir un dépôt présentant une cytocompatibilité supérieure, dans des conditions de culture de hCSM-GW, à un revêtement classique de collagène, lui-même obtenu par extraction en acide acétique à partir de queue de rat (211). Ainsi, la GW pourrait être une source intarissable de collagène d'origine humaine, à prix compétitif, et ainsi se positionner comme une alternative viable au collagène animal dont la production implique l'exploitation animale.

L'optimisation de la cellularisation dans un contexte de culture de hCSM-GW rend ce coating de MEC-GW intéressant dans la cadre de la fabrication d'un substitut par ingénierie tissulaire. En effet, dans ce contexte, un engouement pour l'utilisation de CSM-GW est observable dans la littérature, devenant des cellules de choix en ingénierie tissulaire en raison de l'absence d'expression du CMH de classe II, ainsi que de leurs propriétés immunomodulatrices sur la réponse inflammatoire (165,166). Il a également été montré que les CSM-GW conservaient ces propriétés après différenciation en cellules endothéliales, ce qui augmente d'autant plus l'attrait pour ces cellules dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire (172,212). En condition réelle d'utilisation dans le protocole de fabrication de notre greffon, l'intégration d'une étape de coating par la MEC-GW au préalable d'une cellularisation par des hCSM-GW permet également d'optimiser celle-ci par une meilleure adhésion cellulaire, réduisant ainsi considérablement le temps nécessaire pour obtenir un recouvrement total de la surface luminale du greffon.

Ainsi, la solution de MEC obtenue permet de réaliser un revêtement de surface 2D aboutissant à un dépôt de fibres protéiques selon la technique du dip coating. Il serait intéressant de poursuivre le travail de caractérisation dans le cas de revêtement par dip coating dans le cadre de matériaux 3D poreux comme dans le cas de notre greffon vasculaire, ou selon différentes méthodes de revêtement telle que le spray coating (pulvérisation), méthode adéquate dans une optique de recouvrement de prothèses (213). D'ailleurs, au cours de ma thèse, j'ai pu effectuer des tests préliminaires de pulvérisation de notre MEC-GW en plaque 12 puits, cependant, les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles. En effet, cette méthode de coating, pour être efficace et reproductible, nécessite un fin contrôle de différents facteurs comme la distance de pulvérisation, la température... L'hétérogénéité de la MEC

pulvérisée peut également être responsable de la non-reproductibilité des résultats observée. Cette complexité technologique trop chronophage pour sa mise au point et une amélioration discutable du protocole de fabrication expliquent l'arrêt de l'exploitation de cette voie.

Bien qu'à l'état physiologique, le collagène possède des propriétés coagulantes jouant un rôle dans l'hémostase et le thrombogénèse (214), une étude a pourtant montré qu'un film de collagène extrait en acide acétique, montre une faible thrombogénicité, l'hypothèse émise étant que cela est dû à l'absence du von Willebrand factor ou à la structure du collagène obtenu (82). Les résultats préliminaires de thrombogénicité effectués sur notre MEC-GW semblent indiquer que le coating obtenu présente une activité anticoagulante. En effet, en rapport de la condition contrôle du plasma utilisé, l'on retrouve une diminution de l'ETP, du pic ainsi que de l'index de vitesse, caractéristiques d'une hypocoagulabilité (215). Ce faible effet coagulant pourrait être le résultat de l'extraction et de dépôt du sulfate de dermatane retrouvé dans la GW et présent dans la décorine. Ce glycosaminoglycane est connu comme régulateur de la coagulation *via* la modulation de l'assemblage de la fibrine (216). De plus, des études complémentaires de notre coating de MEC-GW dans le contexte vasculaire pourraient être intéressantes. L'évaluation du revêtement obtenu sous différentes formes, comme l'hydrogel par exemple, devrait être pertinente. Cela pourrait permettre son utilisation dans d'autres contextes comme dans le cadre de la création d'un scaffold dont la structure 3D pourrait varier en fonction du moule (217). Une autre amélioration d'un tel revêtement consisterait en l'incorporation de nanoparticules fonctionnalisées permettant une libération contrôlée de biomolécules actives.

B. La fonctionnalisation de la MEC-GW

Au cours de ma thèse, l'étude des propriétés de la MEC-GW extraite en acide acétique nous a permis de la percevoir comme un biomatériau utilisable dans le contexte global de l'ingénierie tissulaire. Cette mise en perspective nous a mené à considérer de potentielles fonctionnalisations permettant d'améliorer les propriétés de ce matériel selon le contexte d'application.

Une étude visant à ajouter une composante anticoagulante via l'incorporation d'héparine au sein de la MEC-GW en solution a été effectuée. La fonctionnalisation de

dispositifs médicaux implantables par immobilisation de l'héparine est une méthode efficace et déjà utilisée en clinique. Celle-ci peut être divisée en deux pans : *i*) les technologies à élution qui libèrent l'héparine du dispositif et *ii*) les technologies non à élution destinées à l'immobilisation covalente permanente de l'héparine à la surface du dispositif (218). Dans notre étude, bien que présente et toujours active au sein de la solution, les différents dosages d'héparine active n'ont pas permis de confirmer la présence au sein du dépôt obtenu. L'hypothèse à privilégier semblerait être que l'héparine en solution dans la GW, ne se déposerait pas avec en même temps que les protéines matricielles. Une autre possibilité serait que l'héparine, bien que se déposant, ne serait pas relarguée par la matrice et ne serait donc pas disponible dans le milieu. Ainsi, dans l'éventualité d'une fonctionnalisation de notre MEC-GW par l'héparine, il semblerait pertinent de procéder en deux étapes de coating, l'une visant à déposer la MEC-GW et l'autre dans le but de mobiliser des molécules d'héparine à sa surface. Une autre possibilité serait d'intégrer l'héparine dans la MEC-GW via incorporation préalable au sein de vésicules. Cette méthode est d'autant plus plausible que l'héparine montre une grande affinité avec les vésicules extracellulaires (219,220). Ce procédé, bien que nécessitant plusieurs étapes supplémentaires au cours de la fabrication de la MEC-GW, pourrait permettre de proposer une MEC-GW fonctionnalisée utilisable en une seule étape de dépôt.

Un deuxième travail en cours évalue la faisabilité et l'efficacité de l'incorporation de cytokines anti-inflammatoires de CSM-GW au sein de la MEC-GW. Une étude sur son potentiel chimiotactique devrait être effectuée prochainement par des tests de migration de cellules immunitaires. Bien que, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire, la présence de cellules est capitale afin de permettre la perméabilité du greffon, ce n'est pas le cas dans d'autres domaines de la médecine régénérative. Ainsi l'importance d'une cellularisation par des CSM pourrait être remplacée par l'incorporation de leurs vésicules extracellulaires qui montrent un potentiel comparable en médecine régénérative, notamment en ingénierie du tissu osseux (221–223). Ces mêmes vésicules, à terme, pourraient être incorporées au sein de notre MEC-GW. Cela permettrait d'optimiser notre MEC-GW tout en s'émancipant d'une composante cellulaire dans la préparation du substitut final. En effet en ingénierie tissulaire, la présence de cellules, bien que pouvant par exemple améliorer l'intégration du substitut au sein du tissu de l'hôte, induit des contraintes, voire des inconvénients notamment

concernant la conservation du dispositif cellularisé. Cela complique donc l'alimentation d'une banque de tissus, impliquant par conséquent une fabrication extemporanée du dispositif. À terme, et *via* une fonctionnalisation optimale du coating de MEC-GW, la fabrication d'un greffon vasculaire acellulaire, fonctionnalisé par un coating anticoagulant ainsi que par les vésicules extracellulaires des CSM-GW pourrait être envisagé. Bien qu'il reste beaucoup de chemin à parcourir d'ici là, l'éventualité d'un tel substitut vasculaire pourrait permettre de combiner les propriétés des substituts naturels, avec la possibilité de création d'une banque de stockage. On peut également imaginer la possibilité d'utiliser une forme plutôt que l'autre selon certaines conditions comme par exemple l'urgence du pontage vasculaire.

II. L'étude *in vitro* du greffon vasculaire

Le suivi de l'hémocompatibilité de la paroi vasculaire au cours du protocole a été effectué selon une expérience originale visant à soumettre des tissus au test de génération de thrombine. Les résultats obtenus, montrant des différences significatives d'ETP en fonction des échantillons permettent de valider la pertinence de ce test. Cela est d'autant plus vrai que ces derniers peuvent être expliqués de manière cohérente. En effet, d'après cette expérience, la valeur d'ETP obtenue pour l'artère ombilicale native augmente après l'étape de décellularisation, résultant en la suppression de l'intégralité des cellules de la paroi, notamment les cellules endothéliales jouant un rôle crucial dans l'hémostase, et présentant à leur membrane des facteurs anticoagulants comme les NO, ou encore l'héparan (224). Cette décellularisation induit également la mise à nue de la composante collagénique de la paroi vasculaire, connue pour son rôle dans la coagulation en cas de brèche dans l'intima (214). L'étape de coating ~~quant~~ ~~à elle~~ ne modifie pas cette valeur d'ETP, confirmant ainsi son hypocoagulabilité. Enfin, après recellularisation, le greffon retrouve une valeur d'ETP comparable à celle retrouvée pour l'artère ombilicale native. Même si cette approche d'hémocompatibilité ne tient pas compte de tous les critères physiologiques difficiles à reproduire, ces résultats semblent prédire que le comportement de notre greffon est comparable à un vaisseau sanguin natif en termes d'hémocompatibilité, sans doute du fait du recouvrement de la composante collagénique par les CSM-GW.

Étudier les propriétés mécaniques d'un substitut vasculaire peut s'avérer très informatif quant à ses potentielles utilisations cliniques. En effet, comme au sein du corps humain où différents types d'artères sont retrouvés selon leur proximité avec le cœur, nous pouvons penser que différentes propriétés mécaniques sont à privilégier selon le contexte clinique.

En termes de caractéristiques mécaniques, les études effectuées permettent de déceler une diminution significative du Module de Young induite par l'étape de décellularisation. Bien qu'il existe différents protocoles de décellularisation, une étude effectuée dans notre équipe a montré que celui appliqué dans le cadre du protocole de fabrication de notre greffon, permet la meilleure décellularisation du tissu avec une conservation de l'intégrité de la paroi vasculaire. Cette diminution du module de Young reflète une augmentation de l'élasticité du greffon. Cette différence de module entre l'artère ombilicale native et le greffon est uniquement due à l'augmentation de la déformation longitudinale à la rupture, tandis que la valeur de contrainte à la rupture reste inchangée. Ainsi, bien que des tests de résistance à la suture devraient être effectués prochainement, l'augmentation de l'élasticité du dispositif implantable semble tendre vers une facilitation de l'acte chirurgical d'implantation ainsi qu'en une résistance à la déformation sous flux pulsatile (225). Une évaluation sommaire de la variation de la pression à l'éclatement comparant l'artère ombilicale avant et après décellularisation ne permet pas d'observer de différence entre les deux conditions puisque chacun des échantillons a supporté la pression maximale applicable au laboratoire. Bien que le matériel utilisé au cours de cette expérience ne permette pas de tester des valeurs de pression supérieures à 350 mmHg, cette valeur limite est déjà bien supérieure à celle que nous pouvons retrouver dans un contexte vasculaire pathologique. Cette étude permet donc de confirmer le potentiel de notre greffon à résister à la pression artérielle maximale retrouvée en conditions physiologiques (132), ainsi que dans le cas d'un accès artérioveineux établi pour la dialyse montrant une pression sanguine n'excédant pas 200 mmHg (226,227).

Afin de nous affranchir de la limitation de l'appareil utilisé et d'obtenir un élément de réponse sur l'impact de la décellularisation de l'artère ombilicale sur sa capacité à supporter une pression interne, une étude a été effectuée à partir d'artères porcines (aortes abdominales et artères carotides) par une équipe italienne (228). Cette étude évalue les propriétés mécaniques des artères porcines avant et après un protocole de

décellularisation impliquant l'utilisation de sodium deoxycholate, un détergent ionique montrant une efficacité similaire au SDS dans un contexte de production de substitut décellularisé (229). Au cours de cette étude, l'étape de décellularisation n'a pas montré avoir d'impact sur la pression à l'éclatement avec des valeurs moyennes de 2331 mmHg pour les artères natives contre 2508 mmHg après décellularisation. L'artère ombilicale humaine plus précisément, a déjà fait l'objet d'une étude caractérisant la valeur maximale de pression interne supportée, et montre un éclatement pour une pression de 969.66 ± 154.42 mmHg (178). Ces deux études apportent un élément de réponse sur la pression interne maximale supportée par notre greffon, bien que l'étude effectuée au cours de ma thèse permette de confirmer sa résistance à la pression maximale retrouvée en conditions physiologiques. L'intérêt de la décellularisation d'un greffon vasculaire de petit diamètre n'est plus à argumenter, cependant le choix du scaffold dans la production d'un tel substitut est encore discuté. Dans le cas d'un scaffold naturel comme une artère native, une étape de décellularisation est nécessaire, cependant l'impact de celle-ci sur les propriétés mécaniques du greffon n'est pas négligeable. Cet impact a déjà fait l'objet d'études mais les conclusions varient selon la méthode de décellularisation, mais également en fonction des techniques de l'étude. En effet Williams *et al.* ont comparé les propriétés mécaniques d'artère carotide de lapin avant et après décellularisation, et met en exergue une diminution de l'extensibilité, ainsi qu'une augmentation du module de Young (230). La contradiction entre ces résultats et ceux obtenus au cours de mon doctorat peut s'expliquer par la différence de protocole de décellularisation appliqué. En effet au cours de mon étude la décellularisation a été effectuée à l'aide de SDS 0,5 % tandis que Williams *et al.* utilisent la trypsine combinée au Triton X100. L'impact de ces deux types de détergents sur les propriétés mécaniques des fibres de collagène a été étudié par HWang *et al.* (231). Il a été démontré que le Triton, comme le SDS (1 %) sont capables de démêler la triple hélice d'une molécule de collagène, tandis que d'autres détergents connus (e.g. CHAPS, SD) n'y parviennent pas, même lorsque leurs concentrations sont doublées par rapport aux conditions courantes de décellularisation. Bien que cette étude utilise le SDS à une concentration de 1 % (contre 0,5 % dans notre protocole de décellularisation), la désorganisation du réseau de fibres de collagène observée devrait supposément résulter en l'augmentation de l'élasticité du tissu, reflétant les résultats obtenus au cours de notre étude.

Ainsi les différences d'impact observées sur les propriétés mécaniques pourraient également incomber à la nature de l'artère étudiée. En effet, il existe deux types d'artères, musculaire ou élastique, différenciées par la proportion de fibre de collagène et de fibres élastiques présentes au sein de leur paroi (19). De ce fait, la décellularisation d'une artère musculaire telle que l'artère carotide, dont la composition est en faveur des fibres de collagène par rapport aux fibres élastiques pourrait impacter différemment les propriétés mécaniques du vaisseau. En plus de l'impact de la décellularisation sur les fibres de collagène, un tel protocole visant à éliminer les cellules présentes au sein du tissu, pourrait modifier les propriétés mécaniques ; il n'est donc pas contre intuitif que, comme le montre mon étude, cela induise une diminution du module de Young ainsi qu'une augmentation de la déformation longitudinale à la rupture. En effet, à l'état natif, les cellules présentes dans le tissu forment un réseau soudé par les jonctions cellulaires. Ainsi les cellules peuvent être considérées comme des "renforts" au sein d'un matériau, jouant un rôle dans la rigidité globale du matériau, et ici du tissu. Ainsi après décellularisation, ces jonctions, ces renforts ayant été éliminés, le tissu gagne en élasticité et son module de Young se voit donc diminué.

L'approche de fabrication de notre greffon est basée sur une méthode originale de retournement vasculaire, dont l'impact sur l'intégrité de la paroi vasculaire n'a jamais fait l'objet d'étude. Bien que d'une extrême efficacité pour faciliter et optimiser la modification de la surface luminale artérielle, zone critique dans l'ingénierie tissulaire vasculaire, cette méthode repose sur une déformation transitoire de l'échafaudage, mais pour le moins impressionnante, qui pourrait impacter sa solidité. Les résultats d'étirement à la rupture, de DMA, ainsi que de pression à l'éclatement obtenus au cours de ma thèse permettent de souligner le caractère anodin de cette approche, rendant d'autant plus intéressante son utilisation. Il est à noter que le retournement peut s'avérer plus délicat à appliquer dans le cas d'artères possédant des collatérales.

Les propriétés mécaniques de notre greffon confirmant sa compatibilité avec une intégration dans un contexte vasculaire, ce dernier a pu faire l'objet d'une étude *in vivo*.

III. L'étude *in vivo* du greffon vasculaire

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à l'évaluation *in vivo* consistant en la mise en place de notre greffon vasculaire de petit diamètre chez l'animal en collaboration avec l'équipe de chirurgiens cardio-vasculaires du CHRU ainsi qu'avec l'École de Chirurgie de Nancy. Ce greffon est le résultat d'une réflexion visant à proposer un substitut vasculaire de petit diamètre utilisable dans le contexte chirurgical de pontage coronaire assisté par un robot (232). Notre greffon est naturel, d'origine humaine et ses composants sont exclusivement issus du cordon ombilical humain.

L'étude *in vivo* réalisée au cours de ma thèse est déclinée en trois parties distinctes, résultant d'une réflexion mûrie et nourrie par les différents résultats obtenus. En effet, la première phase a été menée dans le but d'obtenir une preuve de concept. De par la position du cœur chez l'animal, le pontage coronaire direct montre une difficulté accrue, impactant directement la chance de survie de l'animal à l'opération. Ainsi la première partie de l'étude a consisté en des pontages mammo-coronaire, permettant une meilleure survie tout en reflétant le contexte clinique du pontage coronarien. Ceux-ci ont permis de valider la capacité du greffon vasculaire à perfuser convenablement le cœur de l'animal. Cependant, ces opérations nécessitent une sternotomie, protocole compliquant considérablement le suivi post-opératoire, ainsi que le bien-être de l'animal quadrupède. Ainsi, afin de pouvoir effectuer des implantations suivies sur une période d'étude importante, nous nous sommes dirigés vers une intégration au niveau de l'artère fémorale reflétant le contexte de pontage de vaisseaux périphériques. Bien que dans ce contexte, un greffon ait été retrouvé perméable après 14 jours d'implantation, les deux autres greffons implantés sur une période de 50 jours n'ont pas montré les résultats escomptés. Cet arrêt de la perméabilité vasculaire, aboutissant à des granulomes tardifs, nous ont amené à repenser l'étude, et notamment le site d'implantation. En effet, le site d'implantation en fémoral montre de puissantes contraintes musculaires appliquées au greffon notamment dans un modèle quadrupède. Notre greffon, étant dépourvu de média, et ayant été réfléchi pour répondre au contexte retrouvé au niveau des coronaires, ne semblait pas convenir à une implantation fémorale. Ainsi, après réflexion, le modèle d'implantation a été remplacé par un pontage au niveau de l'artère carotide. Celui ne présentant pas ou

peu de contraintes musculaires et d'accès facile, permettrait de nous exempter de cette particularité.

En définitive, tous les greffons implantés, quel que soit le site d'implantation, ont été retrouvés thrombosés, au mieux après 6 semaines d'implantation. Le seul greffon resté perméable jusqu'à récupération, est celui implanté pour une période de 2 semaines. Une hypothèse serait que la perméabilité vasculaire est maintenue au cours de l'implantation par le traitement au Lovenox mais que l'arrêt de ce traitement laisse place au développement d'une thrombose au niveau de la paroi vasculaire du greffon. Cette hypothèse pourrait être appuyée par la présence de granulomes inflammatoires retrouvés sur les coupes histologiques des greffons implantés sur une période de 6 semaines. En clinique et selon les recommandations de bonnes pratiques de la Haute Autorité de Santé, les patients ayant eu recours à un pontage vasculaire (à la suite d'un syndrome coronarien aigu) sont placés sous bithérapie, un traitement antiagrégant plaquettaire composé d'aspirine à 75-160 mg/j associée à du prasurigel ou du ticagrelor, pour une période d'un an (233). Dans notre protocole d'étude, bien que l'animal soit traité par du Kardegic sur l'intégralité de la période d'implantation, l'association du Lovenox ne s'est effectuée qu'au cours des 10 premiers jours de l'étude. La prolongation de cette association Kardegic + Lovenox aurait pu permettre de maintenir la perméabilité vasculaire au cours de l'étude. D'autant plus que le modèle porcin est connu pour montrer une hypercoagulabilité exacerbée (143,146). Ce traitement conjugué devrait être appliqué au cours des études *in vivo* qui se dérouleront sous le contrat de l'ANR.

Pour revenir sur nos résultats, l'étude *in vivo* menée au cours de ma thèse fait suite au travail préliminaire effectué chez le modèle animal lagomorphe. Au cours de ce dernier, le greffon implanté en position carotide est resté perméable au cours d'une période d'implantation de 21 jours (data non publiées), période supposément non atteinte au cours de l'étude effectuée chez le modèle porcin. Ceci pourrait également être expliqué par ce contexte d'hypercoagulabilité rencontré chez ce modèle.

En effet, la durée de perméabilité de notre greffon n'a pas pu être définie précisément. Bien que pratique, rapide et n'induisant pas d'acte invasif pour l'animal, le suivi de la perméabilité vasculaire par échographie a montré des failles ne permettant ni d'affirmer ou d'infirmer une sténose vasculaire, ni de déterminer la date d'arrêt de la

perméabilité du greffon au cours de la période d'implantation. En effet, bien qu'au cours des 2 premières semaines d'implantation, cette méthode permettait facilement de retrouver et de visualiser le flux sanguin circulant au sein du greffon, à partir de la 3ème semaine, ces mêmes observations se voyaient plus compliquées à établir, étaient de plus en plus évasives, et ne permettaient pas d'identifier avec certitude le vaisseau observé comme étant le greffon. Le choix de cette technique d'imagerie plutôt que l'angiographie permettait d'alléger le protocole de l'étude afin de maximiser le bien-être animal. En effet, la mise en place d'angiographies hebdomadaires nécessite à chaque fois une sédation, manipulation extrêmement stressante pour l'animal. Cette constatation devra amener à une évolution des moyens de suivi de la perméabilité du greffon pour les prochaines évaluations chez l'animal.

Bien que l'évaluation préliminaire de notre greffon en conditions *in vivo* n'ai pas donné les résultats attendus, de nombreuses améliorations ont d'ores et déjà été réfléchies au sein de l'équipe afin de proposer une solution répondant au besoin clinique de substituts vasculaires de petit diamètre. La potentielle fonctionnalisation de la MEC-GW appliquée comme coating pourrait s'avérer être une réponse permettant de maintenir la perméabilité du greffon à la suite de la 2^{ème} semaine. Cela pourrait également être possible par le maintien, sur la période d'implantation, de l'association du Kardegic et du Lovenox, reflétant le traitement prescrit aux patients et pouvant permettre de contrebalancer le contexte d'hypercoagulabilité du modèle porcin. Ces propositions pourront être mises en place au cours de la prochaine étude *in vivo* ayant réussi à entraîner l'obtention d'un contrat ANR en 2021.

La récupération d'un greffon vasculaire resté perméable après une période de deux semaines en position fémorale, ne nous permet pas de définir le devenir des hCSM-GW. En effet, bien que l'analyse histologie par coloration HE ait permis de localiser des cellules au sein de la paroi vasculaire du greffon, pourtant complètement décellularisée, leur identité n'a pas pu être déterminée. Le génome porcin montrant une forte homologie avec celui de l'Homme, la greffe chez cet animal présente un inconvénient majeur quant à la possibilité de différencier les cellules de l'animal et celles d'origine humaines ayant été implantées. Ainsi, post-greffe, bien que des cellules soient observées au sein de la paroi vasculaire, il nous est, à l'heure actuelle, impossible de déterminer si ce sont les hCSM-GW ayant migré de la surface luminale vers la paroi vasculaire ou ayant proliféré et/ou étant différenciés, ou si ces cellules

sont le reflet d'une colonisation du greffon par les cellules de l'hôte. Afin de contourner cette difficulté, la méthode de l'hybridation *in situ* pourrait être mise en place comme l'a déjà fait une équipe américaine (234). En effet, l'étude *in vivo* s'effectuant chez des animaux de sexe mâle, pour des raisons hormonales entre autres, il serait judicieux de n'utiliser que des hCSM-GW, provenant de cordons ombilicaux de nourrissons de sexe féminin dont le génome ne comporte pas de chromosome Y, pour recellulariser le greffon au cours de sa construction. Ainsi, post-implantation, les cellules porcines pourraient être différenciées à la base de la présence ou l'absence de ce chromosome. À noter que, même si cette technique ne permettrait pas un marquage systématique des cellules porcines, il serait tout de même plus aisé de déterminer le devenir des cellules implantées.

Conclusion

Dans cette étude, différents lots MEC-GW ont été analysés séparément afin de caractériser ce nouveau biomatériau d'origine humaine et récupéré d'une manière non invasive, très peu onéreuses, et dont la méthode d'extraction correspond à des critères d'utilisation dans un contexte clinique. Pour limiter une potentielle hétérogénéité inhérente au produit naturel et d'origine humaine, nous avons choisi de produire chaque lot de MEC-GW par extraction des protéines matricielles à partir de GW provenant de 3 différents cordons ombilicaux. Ce procédé simple et rapide peut être adapté pour une fabrication à plus grande échelle, en augmentant le nombre de GW mélangés à la base, ceci permettrait d'améliorer encore l'homogénéité du produit final obtenu.

Cette étude se concentre sur l'évaluation de la MEC-GW de cordon humain en tant que biomatériau et met en évidence certaines propriétés idéales de cette matrice pour une utilisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en général. Tout d'abord, celle-ci ne contient qu'une négligeable quantité d'ADN permettant ainsi son utilisation dans un dispositif à but implantatoire sans risque de réaction immunitaire en réponse à l'insertion d'ADN étranger. Nous avons également pu analyser son contenu protéique, indiquant sa haute teneur en collagène humain de type I, revêtement de choix, déjà largement utilisé pour la culture cellulaire mais aussi en ingénierie tissulaire (235,236). Bien que le collagène soit le composant majoritaire, on retrouve également au sein de la matrice obtenue d'autres protéines dont divers protéoglycanes connus pour favoriser l'adhésion ainsi que la prolifération cellulaire, notamment le lumican (237,238).

Le dépôt de la MEC-GW obtenu en conditions plastique ou verre se présente sous la forme d'un réseau plus ou moins dense de fibres éparpillées sur la surface coatée. Ces fibres d'une épaisseur d'environ 20 nm sont la résultante d'un auto-assemblage hélicoïdal de fibres plus fines étant probablement des fibres de collagènes. Ce dépôt présente des résultats de cytocompatibilité comparables à ceux du collagène de culture, lui-même issu d'une extraction en acide acétique à partir de queue de rat (211). Différents types de collagène sont d'ailleurs disponibles à l'achat mais proviennent de sources bovines.

De plus, le dépôt de la MEC-GW favorise la prolifération cellulaire des CSM-GW, cellules de choix en ingénierie tissulaire en raison de leurs immunoprivilège ainsi que de leurs propriétés immunomodulatrices sur la réponse inflammatoire (165,166). Il a également été montré que les CSM-GW conservaient ces propriétés après différenciation en cellules endothéliales, ce qui augmente d'autant plus l'attrait pour ces cellules dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire (212).

Bien que partant d'un matériel humain et potentiellement hétérogène, les différents MEC-GW produites et caractérisées au cours de cette étude ne présentent pas de différences significatives dans leur composition protéique globale. Les différences entre les lots se situent principalement au niveau de leur concentration en albumine sérique. Une hétérogénéité quant à la densité des fibres présentes sous la forme de dépôt peut également être notée. Le dépôt montrant la plus grande densité de fibres étant celui obtenu par coating du lot C de MEC-GW, nous pouvons cependant suggérer que la densité des fibres observées par épifluorescence et microscopie confocale est corrélée avec la concentration en collagène retrouvée dans chacun des lots de MEC-GW. Cependant, cette différence dans la densité du revêtement n'implique pas de différences dans l'étude de cytocompatibilité.

De plus, l'analyse AFM nous a permis d'observer la structure des fibres présentes dans le coating de la MEC-GW. Ces fibres, bien que disposées de manière arbitraire, possèdent la même forme structurelle. En effet, elles semblent être le résultat de l'imbrication de plusieurs longues fibres protéiques, probablement de collagène, sur lesquelles sont logées des protéines plus petites. Bien qu'atypique, cette conformation semble permettre des interactions entre les protéines de la membrane cellulaire et celles déposées à la surface. Ces interactions semblent permettre au revêtement de MEC-GW de présenter des propriétés bioactives dont une étude plus précise mériterait d'être menée.

En conclusion, cette MEC extraite de cordon ombilical humain montre des résultats prometteurs pour une application en culture cellulaire ou en ingénierie tissulaire. En effet, ce revêtement d'origine humaine est composé d'un mélange complexe de protéines matricielles utiles à l'adhésion et à la prolifération cellulaire. Sa production est facile, se déroule sur une période de 24 heures à partir de matériel récupéré de manière non invasive. Le dépôt obtenu est non cytotoxique, et montre une optimisation

de la cellularisation à l'aide de CSM-GW, cellules présentant de réels avantages dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Bien que le dépôt décrit ici soit sous forme de fibres déposées, la solution de MEC étant liquide, elle peut être appliquée par dip coating, spin coating ou par spray coating, permettant d'homogénéiser davantage le dépôt obtenu (118). Toutes ces caractéristiques font de cette MEC-GW un revêtement biomimétique de choix en ingénierie tissulaire, mais également dans le contexte particulier de l'ingénierie tissulaire vasculaire comme peuvent l'indiquer les résultats de thrombogénicité observés.

Cette MEC-GW est amenée à évoluer vers un coating fonctionnalisé selon le contexte de l'ingénierie dans lequel il est utilisé. Pour cela, des études visant à implémenter une fonction anti-coagulante, ou encore une fonction immunomodulatrice ont été débutées. En plus d'une application directe, ces études sont un premier pas dans une direction pouvant permettre à terme de nous affranchir de l'utilisation de cellules vivantes dans les substituts d'ingénierie tissulaire, permettant ainsi de s'émanciper des problématiques de stockage notamment, tout en conservant la composante cellulaire importante pour l'intégration du substitut chez le patient.

L'étude visant à caractériser notre greffon vasculaire quant à elle a permis de déterminer l'impact de l'étape de décellularisation sur les propriétés mécaniques de l'artère ombilicale. Synthétiquement, celle-ci implique une augmentation de l'élasticité de l'artère ombilicale, sans impacter ni sa résistance à la pression interne, ni sa contrainte à la rupture. L'originalité d'une étape de retournement du vaisseau sanguin, en plus de faciliter l'accès à la surface luminale de l'artère, ne montre pas avoir d'impact sur les propriétés mécaniques de l'artère, en faisant ainsi une technique de choix dans la fabrication d'un substitut vasculaire.

Au cours de ma thèse j'ai pu mener une étude préliminaire *in vivo* évaluant le greffon vasculaire de petit diamètre, produit par notre équipe à partir de matériel humain, naturel, et provenant exclusivement du cordon ombilical humain. Celui-ci, a été pensé pour répondre au besoin d'un substitut vasculaire de petit diamètre dans le contexte de pontage chez l'adulte mais pourrait également à terme être utilisé dans le cadre de shunt artérioveineux. Étant complètement naturel, son intégration et sa colonisation par les cellules hôte permettraient son remodelage, et ainsi une potentielle croissance, pouvant correspondre à une utilisation dans un contexte pédiatrique. L'évaluation

préliminaire de notre greffon a permis d'observer la perméabilité d'un substitut après 2 semaines d'implantation en position fémorale. Cependant, au-delà de cette période, et quel que soit le site d'implantation, tous les greffons ont été retrouvés thrombosés. Malgré ces résultats, cette étude a permis d'ajuster, et d'optimiser les conditions d'évaluations du substitut. Ces avancées ont donné lieu à l'obtention d'un financement de l'ANR.

A termes, notre greffon SMILING pourrait être utile dans plusieurs conditions cliniques nécessitant des substituts vasculaires de petit calibre efficaces et brevetés. Le greffon non immunogène proposé dans ce projet éviterait l'utilisation d'approches traumatiques et invasives nécessaires au prélèvement de vaisseaux autologues. De plus, son utilisation pourrait s'effectuer dans le cadre d'une implantation par approche mini-invasive, ce qui réduisant de manière significative la morbidité et la mortalité post-opératoires, et diminuant considérablement la douleur induite par la chirurgie, l'utilisation d'analgésiques puissants, le séjour à l'hôpital (accélérant la récupération post-opératoire et permettant un retour rapide à la vie active) ainsi que le coût des services de soins post-opératoires. Un patient sur cinq subit un stress post-traumatique et le risque de suicide s'en voit multiplié par quatre. Un rétablissement plus rapide a donc un effet bénéfique important sur la qualité de vie du patient et un impact majeur en termes d'économie. De plus, les cordons ombilicaux fournissant l'ensemble des matières premières de nos greffons sont une source quasi inépuisable, disponible en grande quantité (758 000 nouveau-nés en France, 2018) et à faible coût de fabrication (par rapport aux prothèses vasculaires du marché).

Bibliographie

1. Fowkes FGR, Aboyans V, Fowkes FJI, McDermott MM, Sampson UKA, Criqui MH. Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(3):156-70.
2. Maladies cardiovasculaires : une facture de 15 milliards d'euros par an en France [Internet]. www.pourquoidocteur.fr. [cité 10 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.pourquoidocteur.fr/Articles/Question-d-actu/16252-Maladies-cardiovasculaires-une-facture-de-15-milliards-d-euros-par-an-en-France>
3. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res.* juill 2015;46(5):408-26.
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):317-25.
5. Athérosclérose · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 6 août 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/atherosclerose/>
6. Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *J Geriatr Cardiol.* sept 2012;9(3):305-17.
7. Leung TW, Wabnitz AM, Miao Z, Chimowitz MI. Angioplasty and Stenting. *Front Neurol Neurosci.* 2016;40:152-63.
8. Nicolais C, Lakhter V, Virk HUH, Sardar P, Bavishi C, O'Murchu B, et al. Therapeutic Options for In-Stent Restenosis. *Curr Cardiol Rep.* 12 2018;20(2):7.
9. Nicolini F, Vezzani A, Romano G, Carino D, Ricci M, Chicco MVD, et al. Coronary Artery Bypass Grafting with Arterial Conduits in the Elderly. *Int Heart J.* 21 oct 2017;58(5):647-53.
10. Walpoth BH, Bowlin GL. The daunting quest for a small diameter vascular graft. *Expert Review of Medical Devices.* 1 nov 2005;2(6):647-51.
11. Desai M, Seifalian AM, Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 1 août 2011;40(2):394-8.
12. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of

prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* juill 2005;74(1):570-81.

13. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 1 févr 2016;22(1):68-100.

14. Bordenave L, Menu P, Baquey C. Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes. *Expert Rev Med Devices.* mai 2008;5(3):337-47.

15. Baguneid MS, Seifalian AM, Salacinski HJ, Murray D, Hamilton G, Walker MG. Tissue engineering of blood vessels. *Br J Surg.* mars 2006;93(3):282-90.

16. West JB. Ibn al-Nafis, the pulmonary circulation, and the Islamic Golden Age. *J Appl Physiol* (1985). déc 2008;105(6):1877-80.

17. Des vaisseaux sanguins adaptés pour un système immunitaire opérationnel | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [Internet]. [cité 18 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.fondation-arc.org/actualites/2019/des-vasseaux-sanguins-adaptes-pour-un-systeme-immunitaire-operationnel>

18. Overview of the Vascular System [Internet]. [cité 7 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/overview-of-the-vascular-system>

19. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 1 sept 2000;44(2):333-40.

20. Gimbrone MA. Vascular endothelium: nature's blood-compatible container. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516:5-11.

21. Leloup AJA, Van Hove CE, Heykers A, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Franssen P. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca²⁺-Channels. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [cité 19 janv 2021];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00375/full>

22. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

23. OMS | À propos des maladies cardiovasculaires [Internet]. WHO. World Health

- Organization; [cité 19 févr 2021]. Disponible sur: http://www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/index.html
24. FEDECARDIO | Cœur des Français : attention danger [Internet]. <https://www.fedecardio.org>. 2019 [cité 19 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.fedecardio.org/La-Federation-Francaise-de-Cardiologie/Presse/coeur-des-francais%C2%A0-attention-danger>
25. Yusuf Salim, Reddy Srinath, Ôunpuu Stephanie, Anand Sonia. Global Burden of Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 27 nov 2001;104(22):2746-53.
26. Coronary arteritis and aneurysms [Internet]. [cité 22 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/heartcoronaryarteritis.html>
27. Wessly P, Soherwardi S, Allen N. Nonsurgical Management of a Giant Coronary Artery Aneurysm. *Cureus* [Internet]. 16 juill 2017 [cité 22 févr 2021];9(7). Disponible sur: <https://www.cureus.com/articles/7948-nonsurgical-management-of-a-giant-coronary-artery-aneurysm>
28. Cerebral Aneurysm [Internet]. [cité 22 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/cerebral-aneurysm>
29. Chung Ada W.Y., Au Yeung Karen, Sandor George G.S., Judge Daniel P., Dietz Harry C., van Breemen Cornelis. Loss of Elastic Fiber Integrity and Reduction of Vascular Smooth Muscle Contraction Resulting From the Upregulated Activities of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in the Thoracic Aortic Aneurysm in Marfan Syndrome. *Circulation Research*. 31 août 2007;101(5):512-22.
30. Accident vasculaire cérébral (AVC) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 7 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/accident-vasculaire-cerebral-avc>
31. Duriez P. [Mechanisms of formation of atheroma plaque]. *Rev Med Interne*. juin 2004;25 Suppl 1:S3-6.
32. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. janv 2016;20(1):17-28.
33. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.

Nat Rev Immunol. juill 2006;6(7):508-19.

34. Mendis S, Puska P, Norrving B, Organization WH, Federation WH, Organization WS. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control [Internet]. World Health Organization; 2011 [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44701>
35. Mukamal KJ. The Effects of Smoking and Drinking on Cardiovascular Disease and Risk Factors. *Alcohol Res Health*. 2006;29(3):199-202.
36. Chapman MJ. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: A role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacology & Therapeutics*. 1 janv 2007;113(1):184-96.
37. Weber MA. The Role of the New β -Blockers in Treating Cardiovascular Disease. *American Journal of Hypertension*. 1 déc 2005;18(S6):169S-176S.
38. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 24 janv 2002;89(2, Supplement 1):3-9.
39. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 19 avr 2001;87(8, Supplement 1):25-32.
40. Qu'est ce que l'endarterectomie [Internet]. AVC Paris Sud. 2017 [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: <http://hopitaux-paris-sud.aphp.fr/avcparissud/lendarterectomie/>
41. Angioplastie [Internet]. Institut de cardiologie de l'Université d'Ottawa. [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ottawaheart.ca/fr/examen-intervention/angioplastie>
42. Restenosis After a Stent [Internet]. Verywell Health. [cité 5 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.verywellhealth.com/restenosis-after-angioplasty-and-stenting-1745217>
43. Pendyala LK, Yin X, Li J, Chen JP, Chronos N, Hou D. The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv*. déc 2009;2(12):1169-77.
44. Borhani S, Hassanajili S, Ahmadi Tafti SH, Rabbani S. Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Prog Biomater*. 1 sept 2018;7(3):175-205.
45. Navarese EP, Kowalewski M, Kandzari D, Lansky A, Górny B, Kołtowski Ł, et al. First-generation versus second-generation drug-eluting stents in current clinical practice: updated

evidence from a comprehensive meta-analysis of randomised clinical trials comprising 31 379 patients. *Open Heart*. 1 août 2014;1(1):e000064.

46. Lee D-H, de la Torre Hernandez JM. The Newest Generation of Drug-eluting Stents and Beyond. *Eur Cardiol*. août 2018;13(1):54-9.

47. Park S-J, Kang S-J, Virmani R, Nakano M, Ueda Y. In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure. *J Am Coll Cardiol*. 5 juin 2012;59(23):2051-7.

48. Borovac JA, D'Amario D, Vergallo R, Porto I, Bisignani A, Galli M, et al. Neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation: a novel clinical and therapeutic challenge. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 1 avr 2019;5(2):105-16.

49. Pontage coronarien ou aorto-coronariens - Double/Triple - Lyon/Annecy [Internet]. Chirurgiens Cardiaques Associés. [cité 8 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.chirurgien-cardiaque.com/chirurgie-coronaire/pontage-coronarien/>

50. Edris A, Siddiqi N, Kern MJ. 7 - Restenosis and Drug-Eluting Stents. In: Kern MJ, éditeur. *Interventional Cardiac Catheterization Handbook (Third Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013 [cité 5 déc 2021]. p. 168-83. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323080576000070>

51. Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann Cardiothorac Surg*. juill 2013;2(4):519-26.

52. Giannoukas AD, Labropoulos N, Stavridis G, Bailey D, Glenville B, Nicolaides AN. Pre-bypass quality assessment of the long saphenous vein wall with ultrasound and histology. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. juill 1997;14(1):37-40.

53. Sabik JF, Lytle BW, Blackstone EH, Houghtaling PL, Cosgrove DM. Comparison of Saphenous Vein and Internal Thoracic Artery Graft Patency by Coronary System. *The Annals of Thoracic Surgery*. févr 2005;79(2):544-51.

54. Altshuler P, Nahirniak P, Welle NJ. Saphenous Vein Grafts. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537035/>

55. Ahmed I, Yandrapalli S. Internal Mammary Artery Bypass. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 3 juin 2021]. Disponible sur:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560835/>

56. Options de traitement [Internet]. [cité 26 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.freseniusmedicalcare.ch/fr-ch/patients-familles/options-de-traitement/>
57. SAYS J. Hemodialysis Catheters [Internet]. SIFSOFF. 2019 [cité 26 sept 2021]. Disponible sur: <https://sifsof.com/clinical-apps/hemodialysis-catheters/>
58. Insuffisance rénale · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 26 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/insuffisance-renale/>
59. Accès d'hémodialyse [Internet]. CHUV. [cité 26 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.chuv.ch/fr/chirurgie-vasculaire/cva-home/patients-et-familles/maladies-et-traitements/acces-dhemodialyse>
60. van der Linde D, Konings EEM, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJM, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 15 nov 2011;58(21):2241-7.
61. Kurobe H, Maxfield MW, Breuer CK, Shinoka T. Concise review: tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future. *Stem Cells Transl Med*. juill 2012;1(7):566-71.
62. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 14 mai 1993;260(5110):920-6.
63. Letourneur D, Bordenave L. [Tissue engineering: a multidisciplinary approach]. *Med Sci (Paris)*. janv 2017;33(1):46-51.
64. Hielscher D, Kaebisch C, Braun BJV, Gray K, Tobiasch E. Stem Cell Sources and Graft Material for Vascular Tissue Engineering. *Stem Cell Rev*. oct 2018;14(5):642-67.
65. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. déc 2008;17 Suppl 4:467-79.
66. Akter F. Chapter 2 - Principles of Tissue Engineering. In: Akter F, éditeur. *Tissue Engineering Made Easy* [Internet]. Academic Press; 2016 [cité 15 juin 2021]. p. 3-16. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053614000023>
67. Bisceglie V. Uber die antineoplastische immunitat; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Huhner-embryone. *Ztschr f Krebsforsch*. 1933;

68. Chick WL, Like AA, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science*. 7 mars 1975;187(4179):847-9.
69. Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. oct 1981;194(4):413-28.
70. Song H-HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 01 2018;22(3):340-54.
71. Radke D, Jia W, Sharma D, Fena K, Wang G, Goldman J, et al. Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater*. août 2018;7(15):e1701461.
72. Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, Bordenave L, Hamilton G, Seifalian AM. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol Biol (Paris)*. déc 2005;53(10):599-612.
73. Shoji T, Breuer C, Shinoka T. Tissue-Engineered Vascular Grafts for Children. In: Walpoth BH, Bergmeister H, Bowlin GL, Kong D, Rotmans JI, Zilla P, éditeurs. *Tissue-Engineered Vascular Grafts* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cité 7 sept 2020]. p. 533-48. (Reference Series in Biomedical Engineering). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-030-05336-9_19
74. Shoji T, Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Translational Pediatrics*. avr 2018;7(2):188-95.
75. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. juill 2013;10(7):410-21.
76. Skovrind I, Harvald EB, Juul Belling H, Jørgensen CD, Lindholt JS, Andersen DC. Concise Review: Patency of Small-Diameter Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Meta-Analysis of Preclinical Trials. *Stem Cells Transl Med*. 28 mars 2019;
77. Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg*. févr 2009;49(2):352-62; discussion 362.

78. Shen G, Tsung HC, Wu CF, Liu XY, Wang X, Liu W, et al. Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Cell Research*. oct 2003;13(5):335-41.
79. Kabirian F, Ditekowski B, Zamanian A, Heying R, Mozafari M. An innovative approach towards 3D-printed scaffolds for the next generation of tissue-engineered vascular grafts. *Materials Today: Proceedings*. 1 janv 2018;5(7, Part 3):15586-94.
80. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med*. janv 2010;5(1):107-20.
81. L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. janv 1998;12(1):47-56.
82. Boccafoschi F, Habermehl J, Vesentini S, Mantovani D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. déc 2005;26(35):7410-7.
83. Shaikh FM, Callanan A, Kavanagh EG, Burke PE, Grace PA, McGloughlin TM. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(4):333-46.
84. McIlhenny S, Zhang P, Tulenko T, Comeau J, Fernandez S, Policha A, et al. eNOS transfection of adipose-derived stem cells yields bioactive nitric oxide production and improved results in vascular tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 1 nov 2015;9(11):1277-85.
85. Ma X, He Z, Li L, Liu G, Li Q, Yang D, et al. Development and in vivo validation of tissue-engineered, small-diameter vascular grafts from decellularized aortae of fetal pigs and canine vascular endothelial cells. *J Cardiothorac Surg*. 25 nov 2017;12(1):101.
86. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, et al. Functional Small Diameter Neovessels using Endothelial Progenitor Cells Expanded Ex Vivo. *Nat Med*. sept 2001;7(9):1035-40.
87. Tillman BW, Yazdani SK, Neff LP, Corriere MA, Christ GJ, Soker S, et al. Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. *J Vasc Surg*. sept 2012;56(3):783-93.

88. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. févr 2012;33(6):1771-81.
89. Adipurnama I, Yang M-C, Ciach T, Butruk-Raszeja B. Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review. *Biomater Sci*. 20 déc 2016;5(1):22-37.
90. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med*. janv 2010;5(1):107-20.
91. Schulze M, Tobiasch E. Artificial scaffolds and mesenchymal stem cells for hard tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2012;126:153-94.
92. Lotfi M, Nejib M, Naceur M. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* [Internet]. 27 mars 2013 [cité 28 janv 2020]; Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/cell-adhesion-to-biomaterials-concept-of-biocompatibility>
93. Zippel N, Schulze M, Tobiasch E. Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent Pat Biotechnol*. janv 2010;4(1):1-22.
94. Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Brizzi V, Delmond S, Bareille R, et al. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Mater*. 3 oct 2017;12(6):065003.
95. Magnan L, Labrunie G, Fénelon M, Dusserre N, Foulc M-P, Lafourcade M, et al. Human Textiles: a cell-synthesized yarn as a truly « bio » material for tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 26 janv 2020;
96. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*. 1 juill 2004;40(1):146-53.
97. Martin ND, Schaner PJ, Tulenko TN, Shapiro IM, Dimatteo CA, Williams TK, et al. In vivo behavior of decellularized vein allograft. *J Surg Res*. nov 2005;129(1):17-23.
98. Babczyk P, Conzendorf C, Klose J, Schulze M, Harre K, Tobiasch E. Stem Cells on

Biomaterials for Synthetic Grafts to Promote Vascular Healing. *J Clin Med.* 15 janv 2014;3(1):39-87.

99. Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, Sambanis A. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials.* mars 2003;24(7):1241-54.

100. Wise SG, Byrom MJ, Waterhouse A, Bannon PG, Weiss AS, Ng MKC. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater.* janv 2011;7(1):295-303.

101. Nagiah N, Johnson R, Anderson R, Elliott W, Tan W. Highly Compliant Vascular Grafts with Gelatin-Sheathed Coaxially Structured Nanofibers. *Langmuir.* 1 déc 2015;31(47):12993-3002.

102. Fayon A, Menu P, El Omar R. Cellularized small-caliber tissue-engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard. *NPJ Regen Med.* 12 août 2021;6(1):46.

103. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 1 mai 2010;459(6):923-39.

104. Yao Y, Wang J, Cui Y, Xu R, Wang Z, Zhang J, et al. Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. *Acta Biomaterialia.* 1 juin 2014;10(6):2739-49.

105. Begovac PC, Thomson RC, Fisher JL, Hughson A, Gällhagen A. Improvements in GORE-TEX® vascular graft performance by Carmeda® bioactive surface heparin immobilization. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 1 mai 2003;25(5):432-7.

106. Heyligers JMM, Verhagen HJM, Rotmans JI, Weeterings C, de Groot PG, Moll FL, et al. Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of Vascular Surgery.* 1 mars 2006;43(3):587-91.

107. Wan Y, Gao C, Han M, Liang H, Ren K, Wang Y, et al. Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds. *Polymers for Advanced Technologies.* 2011;22(12):2643-8.

108. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J*

Transl Med. 11 oct 2014;12(1):260.

109. Brennan MÁ, Layrolle P, Mooney DJ. Biomaterials Functionalized with MSC Secreted Extracellular Vesicles and Soluble Factors for Tissue Regeneration. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(37):1909125.

110. Lawson JH, Glickman MH, Ilzecki M, Jakimowicz T, Jaroszynski A, Peden EK, et al. Bioengineered Human Acellular Vessels for Dialysis Access in Patients with End-Stage Renal Disease: Two Phase 2 Single-Arm Trials. *Lancet*. 14 mai 2016;387(10032):2026-34.

111. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 31 mai 2011;108(22):9214-9.

112. Dahl SLM, Kypson AP, Lawson JH, Blum JL, Strader JT, Li Y, et al. Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Sci Transl Med*. 2 févr 2011;3(68):68ra9.

113. Watanabe T, Kanda K, Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011;98B(1):120-6.

114. Rothuizen TC, Damanik FFR, Lavrijsen T, Visser MJT, Hamming JF, Lalai RA, et al. Development and evaluation of in vivo tissue engineered blood vessels in a porcine model. *Biomaterials*. 1 janv 2016;75:82-90.

115. Hashi CK, Zhu Y, Yang G-Y, Young WL, Hsiao BS, Wang K, et al. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 juill 2007;104(29):11915-20.

116. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*. 25 avr 2009;373(9673):1440-6.

117. Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg*. nov 2014;60(5):1353-7.

118. Tranquillo E, Bollino F. Surface Modifications for Implants Lifetime Extension: An

Overview of Sol-Gel Coatings. *Coatings*. 24 juin 2020;10:589.

119. Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, Kamohara K, Furukawa K, Uchihashi K, et al. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0136681.

120. Dahl SLM, Blum JL, Niklason LE. Bioengineered Vascular Grafts: Can We Make Them Off-the-Shelf? ☆ ☆ The authors are all founders of Humacyte, Inc. All authors have a financial interest in Humacyte, which is developing decellularized bioengineered vascular grafts. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1 avr 2011;21(3):83-9.

121. Shindo S, Takagi A, Whittmore AD. Improved patency of collagen-impregnated grafts after in vitro autogenous endothelial cell seeding. *Journal of Vascular Surgery*. 1 oct 1987;6(4):325-32.

122. Zilla P, Deutsch M, Meinhart J, Puschmann R, Eberl T, Minar E, et al. Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J Vasc Surg*. mars 1994;19(3):540-8.

123. Zilla P, Preiss P, Groscurth P, Rösemeyer F, Deutsch M, Odell J, et al. In vitro-lined endothelium: initial integrity and ultrastructural events. *Surgery*. sept 1994;116(3):524-34.

124. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1 mars 2005;288(3):H1451-60.

125. Zhou J, Fung YC. The degree of nonlinearity and anisotropy of blood vessel elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 déc 1997;94(26):14255-60.

126. Singh C, Wong CS, Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J Funct Biomater*. 30 juin 2015;6(3):500-25.

127. Patel DJ, Janicki JS, Carew TE. Static anisotropic elastic properties of the aorta in living dogs. *Circ Res*. déc 1969;25(6):765-79.

128. Weizsacker HW, Pinto JG. Isotropy and anisotropy of the arterial wall. *Journal of Biomechanics*. 1 janv 1988;21(6):477-87.

129. Shadwick RE. Elasticity in Arteries: A similar combination of rubbery and stiff materials creates common mechanical properties in blood vessels of vertebrates and some

invertebrates. *American Scientist*. 1998;86(6):535-41.

130. Glasser SP, Arnett DK, McVeigh GE, Finkelstein SM, Bank AJ, Morgan DJ, et al. Vascular Compliance and Cardiovascular Disease: A Risk Factor or a Marker? *American Journal of Hypertension*. 1 oct 1997;10(10):1175-89.

131. ISO 7198:2016(fr), Implants cardiovasculaires et systèmes extracorporels — Prothèses vasculaires — Greffons vasculaires tubulaires et pièces vasculaires [Internet]. [cité 23 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7198:ed-2:v1:fr>

132. CDC. High Blood Pressure Symptoms, Causes, and Problems | cdc.gov [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cité 5 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/bloodpressure/about.htm>

133. Matsui Y, Ishikawa J, Eguchi K, Shibasaki S, Shimada K, Kario K. Maximum value of home blood pressure: a novel indicator of target organ damage in hypertension. *Hypertension*. juin 2011;57(6):1087-93.

134. Menard KP, Menard N. *Dynamic Mechanical Analysis*. CRC Press; 2020. 281 p.

135. La réglementation et le dispositif éthique de l'expérimentation animale [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 6 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/recherche-inserm/ethique/utilisation-animaux-fins-recherche/reglementation-et-ethique-experimentation-animale>

136. ISO 7198:1998(en), Cardiovascular implants — Tubular vascular prostheses [Internet]. [cité 23 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7198:ed-1:v1:en>

137. Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg*. avr 1993;17(4):746-56.

138. Byrom MJ, Bannon PG, White GH, Ng MKC. Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *Journal of Vascular Surgery*. 1 juill 2010;52(1):176-95.

139. Lopez-Soler RI, Brennan MP, Goyal A, Wang Y, Fong P, Tellides G, et al. Development of a mouse model for evaluation of small diameter vascular grafts. *J Surg Res*. 1 mai 2007;139(1):1-6.

140. Hibino N, Yi T, Duncan DR, Rathore A, Dean E, Naito Y, et al. A critical role for macrophages in neovessel formation and the development of stenosis in tissue-engineered

vascular grafts. *FASEB J.* déc 2011;25(12):4253-63.

141. Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 1 oct 2013;24(5):916-25.

142. Cox LA, Comuzzie AG, Havill LM, Karere GM, Spradling KD, Mahaney MC, et al. Baboons as a Model to Study Genetics and Epigenetics of Human Disease. *ILAR J.* 2013;54(2):106-21.

143. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol.* janv 2000;11(1):5-17.

144. Bianco RW, Wasiluk KR, Kealhofer JV, Lahti MT, Rivard AL, Gallegos RP. Large Animal Models in Cardiac and Vascular Biomaterials Research and Assessment. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition.* 1 janv 2013;653-76.

145. Sato M, Harasaki H. Evaluation of platelet and coagulation function in different animal species using the xylum clot signature analyzer. *ASAIO J.* août 2002;48(4):360-4.

146. Ueberrueck T, Tautenhahn J, Meyer L, Kaufmann O, Lippert H, Gastinger I, et al. Comparison of the ovine and porcine animal models for biocompatibility testing of vascular prostheses. *J Surg Res.* avr 2005;124(2):305-11.

147. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences.* 1 juill 2005;86(1):6-19.

148. Wilson-Sanders SE. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. *ILAR Journal.* 1 janv 2011;52(2):126-52.

149. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 1 juill 2015;23(3):223-9.

150. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, et al. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet.* juill 2002;41(4):208-16.

151. Knight A, Bailey J, Balcombe J. Animal Carcinogenicity Studies: 3. Alternatives to the Bioassay. *Altern Lab Anim.* 1 févr 2006;34(1):39-48.

152. Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Altern Lab Anim.* 1

juill 2020;48(4):146-72.

153. Balkawade NU, Shinde MA. Study of Length of Umbilical Cord and Fetal Outcome: A Study of 1,000 Deliveries. *J Obstet Gynaecol India*. oct 2012;62(5):520-5.
154. Newcomb JD, Sanberg PR, Klasko SK, Willing AE. Umbilical Cord Blood Research: Current and Future Perspectives. *Cell Transplant*. 2007;16(2):151-8.
155. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *STEM CELLS*. 2007;25(11):2886-95.
156. Dardik H, Ibrahim IM, Baier R, Sprayregen S, Levy M, Dardik II. Human umbilical cord. A new source for vascular prosthesis. *JAMA*. 20 déc 1976;236(25):2859-62.
157. McLaughlin CA, West T, Hollowell R, Skergan NN, Baker J, Donner H, et al. Expanded Access Protocol of Umbilical Cord Blood Infusion for Children with Neurological Conditions. *Stem Cells Transl Med*. 28 août 2019;8(Suppl Suppl 1):S4-5.
158. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 14 mai 2011;9:12.
159. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
160. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *International Journal of Cardiology*. 28 avr 2006;109(1):74-81.
161. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehniger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84.
162. Afra S, Matin MM. Potential of mesenchymal stem cells for bioengineered blood vessels in comparison with other eligible cell sources. *Cell Tissue Res* [Internet]. 3 janv 2020 [cité 8 janv 2020]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03161-0>
163. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and Functionality of Cell Surface Molecules on Human Mesenchymal

Stem Cells. JBS. 2003;10(2):228-41.

164. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. J Immunol Methods. oct 2004;293(1-2):127-42.

165. P. De Miguel M, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Y. Pascual C, A. Aller M, Arias J, et al. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. Current Molecular Medicine. 1 juin 2012;12(5):574-91.

166. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood. 1 janv 2006;107(1):367-72.

167. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. STEM CELLS. 2006;24(1):74-85.

168. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. Transplantation. 15 janv 2007;83(1):71-6.

169. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. Journal of Hematology & Oncology. 30 avr 2012;5(1):19.

170. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cellular Immunology. 1 janv 2009;259(2):150-6.

171. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. Stem Cells. nov 2008;26(11):2865-74.

172. El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng Part B Rev. oct 2014;20(5):523-44.

173. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. mars 2008;26(3):591-9.

174. Couto PS, Shatirishvili G, Bersenev A, Verter F. First decade of clinical trials and published studies with mesenchymal stromal cells from umbilical cord tissue. *Regen Med.* mai 2019;14(4):309-19.
175. Persutte WH, Lenke RR. Transverse umbilical arterial diameter: technique for the prenatal diagnosis of single umbilical artery. *J Ultrasound Med.* oct 1994;13(10):763-6.
176. Longo LD, Reynolds LP. Some historical aspects of understanding placental development, structure and function. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):237-55.
177. Yeh HS, Keller JT, Brackett KA, Frank E, Tew JM. Human umbilical artery for microvascular grafting. Experimental study in the rat. *J Neurosurg.* oct 1984;61(4):737-42.
178. Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part A.* sept 2009;15(9):2665-76.
179. Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 1 mai 2009;144:S108-13.
180. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta.* janv 1997;18(1):53-64.
181. Gogiel T, Bańkowski E, Jaworski S. Proteoglycans of Wharton's jelly. *Int J Biochem Cell Biol.* oct 2003;35(10):1461-9.
182. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* janv 1997;11(1):51-9.
183. Jadalannagari S, Converse G, McFall C, Buse E, Filla M, Villar MT, et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0172098.
184. Kehtari M, Beiki B, Zeynali B, Hosseini FS, Soleimanifar F, Kaabi M, et al. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2019;120(4):6683-97.
185. Penolazzi L, Pozzobon M, Bergamin LS, D'Agostino S, Francescato R, Bonaccorsi G, et al. Extracellular Matrix From Decellularized Wharton's Jelly Improves the Behavior of Cells

From Degenerated Intervertebral Disc. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:262.

186. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* avr 2017;50(2).

187. He F. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-protocol.* 5 mars 2011;1(5):e44.

188. Prockop DJ. Collagens. In: Lennarz WJ, Lane MD, éditeurs. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [Internet]. New York: Elsevier; 2004 [cité 26 juill 2021]. p. 482-7. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0124437109001319>

189. López JM, Imperial S, Valderrama R, Navarro S. An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clin Chim Acta.* 29 oct 1993;220(1):91-100.

190. Goldberg RL, Kolibas LM. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Connect Tissue Res.* 1990;24(3-4):265-75.

191. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJ dos, Carvalho M das G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(3):259-65.

192. Nathanael AJ, Oh TH. Biopolymer Coatings for Biomedical Applications. *Polymers.* déc 2020;12(12):3061.

193. Dan P, Velot É, Francius G, Menu P, Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater.* 15 2017;48:227-37.

194. Moore MC, Pandolfi V, McFetridge PS. Novel human-derived extracellular matrix induces in vitro and in vivo vascularization and inhibits fibrosis. *Biomaterials.* mai 2015;49:37-46.

195. Schmidt MM. Collagen extraction process. 2016;

196. Coelho RCG, Marques ALP, Oliveira SM, Diogo GS, Pirraco RP, Moreira-Silva J, et al. Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 1 sept 2017;78:787-95.

197. Rahman MA. Collagen of Extracellular Matrix from Marine Invertebrates and Its Medical Applications. *Mar Drugs.* 14 févr 2019;17(2).

198. Kiew P, Don MM. The Influence of Acetic Acid Concentration on the Extractability of Collagen from the Skin of Hybrid *Clarias* sp. and Its Physicochemical Properties: A Preliminary Study. undefined [Internet]. 2013 [cité 6 sept 2021]; Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Influence-of-Acetic-Acid-Concentration-on-the-A-Kiew-Don/07038ebc3ca2003f44663f9cc0f13b82bf4f65a9>
199. Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta*. nov 2005;26(10):747-52.
200. Jadalannagari S, Converse G, McFall C, Buse E, Filla M, Villar MT, et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. Pant AB, éditeur. *PLOS ONE*. 21 févr 2017;12(2):e0172098.
201. Vlodaysky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, et al. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 avr 1987;84(8):2292-6.
202. Edmondson SR, Thumiger SP, Werther GA, Wraight CJ. Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocr Rev*. déc 2003;24(6):737-64.
203. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney International*. 1 mars 1992;41(3):557-9.
204. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. *Journal of Surgical Research*. 1 mars 2009;152(1):135-9.
205. Gross J. THERMAL DENATURATION OF COLLAGEN IN THE DISPERSED AND SOLID STATE. *Science*. 28 févr 1964;143(3609):960-1.
206. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech*. oct 2003;36(10):1529-53.
207. Davison PF, Cannon DJ, Andersson LP. The Effects of Acetic Acid on Collagen Cross-Links. *Connective Tissue Research*. 1 janv 1972;1(3):205-16.
208. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. janv

2011;3(1):a004978.

209. Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate*. 1997;71(1):11-21.

210. Vizza E, Correr S, Goranova V, Heyn R, Angelucci PA, Forleo R, et al. The collagen skeleton of the human umbilical cord at term. A scanning electron microscopy study after 2N-NaOH maceration. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(5):885-94.

211. Rajan N, Habermehl J, Côté M-F, Doillon CJ, Mantovani D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc*. déc 2006;1(6):2753-8.

212. El Omar R, Xiong Y, Dostert G, Louis H, Gentils M, Menu P, et al. Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells. *Immunol Cell Biol*. avr 2016;94(4):342-56.

213. Monteiro IP, Shukla A, Marques AP, Reis RL, Hammond PT. Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015;103(1):330-40.

214. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, Groot PGD. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2(4):561-73.

215. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem*. mai 2016;62(5):699-707.

216. Dugan TA, Yang VW-C, McQuillan DJ, Höök M. Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem*. 15 déc 2006;281(50):38208-16.

217. Kopeček J. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? *Biomaterials*. déc 2007;28(34):5185-92.

218. Biran R, Pond D. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1 mars 2017;112:12-23.

219. Balaj L, Atai NA, Chen W, Mu D, Tannous BA, Breakefield XO, et al. Heparin affinity purification of extracellular vesicles. *Sci Rep*. 19 mai 2015;5(1):10266.

220. Atai NA, Balaj L, van Veen H, Breakefield XO, Jarzyna PA, Van Noorden CJF, et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J*

Neurooncol. déc 2013;115(3):343-51.

221. De Jong OG, Van Balkom BWM, Schiffelers RM, Bouten CVC, Verhaar MC. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. *Front Immunol.* 2014;5:608.

222. Crivelli B, Chlapanidas T, Perteghella S, Lucarelli E, Pascucci L, Brini AT, et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *J Control Release.* 28 sept 2017;262:104-17.

223. Marolt Presen D, Traweger A, Gimona M, Redl H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:352.

224. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg.* oct 2006;61(5):213-9.

225. Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res.* 1 juill 2006;71(1):40-9.

226. Monitoring and surveillance of the hemodialysis vascular access [Internet]. [cité 5 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.healio.com/news/nephrology/20180227/monitoring-and-surveillance-of-the-hemodialysis-va>

227. Scholz SS, Vukadinović D, Lauder L, Ewen S, Ukena C, Townsend RR, et al. Effects of Arteriovenous Fistula on Blood Pressure in Patients With End-Stage Renal Disease: A Systematic Meta-Analysis. *Journal of the American Heart Association.* 19 févr 2019;8(4):e011183.

228. Pellegata AF, Dominioni T, Ballo F, Maestroni S, Asnaghi MA, Zerbini G, et al. Arterial Decellularized Scaffolds Produced Using an Innovative Automatic System. *CTO.* 2014;200(6):363-73.

229. Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int J Mol Sci.* 30 juill 2020;21(15):E5447.

230. Williams C, Liao J, Joyce EM, Wang B, Leach JB, Sacks MS, et al. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. *Acta Biomater.* mai 2009;5(4):993-1005.

231. Hwang J, San BH, Turner NJ, White LJ, Faulk DM, Badylak SF, et al. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater.* 15 avr 2017;53:268-78.
232. Gong W, Cai J, Wang Z, Chen A, Ye X, Li H, et al. Robot-assisted coronary artery bypass grafting improves short-term outcomes compared with minimally invasive direct coronary artery bypass grafting. *J Thorac Dis.* mars 2016;8(3):459-68.
233. Portail HAS Professionnels [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/fc_2873790/fr/professionnels
234. Hibino N, Villalona G, Pietris N, Duncan DR, Schoffner A, Roh JD, et al. Tissue-engineered vascular grafts form neovessels that arise from regeneration of the adjacent blood vessel. *FASEB J.* août 2011;25(8):2731-9.
235. Sheu M-T, Huang J-C, Yeh G-C, Ho H-O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials.* 1 juill 2001;22(13):1713-9.
236. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel).* 16 mars 2010;3(3):1863-87.
237. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology.* 1 oct 1992;4(5):793-801.
238. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life.* 2008;60(12):818-23.

Annexes

Cellularized small-caliber tissue engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard

Adrien FAYON¹, Patrick MENU*^{1,2} & Reine El OMAR^{1,2}

¹UMR 7365 CNRS, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire, University of Lorraine, Vandœuvre-Lès-Nancy, 54505, France

²Faculty of Pharmacy, University of Lorraine, 54000, Vandœuvre-Lès-Nancy, 54505, France

*Corresponding author, email:Patrick.menu@univ-lorraine.fr

Keywords: Vascular Tissue Engineering, Cellularized graft, *In vivo* evaluation, small caliber,

1 ABSTRACT

2 Due to the lack of efficacy of synthetic vascular substitutes in the replacement of small-
3 caliber arteries, vascular tissue engineering (VTE) has emerged as a promising solution to
4 produce viable small-caliber tissue-engineered vascular grafts (TEVG). Previous studies have
5 shown the importance of a cellular intimal layer at the luminal surface of TEVG to prevent
6 thrombotic events. However, the cellularization of a TEVG seems to be a critical approach to
7 consider in the development of a TEVG. To date, no standard cellularization method or cell
8 type has been established to create the ideal TEVG by promoting its long-term patency and
9 function. In this review, advances in VTE are described and discussed with a particular focus
10 on the construction approaches of cellularized small-caliber TEVGs, the cell types used, as
11 well as their pre-clinical and clinical applications.
12

13 INTRODUCTION

14 Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of death worldwide^{1,2}, representing 32%
15 of all global deaths³. These diseases are often associated with a dysfunctional vasculature
16 caused by inflammatory, metabolic and proliferative alterations leading to the narrowing or
17 complete obstruction of blood vessels. Thus, tissue damage is induced by diseased blood
18 vessels that are unable to convey oxygen and essential nutrients to cells. Common
19 presentations of CVD are coronary heart disease, peripheral arterial disease, deep vein
20 thrombosis and cerebrovascular disease⁴.
21 Consequently, CVD have resulted in an increasing need for vascular grafts in order to
22 reconstruct or bypass vascular stenosis. Vascular bypass grafting remains one of the most
23 effective treatment approaches for patients who need long-term revascularization^{5,6}. For the
24 case of myocardial revascularization, coronary artery bypass grafting (CABG) remains the
25 most common cardiac surgery procedure in the world, with about 200 000 CABGs performed
26 annually in the US, while in Western European countries an average incidence of 62 per
27 100 000 people is reported⁷. It is worth mentioning that vascular conduits are also required
28 to create arterial-venous fistulas for frequent hemodialysis access.
29

30 Although autologous arteries and veins are the preferable conduits for vascular grafting,
31 their use may be impossible due to their limited availability, their variable quality (e.g.

32 varicose veins) and the complications associated with their removal (i.e. infections, tissue
33 damage, time consuming procedures, long term recovery). As an alternative to autografts,
34 synthetic vascular grafts can be used as they have shown a long-term efficacy in the
35 replacement of large- (> 8 mm) and medium- (6-8 mm) diameter arteries. However, they
36 present poor patency rates when used for bypassing small-diameter arteries (< 6 mm)⁴.
37 Globally, small vascular graft failures are commonly due to intimal hyperplasia, thrombosis,
38 atherosclerosis or even through infections. Indeed, one of their major limitations is the
39 absence of their luminal cellularization, leading to thrombosis via the adherence of blood
40 proteins and the activation of clotting mechanisms^{8,9}.

41 The limitations of small-diameter vascular grafts are a real obstacle to the vascular bypass
42 substitutes, making this a real public health issue^{4,10}. The production of a tissue-engineered
43 vascular graft (TEVG) for the replacement of small-diameter vessels has become the most
44 heavily investigated and challenging areas of VTE. A TEVG with long-term patency, capable
45 of being remodelled by the host organism, and showing self-repair capacities *in vivo* would
46 be of great benefit¹¹. Such a TEVG may represent a major advance in the field of
47 cardiovascular surgery by providing an allogeneic “off-the-self” solution for clinical use
48 allowing a new therapeutic option in various pathological states such as myocardial and
49 lower limbs revascularization, pediatric vascular disease, useful also as arteriovenous bridges
50 for hemodialysis. Furthermore, an “off-the-shelf” TEVG will be perfectly adapted for mini-
51 invasive surgeries performed by robots. In fact, surgical robotic technology has emerged to
52 perform remote operations in limited spaces and activities and is considered as the surgically
53 invasive version of coronary bypass, avoiding a complete thoracotomy or sternotomy, thus
54 preserving the thoracic integrity and suffering of the patient, and significantly reducing
55 hospitalization period and costs.

56 The first TEVG developed was reported by Weinberg and Bell in 1986. It was produced by
57 mimicking the blood vessel architecture using bovine aortic endothelial cells (ECs), smooth
58 muscle cells (SMCs), thin Dacron® mesh and collagen to create a tubular scaffold. On this
59 scaffold, ECs, SMCs and bovine adventitial fibroblasts were co-seeded on the luminal
60 surface, the internal wall and on the external side, respectively¹².

61 Since this first TEVG, several small diameter cellularized vessel substitutes have been
62 elaborated and tested with different production approaches which are presented in Figure
63 1.

64 A variety of scaffolds from natural sources can be used, such as decellularized vessels or *in*
65 *vitro* developed scaffolds, e.g., synthetic or bio-synthetic grafts. Associations of different cell
66 sources and different combinations of microenvironmental conditions to lead cell
67 differentiation or maintain cell integrity have also been described. Despite these
68 considerable advances in VTE, only few grafts have reached clinical studies and the perfect
69 TEVG has not been yet developed.

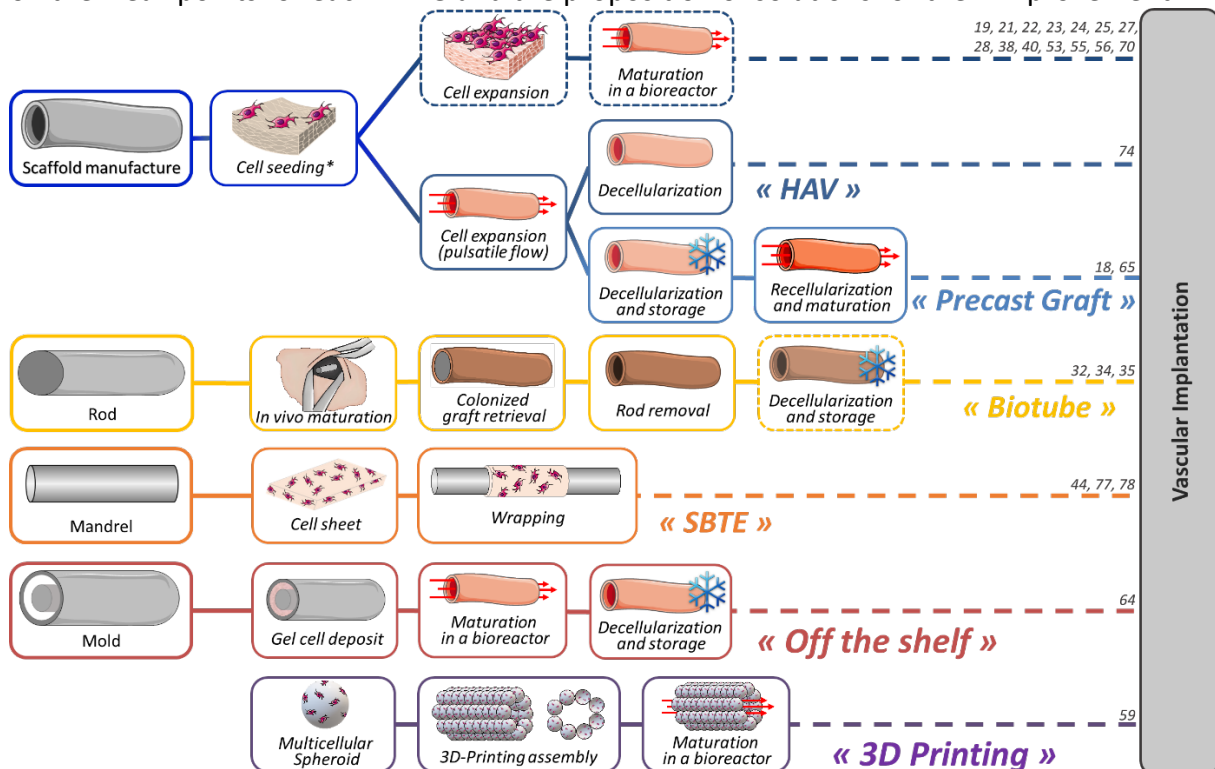
70

71 A key factor to consider in the development of a TEVG is the cellular component. In fact, a
72 very recent meta-analysis of preclinical studies using small-diameter TEVG has found that
73 recellularized grafts were more patent than acellular grafts (85.1% versus 64.4%
74 respectively)¹³.

75 The cell adhesion, proliferation, as well as differentiation and several other contributions to
76 hemostasis is crucial to create a hemocompatible small-diameter vascular graft. In
77 physiological conditions, the blood vessel hemocompatibility is ensured by a monolayer of
78 endothelial cells (ECs) localized at its luminal surface (termed the “endothelium”). This blood

79 contact surface maintains hemostasis through several antithrombogenic mechanisms, such
 80 as the synthesis of plasminogen activator (tPA); inhibition of platelet aggregation via
 81 secretion of nitric oxide (NO) and prostacyclin; and by the presence of glycosaminoglycans
 82 on the endothelial cellular surface preventing blood coagulation^{14,15}. Thus, in order to ensure
 83 optimal hemostasis, a continuous cell layer on the luminal surface of the vascular substitute
 84 is required. For this purpose, different cellularization approaches are described in the
 85 literature, using variable amounts of cells according to the seeding technique and the
 86 maturation period of the graft. The cell adhesion and retention can be highly improved by a
 87 prior coating deposit on the luminal surface of the graft. The addition of a luminal coating in
 88 the TEVG manufacture protocol is highly recommended as it can modify the
 89 microenvironment and guide cell behavior by promoting cell adhesion, proliferation and/or
 90 differentiation¹⁶. Several types of coatings have been used, composed of one or a
 91 combination of proteins which are in most cases of animal origin. Our team has recently
 92 developed an innovative approach to coating surfaces using a natural extracellular matrix
 93 (ECM) of human origin, extracted from the umbilical cord Wharton's jelly (WJ) and is totally
 94 natural, biocompatible and perfectly controllable¹⁷.

95
 96 This review will focus on the cellularized vascular grafts described in the literature, the
 97 different manufacturing protocols, the various quality control tests, the pre-clinical *in vivo*
 98 evaluation in several animal models and different implantation sites, as well as the few
 99 human clinical trials. The results will be presented and discussed critically, with an emphasis
 100 on the weak points for each TEVG and the proposition of solutions for their improvement.



101
 102 **Figure 1. Fabrication approaches to produce a small diameter TEVG.** Dotted frames represent optional steps found in the
 103 literature. *Cells can be seeded using cellularized gel or cell suspension. (TEVG: Tissue Engineered Vascular Graft ; HAV: Human
 104 Acellular Vessel; SBTE: Sheet-Based Tissue Engineering)

105

106 PRECLINICAL TRIALS

107 Several approaches have been described for the cellularization of TEVG using different types
108 of cells in order to recreate the intimal and medial layers. Cells used in VTE can be from
109 autologous or heterologous origins, as discussed in the following paragraphs of this review.

110

111 **Substitutes using autologous cells**

112 The advantage of using autologous cells is the avoidance of any host immunological reaction
113 which induces the graft rejection. Two cellularization approaches have already been reported
114 in the literature: (1) an *in vitro* method involving the harvesting of autologous animal cells
115 before the preparation of the substitute and (2) an *in vivo* method which uses the animal
116 model as an “incubator” by placing an acellular tube in the animal before vascular grafting.
117 These studies are part of a proof-of-concept approach; they propose TEVG manufactured
118 using autologous animal cells that are not directly transferrable to human implantations.
119 Moreover, the use of this cell type requires fairly long preparation times of up to several
120 months¹⁸, which may be incompatible with the critical situation of the patient.

121

122 **Endothelial cells (ECs) and endothelial progenitor cells (EPCs)**

123 Ma *et al* have reported the use of mature autologous canine ECs in the manufacture of their
124 graft¹⁹. Cells were harvested from the left external jugular vein. Cells were cultured until the
125 4th passage and then seeded by rotational precipitation into a decellularized aortae of fetal
126 pigs (DAFP), clamped on both sides (arteries are rotated 120° every 10 minutes for 30
127 minutes). After the EC deposit the graft was placed in a bioreactor for 7 days, allowing a step
128 of dynamic culture where the perfusion rate was increased from 10 to 60 mL/min, followed
129 by 3 days of static culture. The autologous graft was then implanted as a carotid graft
130 replacement in 7 dogs for a period of up to 6 months. Results showed an absence of thrombi
131 and stenosis and all the grafts remained patent over the period of the study. After 6 months,
132 the intimal layer of the graft was composed by EPCs and ECs whose origin has not been
133 precisely determined. Moreover, the graft was remodeled by host cells, notably muscular
134 fibroblasts which settled in a “media-like” layer. Although the graft has shown satisfactory
135 results, some issues could be addressed further, especially in regards to the animal model
136 used in the study. Thrombogenesis mechanisms and vascular viscoelastic properties in dogs
137 are very different from the human physiological parameters²⁰. Thus, these results cannot
138 necessarily be transferrable to humans.

139

140 ECs can also be obtained from EPCs that are collected non-invasively from the host’s
141 peripheral blood. These cells can be used directly to cellularize a scaffold or can be subjected
142 to a prior differentiation step before being seeded.

143 In 2001, Kaushal *et al* evaluated the *in vivo* efficiency of a TEVG built from a pig
144 decellularized iliac artery in a sheep model. The artery was seeded with autologous EPCs
145 harvested from the internal jugular vein of 1 to 2 week(s) old sheep²¹. Seeding was
146 accomplished under dynamic rotating conditions for 6 hours. The graft was then matured in
147 a laminar flow bioreactor for 6 days with a gradually increasing shear stress and implanted in
148 an end-to-end carotid artery replacement model. Two groups of animals were compared
149 under the same grafting conditions: 7 animals receiving seeded grafts versus 4 animals with
150 unseeded grafts. The grafts patency was monitored by ultrasound Doppler every day, for a
151 period ranging from 15 to 130 days. In the first 5 days of implantation, 3 of the 4 unseeded
152 grafts were 100% clogged. The 4th graft was 50% clogged 15 days after the implantation.

153 Concurrently, all seeded grafts remained patent over the entire study period (n=3 at 15 days;
154 n=4 at 130 days). At 15 days, a layer of ECs derived from originally seeded EPCs was present,
155 however the media of the substitute remained acellular. At 130 days, the results showed a
156 thickening of the media that was infiltrated by host cells void of smooth muscle alpha-actin
157 (α -SMA) expression, as well as an intimal layer colonized by α -SMA+ cells. Only 10% of the
158 ECs identified at the luminal surface at 130 days were derived from the originally seeded
159 EPCs. After 130 days, collected grafts showed a vasoconstriction capacity following exposure
160 to serotonin and norepinephrine, reflecting the functionality of smooth muscle cells found in
161 the intimal layer. On the other hand, these same grafts showed a relaxing capacity probably
162 mediated by the release of NO, similar to that found in the native carotid artery.

163
164 Otherwise, EPCs can be subjected to a prior differentiation step before seeding, as achieved
165 by Tillman *et al* in 2012²². In their study, the substitute was developed by seeding
166 differentiated autologous circulating EPCs on a decellularized porcine carotid artery
167 segment. The seeding was carried out in a bioreactor by injecting the cells into the lumen of
168 the vessels for 2 hours. The graft was then subjected to a gradually increasing non-pulsatile
169 flow for 5 days. Graft maturation was then completed after 9 days under pulsatile flow. This
170 substitute was evaluated for arteriovenous flow and needle punctures in the ovine model.
171 "Short-term" and "long-term" groups were monitored. The "short-term" group, consisting of
172 a study period of 2 months, included 7 grafted animals. Grafts of this group were punctured
173 3 times a week during the second month. In the "long-term" group, 8 animals were
174 implanted and followed for 6 months. From the 5th month, grafts were punctured 3 times a
175 week. During this experiment, of the total number of grafts, 4 were stunted in the first
176 month of transplantation (the healing month) and occlusions appeared from 3.3 months.
177 This type of graft using decellularized blood vessels as scaffolds have shown resistance
178 deficiencies to repeated punctures. Other scaffolds, such as those built by mesh construction
179 could be more effective in needle resistance.

181 **Combination of EPCs and SMCs**

182 Previous studies have described a co-seeding method with a combined cellularization, using
183 autologous ECs and SMCs to improve the TEVG resistance. This approach was evaluated by
184 Neff *et al* (2011) in a carotid artery interposition grafting model in pigs for 4 months²³.
185 Results were compared with those obtained from TEVG seeded only with ECs. The
186 manufacture of this graft consisted of the decellularization of a pig carotid artery, followed
187 by an incubation with a SMC suspension under rotation into an outer chamber. Then, the
188 graft was placed in a bioreactor where the lumen was perfused with a suspension of ECs for
189 10 to 14 days. Results have shown that the addition of SMCs to the graft wall allowed a
190 better cellularization of the graft after implantation. This method of combined cellularization
191 also reinforced the TEVG contractility without a negative impact on its permeability.
192 However, this contraction capacity was much weaker than that of a native carotid artery (15-
193 20%).

194 Koch *et al* (2010)²⁴ and Ju *et al* (2017)²⁵ have applied the co-seeding technique to a fibrin
195 scaffold supported by a poly(L/D)lactide 96/4 [P(L/D)LA 96/4]] mesh and an electrospun
196 bilayered vascular scaffold, respectively. The same cellularization protocol as previously
197 described was utilized by Ju *et al*. Koch *et al* produced their scaffold by a
198 SMC/fibroblasts/fibrinogen suspension that was left to polymerize inside a mold. After
199 polymerization, the luminal surface was cellularized with an ECs suspension into a rotating

200 chamber²⁶. Both TEVG were evaluated in a sheep carotid arterial interposition model. After
201 an implantation period of 6 months, promising results have shown that the TEVG remained
202 patent and well-integrated into the host tissue. Although these grafts appear to be suitable
203 for clinical applications, some issues must be addressed, such as the long processing time. In
204 fact, the scaffold preparation requires 7 days, followed by several weeks of autologous cell
205 expansion until the 3rd-5th passage. An evaluation of this graft in a CABG or peripheral
206 vascular bypass model would be beneficial to validate its efficiency in different
207 representative clinical situations.

208

209 **Modified cells**

210 Another approach to obtain suitable efficient TEVGs is to modify seeded cells to confer them
211 an additional functionality or to enhance a specific function. McIlhenny *et al* have proposed
212 a TEVG consisting of a decellularized human saphenous vein seeded with rabbit autologous
213 adipose derived stem cells (ASCs). Cells were obtained from dorsal fat pads and seeded by a
214 rotating perfusion of the graft's luminal surface. The cellularized graft was then matured for
215 1 week in a bioreactor with a linearly increasing shear stress rate, thereby inducing the ASCs
216 differentiation towards endothelial-like cells (ELCs)²⁷. A first implantation attempt showed a
217 high thrombogenicity due to a weak production of NO by ELCs. Therefore, in order to
218 increase the NO production by ELCs, a transfection of ASC was achieved with an adenoviral
219 vector containing the endothelial nitric oxide synthase (eNOS)²⁸. The TEVG with modified
220 cells was tested in 5 rabbits in an abdominal aortic interposition graft model. The control
221 group consisted of 5 rabbits implanted with unseeded grafts. After 2 months of
222 implantation, all grafts, seeded and unseeded, had remained patent. Histological analyses
223 have demonstrated that unseeded grafts exhibited a thrombus formation and/or a thrombin
224 and fibrin staining at their luminal surface. Seeded grafts on the other hand, presented a
225 smooth luminal surface without any traces of thrombin or fibrin. Although transfected cells
226 have allowed the improvement of the graft characteristics via the overexpression of eNOS,
227 the long-term patency and efficiency need to be evaluated in larger animal models which
228 have a more similar physiology to humans. Moreover, the originality of this graft seems to
229 be a major default since gene editing for clinical applications is at the center of ethical
230 debates²⁹.

231

232 **Graft production *in situ* by host cells**

233 Grafts developed according to this method are called "biotubes" and are derived from the
234 "in-body tissue architecture technology". The preparation consists of a natural or synthetic
235 rod implanted subcutaneously into the host tissue and left to be colonized/encapsulated by
236 host cells. After the *in vivo* incubation period, the encapsulated rod is harvested. The rod is
237 then removed, and the host tissue surrounding the rod is used as a TEVG. Different kinds of
238 tubes were used in this context, such as a PGA tube³⁰, poly(methyl methacrylate) (PMMA)
239 tube³¹, poly(vinyl chloride) (PVC)³¹, etc. Watanabe *et al*³² developed a biotube by
240 subcutaneously implanting a silicone rod of 3mm diameter into rabbits for 2 months. In their
241 previous study, the resultant biotube was described as an autologous connective tissue of 76
242 \pm 37 μ m of thickness, composed of collagen and fibroblasts³³. This biotube was then
243 evaluated in a carotid implantation model in the same rabbit, for 26 months.
244 Histomorphological analyses of explanted grafts showed the absence of neointimal
245 thickening. The luminal surface was entirely covered with PECAM-1 positive ECs, under
246 which α -SMA positive cells and elastic fibers were found. Also, these α -SMA positive cells

247 and collagen were remarkably oriented. Although these results seem promising, this study
248 focused more on the manufacturing protocol than on the arterial implantation, since the
249 latter was achieved in only one rabbit. Results need to be confirmed in a larger study
250 including more animals with a control group. In 2016, the same fabrication approach was
251 performed *in vivo* by Rothuizen *et al* in pigs³⁴. Rods were subcutaneously implanted for 4
252 weeks and harvested with the surrounding tissue. The biotubes produced were principally
253 composed of collagen (type I and III) and glycosaminoglycans. Despite an important graft
254 wall colonization mostly by fibroblasts and leukocytes, no endothelium-like layer was
255 observed. 8 TEVGs have been studied in 4 female Landrace pigs (bilateral carotid artery
256 interposition) for 4 weeks. After 4 weeks of vascular integration, 7/8 grafts were still patent.
257 The described occlusion was presumably due to a pre-anastomotic intimal hyperplasia which
258 was absent in the contralateral graft. Histological analyses of the integrated graft have
259 shown an increase in the wall thickness and an acquisition of a contractile phenotype by
260 fibroblasts. Interestingly, a confluent layer of lectin positive cells on the graft luminal surface
261 was present, which may suggest a graft endothelialization had occurred during vascular
262 integration. However, the major inconvenience of this “biotube” technique remains the long
263 *in vivo* maturation period and the complicated transposition for clinical application. To
264 overcome these limits, very recently, Yamanami *et al*³⁵ used the same principle by testing
265 biotube cellularization in Beagle dogs for 4 weeks. After explantation, biotubes were
266 decellularized and stored at -20°C for 1 week. Before implantation, decellularized grafts
267 were treated with a direct thrombin inhibitor - argatroban, to confer antithrombogenic
268 properties to the graft. Grafts were then implanted at the infrarenal abdominal aorta in
269 three adult male Wistar rats. At 1-month post-implantation, grafts were still patent and
270 seemed to be infiltrated by host cells. However, the tested grafts were only 1cm long. To
271 meet clinical needs, longer grafts should be tested in larger animal models and in different
272 implantation sites to evaluate their patency over long periods.

273

274 **Substitutes using allogeneic cells**

275 In order to address the issue of small-diameter vascular substitutes, numerous studies have
276 included allogeneic cells in the fabrication protocol of TEVG. The main advantage of these
277 cells is the possibility of obtaining a “ready-to-use” cellularized graft. However, two
278 limitations arise: (1) the host immunological reaction towards foreign cells and (2) the
279 storage conditions of cellularized grafts before their use. Different solutions are proposed to
280 overcome these obstacles and to produce readily available “universal” small vascular grafts.
281 Various models are described in the literature, such as grafts manufactured directly using
282 modified or unmodified allogeneic cells, or using several cell types of mixed allogeneic and
283 autologous sources. Moreover, some authors are trying to provide an “off the shelf” graft by
284 promoting allogeneic cells to produce their own ECM that will constitute the graft’s scaffold.
285 The latter will be subjected to a decellularization step and can be recellularized with patient
286 autologous cells just before the implantation. This approach provides a “personalized”
287 cellularized graft for the patient¹⁸.

288

289 **Conventional production approaches by a single cellularization step**

290 TEVGs using allogeneic cells can be produced directly by a single “simple cellularization”.
291 Several cell types have been evaluated, such as bone marrow mononuclear cells (BMNCs),
292 EPCs, SMCs, ECs and induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)³⁶. Modified cells were also used

293 in order to enhance the proliferation capacity of allogeneic cells (which decline with the
294 donor age) or to confer antithrombogenic properties to the used cells.

295

296 ***Bone Marrow Mononuclear cells (BMMCs)***

297 The BMMCs population is known to have a differentiation potential in both endothelial and
298 smooth muscle cells, meaning they are widely used in VTE³⁷. To create their own small
299 diameter vascular graft, Roh *et al*³⁸ used commercial human BMMCs (hBMMCs) that were
300 suspended into a fibrin gel solution and seeded onto a biodegradable Polyglycolic Acid–Poly-
301 L-Lactide and -ε-Caprolactone (PGA-P(CL/LA)) scaffold (with an internal diameter of 0.7 mm
302 and a wall thickness of 250 μm)³⁹. The *in vivo* study consisted of an inferior vena cava
303 interposition into 3-4 month-old female SCID/bg mice for up to 24 weeks. At the end of the
304 study, 9 of 10 seeded grafts were still patent. Histological analysis has shown an endothelial
305 cell layer at the luminal surface and two layers of smooth vascular cells. However, cells
306 composing the graft were exclusively from murine origin. Authors have suggested that the
307 graft colonization by host cells was mediated by MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-
308 1) released by hBMMCs. The MCP-1 release led to monocyte infiltration and to inflammatory
309 mechanisms involved in blood vessel formation and remodeling. Regarding the
310 immunodeficient small animal model used, results do not allow the evaluation of the grafts
311 immunological state. Indeed, several extensive studies are required to assess the host
312 immune response triggered towards the graft. Furthermore, hBMMCs have not shown
313 expected results concerning their differentiation potential into vascular cells in order to
314 remodel the graft. This may be due to the inappropriate animal model used, lacking
315 immunomodulatory cells that may be involved in blood vessel remodeling.

316 In an another study, Fukunishi *et al*⁴⁰ tested a PGA-PLCL TEVG (inner diameter of 1 mm) in an
317 inferior vena cava interposition model in C57BL/6 mice for 6 months. Seeded grafts were
318 studied in comparison with unseeded grafts to determine the role of BMMCs. Grafts were
319 seeded with allogeneic BMMCs and harvested from donor mice, followed by a perfusion of
320 the cell suspension into the scaffold lumen for 10 min. Seeded grafts were then incubated
321 overnight at 37°C prior to the implantation. At the end of the study, 9 of 10 seeded grafts
322 remained patent. Moreover, this study demonstrated that the BMMCs seeding prevented
323 the graft narrowing and stenosis that were observed in unseeded grafts. This phenomenon
324 seems to be mediated by a macrophage modulation and a prevention of platelet activation,
325 induced by seeded BMMCs. This study complements other studies that have reached clinical
326 trials for arteriovenous grafts with an inner diameter of 10mm and could provide a new
327 cellularization approach for next generation grafts.

328

329 ***Mesenchymal Stem Cells (MSCs)***

330 In addition to their differentiation potential into vascular phenotypes, MSCs exhibit
331 important immunomodulatory capacities, such as T cell^{41,42}, the generation of a regulatory T
332 cell population and the modulation of Natural Killer cells (NK) and macrophage responses⁴³.
333 In order to demonstrate the antithrombogenic potential of MSCs, Hashi *et al*⁴⁴ produced a
334 cellularized small TEVG by seeding human bone-marrow MSCs on an electrospun
335 nanofibrous membrane for 1 day. This cellularized membrane was then rolled and sutured
336 around a 0.7mm diameter mandrel. After removal of the mandrel, the graft was kept in
337 culture for two days and then implanted for up to 60 days as a common carotid artery
338 replacement in 6-8 week athymic rats. Results suggested that MSCs can modulate the host
339 inflammatory response by preventing platelet adhesion and aggregation. These cells also

340 showed antithrombogenic capacities by decreasing platelet aggregation (similar to ECs
341 capacity) compared to unseeded graft controls. This was supported by a low and stable
342 intimal thickening in seeded grafts 1 month post-implantation, whereas a significantly higher
343 thickening of the vascular wall was observed in unseeded implanted grafts. Both unseeded
344 and seeded grafts showed an efficient recruitment of host ECs and SMCs which led to an
345 organized layered vascular wall similar to a native artery. The data seems to demonstrate a
346 short-term engraftment activity and efficacy of MSCs which are rarely found 2 months post-
347 implantation. MSCs appear to have beneficial effects, making them a promising cell source
348 to consider in VTE. MSCs seeded grafts should be further evaluated under more challenging
349 conditions, with immunocompetent larger animal models, longer implantation periods and
350 at different implantation sites. Moreover, a more in-depth analysis regarding the fate of
351 MSCs in the graft would also be interesting in order to understand their specific effects on
352 the vascular wall remodeling, the recruitment of host cells, the modulation of the
353 inflammation induced by the graft and their *in vivo* differentiation potential.
354 Inspired by the human coronary artery structure, a study has described a TEVG produced by
355 an innovative approach, involving the deposition of layers of cell-laden hydrogel, by
356 combining a dip-spinning technology with a solution blow spinning device (dip-spinning-SBS
357 technology) within 30 minutes⁴⁵. The substitute wall was composed of BM-MSC cellularized
358 gelatin hydrogels and PCL fibers which were automatically arranged to reproduce the J-
359 shaped mechanical response and compliance of human coronary arteries. Preliminary *in vivo*
360 tests were conducted in 6 rabbits, as a carotid replacement model, divided into three
361 groups: animals receiving cellularized grafts, animals receiving acellularized grafts and a
362 control group consisting of an incision-anastomosis. Histological studies were performed at
363 14 days and 30 days post-implantation to particularly observe the graft remodeling.
364 Although a thrombus development was observed in both grafts (cellularized and
365 acellularized), complete vascular wall remodeling was achieved at only 30 days in
366 cellularized grafts. This study encourages the consideration of MSCs for TEVG cellularization
367 as they prevent inflammation and promote graft remodeling after implantation.
368 MSCs seem to be a promising cell source for VTE⁴⁶. These cells are preferentially harvested
369 from bone marrow, but they are also found abundantly in many other tissues such as dental
370 pulp, adipose tissues, or perinatal tissues. For VTE, MSCs derived from perinatal sources,
371 such as the Wharton's jelly of the umbilical cord, may be an appropriate cell type for
372 vascular tissue engineering applications. Wharton's jelly derived MSCs (WJ-MSCs) have all
373 the characteristics of MSCs, possess a more primitive phenotype than other mature MSCs
374 and their use is totally safe as they do not induce teratoma formation⁴⁷. They were shown to
375 differentiate towards vascular phenotypes⁴⁸⁻⁵⁰. Moreover, for VTE purposes, our team has
376 already shown that WJ-MSCs subjected to an endothelial differentiation, conserved their
377 immunomodulatory properties after differentiation and remained immunosuppressive by
378 inhibiting the proliferation of T cells, reducing the toxicity of NK cells and generating a
379 population of regulatory T cells⁵¹.

380

381 ***Muscle derived stem cells (MDSCs)***

382 Muscle derived stem cells (MDSCs) have also been integrated in the cellularization protocol
383 of some TEVGs. MDSCs are known for their high proliferation rates, a low expression of
384 major histocompatibility complex class I and their *in vivo* and *in vitro* multilineage
385 differentiation potentials towards muscle, neural and endothelial cells⁵². Nieponice *et al*⁵³,
386 compared three different TEVGs: (1) unseeded Poly(ester urethane)urea biodegradable

387 tubular scaffolds produced by thermally induced phase separation (unseeded TIPS PEUU), (2)
388 TIPSS PEUU seeded with MDSCs (TIPS-PEUU) and (3) a MDSC seeded graft manufactured by
389 combining TIPS with an electrospinning technique (ES-TIPS PEUU). Autologous MDSCs were
390 isolated, labelled by transfection with the LacZ reporter gene (to allow their post-
391 implantation detection) and amplified, before being seeded on grafts of 15 mm length and
392 1.5 mm inner diameter, with a rotational vacuum seeding device⁵⁴. Grafts were then
393 cultured for 48 hours under agitation. After 8 weeks of implantation in a rat aorta
394 interposition model in Lewis rats, results reported that 73% of seeded TIPS PEUU grafts
395 showed signs of stenosis or aneurysmal dilatations and 65% of ES-TIPS PEUU were patent
396 without aneurysms, whereas only 10% of unseeded TIPS PEUU grafts remained patent.
397 Grafts were colonized by host cells, with vWF positive cells at the luminal surface and cells
398 with a contractile phenotype in the graft tissue. Moreover, a few transfected cells were still
399 found in the grafts. Thus, the ES-TIPS PEUU construct produced by double processing
400 techniques could provide a promising solution for VTE. However, further analyses are
401 required in larger animal models with an adaptation of the construction protocol to meet
402 the clinical requirements.

403

404 ***iPSCs***

405 iPSCs are among cells that have been investigated by several teams for the cellularization of
406 small-caliber TEVG. Hibino *et al*⁵⁵ have used commercial male mouse iPSCs that were
407 differentiated into sheets of ECs and SMCs, before being seeded onto PGA-P(CL/LA) with a
408 diameter of 0.8 mm. This graft was implanted as an infrarenal inferior vena cava in female
409 SCID/bg mice. After 10 weeks of implantation, all grafts were still patent with no signs of
410 aneurysms or calcification. Immunohistological analysis of collected grafts revealed the
411 gradual loss of the originally seeded cells and their replacement by host ECs at their luminal
412 surface and SMCs at the inner layer. Wang *et al*⁵⁶ have also described an *in vivo* study where
413 the TEVG were cellularized with iPSCs derived from primary human aortic fibroblasts which
414 differentiated into proliferative SMCs. The cell seeding was carried out by an incubation of
415 24 h on PLLA scaffold. The vascular graft was placed in the subcutaneous pocket into nude
416 mice for up to 2 weeks. This study has not evaluated the graft capacities and function but
417 has explored an original approach, allowing the obtention of a personalized TEVG using the
418 patient autologous cells.

419 Although iPSCs seem to be a very promising source for new therapeutic strategies and
420 regenerative medicine, due to the major ethical concerns around the use of embryonic stem
421 cells, their use is still debated. Human iPSCs are produced with poor efficiency, moreover,
422 the reprogramming protocols involve viral vectors that lead to safety issues for clinical
423 applications⁴⁸. In addition, even after differentiation, a residual presence of undifferentiated
424 cells represents a high risk of tumorigenicity that may lead to the development of teratomas
425 and malignant tumors, which affects their safety for human medical applications⁵⁷.

426

427 ***Multicell spheroid (MultiCS)***

428 Bio-printing is a biomedical application using the principles of 3D printing to artificially
429 produce living biological tissue. Bio-printing is a fast-growing field today because its
430 potential applications are vast and promising in the medical field as well as in research⁵⁸.
431 Itoh *et al* have used this technology to produce a TEVG in four days by assembling 500
432 multicell spheroids as a tube of 1.5 mm inner diameter and 7 mm in length⁵⁹. These MultiCS
433 (size of $615 \pm 51.3 \mu\text{m}$) were randomly composed of commercial human umbilical vein

434 endothelial cells (40%), human aortic smooth muscle cells (10%) and human dermal
435 fibroblasts (50%). The tubular construct was matured in a bioreactor with a triple medium
436 mix for 4 days under an increasing perfusion rate. It was then integrated in an abdominal
437 aorta replacement model in nude rats for a period of 2 to 5 days. At the end of the study,
438 ECs that were originally integrated into MultiCS were found at the luminal surface of the
439 graft, forming an intima-like layer. Interestingly, an increase of the graft inner diameter was
440 also observed. Although the immunodeficient model is essential to avoid immune rejection
441 when using mature adult cells, it did not allow investigations into TEVG safety and the
442 interactions between MultiCS and the host immune cells, in addition to the potential
443 modulation of the host inflammatory response. Moreover, the graft length was only 7mm
444 which is incompatible with clinical applications (bypasses, vessel replacement, arteriovenous
445 fistula, etc.). As already mentioned for other studies, this graft should be adapted for clinical
446 use regarding its length and the origin of the integrated cells. A deeper characterization
447 should be conducted around its safety, its patency and efficiency.
448

449 In the VTE field, allogeneic cells are widely studied. In fact, the cell type is an essential and
450 determining criterion in the construction of TEVG with regard to the required functionality.
451 TEVG with mature ECs and SMCs are still in the preliminary study phases, in which nude
452 animals are used to allow the observation of the graft development once integrated into the
453 blood circulation. However, several problems inherent to the use of mature cells are to be
454 considered. First of all, mature cells cultured *in vitro* over long periods present the risk of
455 dedifferentiation⁶⁰. Moreover, in allogeneic implantation models, they may induce a strong
456 host immune response against the foreign graft. In order to allow advanced studies in the
457 context of allogeneic implantations in immunocompetent animals, undifferentiated stem
458 cells are more appropriate. BMNCs seem to be a potential suitable candidate for TEVG
459 cellularization because of their differentiation potential into both types of vascular cells.
460 However, BMNCs are a heterogenous population composed of a large mix of cells, among
461 them EPCs, ECs, MSCs, hematopoietic stem cells, T cells and B cells, which induce complex
462 interactions with host cells that are difficult to fully decipher and understand. This excessive
463 heterogeneity could be a real obstacle for potential clinical applications where total control
464 of the graft production is required, as well as a complete understanding of graft-host
465 interactions. Several homogeneous stem cells populations possess the same differentiation
466 potential as MDSCs or MSCs. Only a few studies on MDSCs are found in the literature
467 compared to MSCs, which seem to be more appropriate for TEVG production. Indeed, their
468 use could be more relevant since they have a homogeneous population, having adhesion
469 capacity and differentiation potentials into both SMCs and ECs. Moreover, these cells are
470 easily harvested from different tissues and are known to have important
471 immunomodulatory properties which can be relevant to modulate the host immune system
472 and avoid the graft rejection in the case of allogeneic cells⁶¹.
473

474 **Innovative cell-mediated production approaches**

475 VTE combines cells, biomaterials and a suitable microenvironment for the production of
476 small-caliber TEVG and aims to optimize the graft cellularization together with the
477 biomechanical signals and scaffold structure. As described above, many studies have
478 proposed the cellularization of a scaffold which will then be matured and implanted.
479 Besides, other teams have developed innovative approaches to address several problems
480 related to the TEVG production time and storage. The major challenge with cellularized

481 TEVG is to find a suitable system and the combination of appropriate conditions for their
482 storage without affecting the cell viability or the scaffold structure.

483

484 ***Off-the-shelf graft***

485 Several teams are trying to produce a “ready-to-use” and storable graft that can be
486 implanted in any patient, i.e. a “universal” or “off-the-shelf” graft. In order to propose such a
487 graft, Tranquillo’s team has developed a decellularized graft originally composed by
488 synthetic ECM⁶². They evaluated this original approach in several *in vivo* bypass models as a
489 femoral bypass in sheep for 24 weeks⁶³ and more recently as an arteriovenous bypass in
490 baboons for up to 6 months⁶⁴. In the last study, the graft was manufactured by seeding
491 commercial human dermal fibroblasts into a bovine fibrinogen solution. The cell suspension
492 was then injected into a tubular mold carrying a glass mandrel. Grafts were then cultured for
493 2 weeks and matured in a bioreactor for 3 supplementary weeks⁶². After maturation, grafts
494 were decellularized and then stored in PBS at 4°C. Grafts implanted as arteriovenous fistulas
495 in baboons were evaluated by ultrasound assessments at 1, 2, 3 and 6 months, then scanned
496 by angiography at the end of the study, just prior to collection. Graft patency rates were
497 estimated at 83% at 3 months and 60% at 6 months. Moreover, an increase of the graft
498 diameter was observed. This was probably induced by a remodeling of the graft tissue by
499 vimentin and/or α -SMA positive cells and the colonization of the luminal surface by CD31
500 positive cells. However, some early thrombosis problems have been detected, probably due
501 to the implantation site which has been changed to address these events in eight baboons.
502 This led to a considerable reduction of the cohort. Results are promising and are similar to
503 actual clinical solutions for arteriovenous fistula based on an ePTFE substitute. This model,
504 although encouraging, is not representative of the small-diameter vessel bypass clinical
505 situations, where grafts are subjected to challenging conditions like the blood pressure, the
506 resistance to sutures and mechanical strains.

507

508 ***“Precast graft”***

509 The use of autologous cells is limited by the lengthy manufacturing time, which may be
510 incompatible with the clinical situation of the patient. In order to reduce the production
511 delay, Quint *et al*¹⁸ have proposed a storable decellularized graft which can be recellularized
512 with autologous cells. Here, the graft was tested in a porcine carotid replacement model for
513 a period of 30 days. A 4 mm diameter PGA mesh scaffold was seeded with a suspension of
514 porcine aortic SMCs for 10 weeks under pulsatile conditions. The graft was then
515 decellularized. Two cells sources were studied for the recellularization, either autologous ECs
516 or EPCs, which were seeded onto the graft under pulsatile and rotational conditions for 2
517 hours, followed by 2 hours of static culture. The graft was then preconditioned in a
518 bioreactor under a progressively increasing shear stress for 4-5 days. Three EPC-seeded
519 grafts and 2 EC-seeded grafts were implanted and compared with a control group of three
520 unseeded grafts and another control group consisting of 8 internal jugular veins. All the
521 seeded grafts were still patent at 30 days post-implantation compared to 3 control grafts
522 (0/3 unseeded graft and 3/8 internal jugular veins). Unseeded grafts implantations have
523 confirmed that the recellularized “precast graft” did not induce substantial inflammation.
524 Moreover, a slow host cell colonization of the seeded graft matrix was highlighted by the
525 presence of α -actin positive cells into the graft wall. In addition, tissue remodeling was also
526 observed on the luminal surface where seeded cells were partially replaced by host ECs.
527 Although the “precast graft” innovative approach seems to reduce the time required for the

528 TEVG development, there is still a considerable amount of time for the patient autologous
529 cell culture, plus 6 days of seeding and preconditioning. Moreover, the authors did not set
530 up and define the storage conditions of their TEVG, which is one of the main criteria of this
531 promising approach.

532 A relatively similar approach is reported by Dahl *et al*⁶⁵, by seeding a PGA scaffold with
533 allogeneic canine SMCs (harvested from carotid and femoral arteries) for 7 to 10 days,
534 followed by a decellularization step. The decellularized matrix was then washed and stored
535 at 4°C. The endothelialization step was performed by a fibronectin coating of the luminal
536 surface of the TEVG followed by an autologous EC seeding under rotational conditions. The
537 graft was then matured before implantation, by an increased shear stress preconditioning in
538 a bioreactor for 35 hours. The potential alterations of the grafts due to the storage
539 conditions have been studied by mechanical characterizations, before and after a period of
540 12 months storage in PBS at 4°C. After this storage period, no significant change was
541 observed for burst pressure, compliance or suture strength. Eight grafts have been tested *in*
542 *vivo* in dog models as follows: 5 in a carotid bypass model for up to 12 months and 3 grafts in
543 a coronary bypass model for up to 1 month. During the study, two animals died with a
544 patent graft and only one graft occluded at 1 week. Despite the histological analysis showing
545 an incomplete EC coverage of the grafts luminal surface, 5 out of 6 grafts remained patent
546 until the end of the study. Patent grafts showed a considerable remodeling, notably by α -
547 smooth muscle actin cells presumably derived from adjacent native vasculature.

548
549

550 CLINICAL TRIALS

551 This part of the review focuses on TEVGs with an inner diameter smaller than 6mm that have
552 progressed beyond the pre-clinical studies to phase I clinical trials and discusses the
553 reported results as well as the encountered obstacles. Several medium (6-8 mm) and large (>
554 8 mm)-diameter TEVGs have reached clinical trials such as the one of 8 mm of diameter
555 developed by Olausson and colleagues consisting on a decellularized iliac artery seeded with
556 autologous ECs and SMCs⁶⁶, and the graft of 18 mm of diameter produced by Shin'oka *et al.*
557 by autologous mononuclear BMCs seeded on a polymer tube⁶⁷. Nevertheless, due to their
558 specific clinical contexts, different from the problematic of this review, they will be excluded
559 from this part of the review.

560

561 The most commonly used model in clinical trials is the arteriovenous fistula model, which
562 allows the graft to be evaluated under non-lethal conditions. Moreover, this is a clinical
563 situation in which TEVG would be of a great interest since the substitutes currently used are
564 expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE). In fact, ePTFE have a limited lifespan due to the
565 damage of the graft wall by numerous punctures, thrombosis, infections and intimal
566 hyperplasia in the long term⁶⁸. However, the mechanical behavior, i.e. the blood pressure
567 applied to TEVG in an arteriovenous shunt model, is much less compared to that found in
568 other potential applications of the graft in blood vessel bypass grafting models, which makes
569 it difficult to evaluate its effectiveness and performance under more challenging conditions.

570

571 **Endothelialized synthetic graft**

572 Following *in vivo* pre-clinical studies on dogs⁶⁹ and non-human primates⁷⁰, the first clinical
573 trial performed with a TEVG was between 1989 and 1991⁷¹. The study evaluated an

574 endothelialized ePTFE graft in a femoropopliteal bypass model in 49 patients, in whom
575 saphenous vein bypass was not applicable⁷¹. ECs were harvested from the right external
576 jugular vein. An ePTFE graft with a diameter of 6 mm and a length of 60 cm was precoated
577 with fibrin glue and seeded with autologous ECs, by filling the lumen with the cell suspension
578 under rotation for 3 hours. Then, the graft was implanted after 11.6 ± 3.0 days of a
579 maturation period. Graft patency was determined by duplex sonography and Doppler
580 ultrasonography after 9 days, 3 months, 6 months and 1 year of implantation. After 32
581 months, patency rates were estimated at 84.7% for endothelialized grafts versus 55.4% for
582 control non-endothelialized grafts. This endothelialized ePTFE TEVG was then included in a
583 more generalized study involving 310 patients over a period of 15 years. Patients were
584 divided into two groups, one group having a TEVG with a diameter of 6 mm, the other
585 receiving a 7mm diameter graft. The 6 mm diameter graft group has shown patency rates of
586 62% at 5 years and 55% at 10 years, versus 78% and 71%, respectively, for the 7 mm
587 diameter group⁷². Histological analysis of occluded grafts suggested that occlusions were not
588 induced by an endothelialization defect but by large inflammatory foci located under the
589 endothelium, causing a hyperplastic narrowing. Overall, the study demonstrates the interest
590 of the integration of a VTE procedure as a routine therapy and confirms the benefit of
591 autologous endothelialization of ePTFE grafts in clinical cases of infrainguinal bypass where
592 no autologous vein is available. Major limitations of this graft include the use of an ePTFE
593 synthetic scaffold that forms a static structure, preventing any possibility of growth and
594 thereby excluding the graft use in a pediatric context. Moreover, the cellularization by
595 autologous ECs implies several inconveniences, such as the invasive collection of cells and
596 the long-term *in vitro* culture that may increase the risk of contamination and loss of EC
597 phenotype⁷³.

598

599 ***The Humacyte graft***

600 Before performing clinical trials with the “Humacyte graft”, which is a complete “off the
601 shelf” small caliber graft, Niklason and her team tested a preliminary version of their TEVG
602 using harvested human aorta SMCs. This graft has been evaluated in a baboon model of
603 arteriovenous bypass for 1 to 6 months and has presented a patency rate of 88%⁶⁵.
604 This Humacyte graft, a “human acellular vessel” (HAV), was produced by seeding human
605 SMCs onto a biodegradable polymer scaffold (PGA) of 32 to 45 cm in length, for 8 weeks. The
606 construction was matured in a bioreactor, applying pulsatile cyclic distension to allow the
607 expansion of cells and the synthesis of their own ECM. The graft was then decellularized in
608 order to obtain a tube of secreted ECM composed of different matrix proteins, such as
609 collagens (I and III), fibronectin and vitronectin.

610 In 2014, enrolment of phase II trials (USA and Poland) was completed and 60 patients with
611 end-stage renal disease (not candidates for fistula) had been grafted with the HAV
612 “Humacyte graft” as an arteriovenous bypass for a period of 16 or 24 months⁷⁴. The patency
613 rates were checked by intraoperative ultrasound or Doppler and were valued at 63% and
614 28% at 6 and 12 months, respectively (mostly due to thrombosis). The graft diameter
615 increased during the implantation and reached 8.63 mm. During the clinical trial, some grafts
616 at 16 to 55 weeks were collected after surgical revision procedures. Histological analysis
617 revealed that at 16 weeks, the region near the vein anastomosis was colonized by myocytic
618 cells expressing CD68 and α SMA conjointly or separately, including myofibroblasts from
619 surrounding tissue. The endothelialization of the graft was demonstrated by the detection of
620 cells expressing CD31, VE-Cadherin and eNOS at the luminal surface. At 46 weeks, the

621 presence of these cells in the middle of the collected grafts seems to confirm that this
622 phenomenon occurs from circulating blood and not from native adjacent vasculature. These
623 two clinical studies have been extended to include 240 patients with a follow-up until 200
624 weeks⁷⁵. Further histopathological analyses were conducted on collected grafts at different
625 implantation times during the study to evaluate the HAV *in vivo* remodeling. These studies
626 have revealed a tissue remodeling similar to that observed during embryonic vasculogenesis,
627 which was characterized by the presence of Nestin+/CD34+ cells in the vascular wall at early
628 stages. The number of these cells had decreased over time during implantation. In
629 conclusion, the permeability results obtained with the “Humacyte” graft are substantially
630 similar to those obtained with endothelialized ePTFE grafts. Despite its mechanical
631 characteristics, similar or even superior to those of mammary arteries or saphenous veins, it
632 suffers from the same shortcomings as synthetic grafts regarding repeated punctures.
633 Indeed, several pseudoaneurysms were mentioned during these studies which are well-
634 known complications of dialysis access with fistula or grafts.

635

636 ***The Lifeline graft***

637 L’Heureux and his team have developed an allogeneic small vascular graft called the “Lifeline
638 graft” through “Sheet-Based Tissue Engineering” (SBTE). The TEVG was developed as follows:
639 autologous fibroblasts were cultured and expanded, then the sheet of fibroblasts was
640 decellularized (by dehydration) and rolled up around a tube for ten weeks, in order to
641 obtain a homogenous cylinder. Another sheet of autologous fibroblasts was then used to
642 cover the cylinder and the graft was kept in culture for a further 10 weeks. Autologous ECs
643 were seeded into the graft several days before implantation (3-7 days), during which the
644 graft was submitted to an increasing pulsatile flow in a bioreactor^{76,77}. This graft was
645 clinically tested in an arteriovenous shunt model in 10 end-stage renal disease patients.
646 Patency rates were 78% and 60% at 1 and 6 months, respectively. The principal
647 inconvenience of this autologous graft is the production time which reaches up to 26 weeks.
648 Considering this limitation, the authors have recently proposed a SBTE graft with a shorter
649 production time, manufactured with only allogeneic fibroblasts without ECs at the luminal
650 surface⁷⁸. This allogeneic graft was tested in the same model of hemodialysis access in three
651 patients. Despite the nuclear debris that remained in the graft’s outer layer after
652 decellularization, this study has shown that the Lifeline allogeneic graft did not induce
653 deleterious immune responses. Grafts were implanted for up to 11 months, during which no
654 aneurysms were detected, however surgical interventions were required to ensure
655 secondary patency (2/3) and only one graft was patent for 7 months. These disappointing
656 results could be due to an incomplete endothelialization of the graft which could have more
657 severe consequences in coronary or peripheral bypass models. Currently, L’Heureux and
658 colleagues are working on a new TEVG manufactured with a “textile approach”, also based
659 on an ECM fibroblast sheet which is transformed into ribbons⁷⁹. These ribbons are actually
660 threads used to produce a TEVG of a diameter of 4.2 mm which is resistant to burst
661 pressure. The first study on its immunogenicity and efficacy was carried out in a sheep
662 carotid bypass model for 1 day and did not induce any complications.

663 **CONCLUSION**

664 Currently, vascular replacement techniques using synthetic substitutes are successfully used
665 for the replacement of large and medium diameter arteries. However, these substitutes are
666 not suitable for the replacement of small diameter arteries (< 6 mm), principally due to a

667 compliance mismatch and a lack of endothelialization of their luminal surface, leading to
668 thrombotic events. Thus, one of the greatest challenges in VTE is to develop and propose to
669 cardiovascular surgeons an effective endothelialized vascular prosthesis able to replace
670 small diameter arteries.

671 Since the first TEVG produced in 1986, the field of VTE seems devoted to a strong
672 development and has never stopped to evolve, in order to create the “gold standard”,
673 “readily available”, “off-the-shelf” TEVG.

674 Recellularization of TEVG is one of the major factors that contributes to a better patency in a
675 clinically relevant context¹³. As previously discussed, cells are widely used in the
676 development of a small caliber TEVG, in order to confer them with essential capacities that
677 determine their success, such as hemocompatibility, patency, contractility, remodeling,
678 growth or robustness. However, it should be noted that the cell types used in the TEVG
679 manufacturing protocols are highly variable and can be from xenogeneic, allogeneic or
680 autologous sources (summarized in Table 1), depending on the context of use of the TEVG.
681 Indeed, there is no standardization or recommendation for the “best” cell origin, type and
682 phenotype, allowing the development of the “perfect” TEVG. Although several cell types
683 appear to be suitable for use in VTE, MSCs seem to be a promising choice for several
684 reasons, such as their differentiation potential into vascular cells, their relatively easy
685 collection and their immunomodulatory properties, allowing them to avoid immune
686 rejection after transplantation.

687 When using autologous cells, the cellularization of TEVG involves several issues, such as the
688 very long production time, high manufacturing costs and the storage conditions for
689 allogeneic grafts. The storage factor can be addressed by a decellularization step after ECM
690 production. Grafts tested in the last two described clinical trials were developed according to
691 this method and appear to be efficient as arteriovenous shunts. However, the use of these
692 TEVGs in other arterial bypass contexts, such as coronary or femoral arteries bypasses, have
693 still not been evaluated, even though these are among the most challenging situations for
694 demonstrating the performance of a vascular graft.

695 In addition, grafting technology is in constant progress. In fact, robotic surgery is potentially
696 the most advanced medical technology and has been well documented in recent years^{80,81}.
697 In the long term, minimally-invasive robotic surgery should be accessible and performed for
698 bypass surgeries on a daily basis. Thus, the development of a “gold standard” TEVG could
699 supply a bank of ready-to-use grafts that would be available to cardiovascular surgeons.

700 In conclusion, our review shows the large heterogeneity of data produced in the study of
701 cellularized small-diameter TEVG. This reflects the important need of small-diameter grafts
702 and the considerable progress made in the VTE field in order to address this issue. However,
703 this huge amount of data complicates the TEVG efficiency evaluation and the choice of the
704 best development approach. There is an urgent need for standard guidelines for developing
705 and testing TEVG in large animal models, at least regarding the cell type used for the
706 recellularization. This would allow a proper comparison of the different strategies for the
707 production of vascular grafts. The journey for finding the “gold standard” TEVG is on track to

708
709

succeed, but there is still a long way to go for both research and clinical applications in the VTE field.

| <i>Authors</i> | <i>Year</i> | <i>Ref</i> | <i>Scaffold</i> | <i>Cells</i> | <i>Autologous/ Allogeneic</i> | <i>Animal Model</i> | <i>Implantation Site</i> |
|-----------------------------------|-------------|------------|---|---|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|
| <u>Preclinical studies</u> | | | | | | | |
| <i>Ma et al</i> | 2017 | 19 | Fetal pig decellularized aortae | ECs | <i>Autologous</i> | Dog | Carotid |
| <i>Kaushal et al</i> | 2001 | 21 | Pig decellularized iliac artery | EPCs | <i>Autologous</i> | Sheep | Carotid |
| <i>Tillman et al</i> | 2012 | 22 | Pig decellularized carotid artery | EPCs | <i>Autologous</i> | Ovine | Arteriovenous shunt |
| <i>Neff et al</i> | 2011 | 23 | Pig decellularized carotid artery | ECs + SMCs | <i>Autologous</i> | Pig | Carotid |
| <i>Koch et al</i> | 2010 | 24 | Fibrin scaffold supported by a poly(L/D)lactide 96/4 (P(L/D)LA 96/4) mesh | ECs + SMCs | <i>Autologous</i> | Sheep | Carotid |
| <i>Ju et al</i> | 2017 | 25 | Electrospun bilayered scaffold | EPCs + SMCs | <i>Autologous</i> | Sheep | Carotid |
| <i>McIlhenny et al</i> | 2015 | 28 | Human decellularized saphenous vein | ASCs --> ELCs | <i>Autologous</i> | Rabbit | Aortae |
| <i>Watanabe et al</i> | 2011 | 32 | Silicone rod | Biotube | <i>Autologous</i> | Rabbit | Carotid |
| <i>Rothuizen et al</i> | 2016 | 34 | Polymer rod | Biotube | <i>Autologous</i> | Pig | Carotid |
| <i>Yamanami et al</i> | 2019 | 35 | Silicone rod | Biotube | <i>Autologous</i> | Dog | Aortae |
| <i>Roh et al</i> | 2010 | 38 | Biodegradable PGA-P(CL/LA) | hBMMCs | <i>Allogeneic</i> | SCID/bg mice | Inferior vena cava |
| <i>Fukunishi et al</i> | 2018 | 40 | PGA-PLCL | mouse BMMCs | <i>Allogeneic</i> | C57BL/6 mice | Inferior vena cava |
| <i>Hashi et al</i> | 2007 | 44 | Electrospun nanofibrous membrane | hBM-MSCs | <i>Allogeneic</i> | Athymic rat | Carotid |
| <i>Akentiew et al</i> | 2019 | 45 | Dip spinning + solution blow spinning | hBM-MSCs | <i>Allogeneic</i> | Rabbit | Carotid |
| <i>Nieponice et al</i> | 2010 | 53 | ES-TIPS PEUU | rat MDSCs iPSCs --> ECs + SMCs | <i>Allogeneic</i> | Rat | Aortae |
| <i>Hibino et al</i> | 2012 | 55 | PGA-P(CL/LA) | | <i>Allogeneic</i> | SCID/bg mice | Inferior vena cava |
| <i>Wang et al</i> | 2014 | 56 | PLLA | iPSCs --> SMCs HUVECs + hSMCs + hFibroblasts | <i>Allogeneic</i> | Nude mice | Subcutaneous pocket |
| <i>Itoh et al</i> | 2015 | 59 | Multicell spheroid approach | | <i>Allogeneic</i> | Nude rat | Aortae |
| <i>Syedain et al</i> | 2017 | 64 | Bovine fibrinogen solution | hFibroblast | <i>Allogeneic</i> | Baboon | Arteriovenous shunt |
| <i>Quint et al</i> | 2011 | 18 | PGA mesh + porcine SMCs matrix | EPCs or ECs | <i>Autologous</i> | Pig | Internal jugular vein |
| <i>Dahl et al</i> | 2011 | 65 | PGA scaffold + canine SMCs matrix | ECs | <i>Autologous</i> | Dog | Carotid + Coronary bypass |
| <u>Cinical trials</u> | | | | | | | |
| <i>Zilla et al</i> | 1994 | 71 | PTFE scaffold | ECs | <i>Autologous</i> | Human | Femoropopliteal bypass |
| <i>Lawson et al</i> | 2016 | 74 | PGA scaffold + SMCs matrix | Decellularized | | Human | Arteriovenous shunt |
| <i>McAllister et al</i> | 2009 | 77 | Autologous fibroblast matrix | ECs | <i>Autologous</i> | Human | Arteriovenous shunt |
| <i>Wystrychowski et al</i> | 2014 | 78 | Allogeneic fibroblast matrix | Decellularized | | Human | Arteriovenous shunt |

710

Table 1. Overview of in vivo studied small diameter TEVG produced by using cells. (ECs: Endothelial Cells; EPCs: Endothelial Progenitor Cells; SMCs: Smooth Muscle Cells; ASCs: Adipose Stem Cells; ELCs: Endothelial-Like Cells; hBMMCs: human Bone Marrow Mononuclear Cells; hBM-MSCs: human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; MDSCs: Muscle Derived Stem Cells; iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells; HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells; TEVG: Tissue Engineered Vascular Graft)

REFERENCES

1. Writing Group Members *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**, e38-360 (2016).
2. Roth, G. A. *et al.* Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1333–1341 (2015).
3. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
4. Pashneh-Tala, S., MacNeil, S. & Claeysens, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev* (2015) doi:10.1089/ten.teb.2015.0100.
5. Antoniou, G. A. *et al.* A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoropopliteal arterial disease. *J. Vasc. Surg.* **57**, 242–253 (2013).
6. Conte, M. S. Critical appraisal of surgical revascularization for critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* **57**, 8S-13S (2013).
7. Melly, L., Torregrossa, G., Lee, T., Jansens, J.-L. & Puskas, J. D. Fifty years of coronary artery bypass grafting. *J Thorac Dis* **10**, 1960–1967 (2018).
8. Song, H.-H. G., Rumma, R. T., Ozaki, C. K., Edelman, E. R. & Chen, C. S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell* **22**, 340–354 (2018).
9. Radke, D. *et al.* Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater* **7**, e1701461 (2018).
10. Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K. & Mantovani, D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol* **10**, 410–421 (2013).
11. Deutsch, M., Meinhart, J., Fischlein, T., Preiss, P. & Zilla, P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* **126**, 847–855 (1999).
12. Weinberg, C. B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**, 397–400 (1986).
13. Skovrind, I. *et al.* Concise Review: Patency of Small-Diameter Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Meta-Analysis of Preclinical Trials. *Stem Cells Transl Med* (2019) doi:10.1002/sctm.18-0287.
14. Yau, J. W., Teoh, H. & Verma, S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders* **15**, 130 (2015).
15. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. M. J. & oude Egbrink, M. G. A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **454**, 345–359 (2007).
16. Ma, J. & Huang, C. Composition and Mechanism of Three-Dimensional Hydrogel System in Regulating Stem Cell Fate. *Tissue Engineering Part B: Reviews* (2020) doi:10.1089/ten.teb.2020.0021.
17. Dan, P., Velot, É., Francius, G., Menu, P. & Decot, V. Human-derived extracellular matrix from Wharton’s jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater* **48**, 227–237 (2017).
18. Quint, C. *et al.* Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 9214–9219 (2011).
19. Ma, X. *et al.* Development and in vivo validation of tissue-engineered, small-diameter vascular grafts from decellularized aortae of fetal pigs and canine vascular endothelial cells. *J Cardiothorac Surg* **12**, 101 (2017).

20. Swartz, D. D. & Andreadis, S. T. Animal models for vascular tissue-engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **24**, 916–925 (2013).
21. Kaushal, S. *et al.* Functional Small Diameter Neovessels using Endothelial Progenitor Cells Expanded Ex Vivo. *Nat Med* **7**, 1035–1040 (2001).
22. Tillman, B. W. *et al.* Bioengineered vascular access maintains structural integrity in response to arteriovenous flow and repeated needle puncture. *J. Vasc. Surg.* **56**, 783–793 (2012).
23. Neff, L. P. *et al.* Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J. Vasc. Surg.* **53**, 426–434 (2011).
24. Koch, S. *et al.* Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials* **31**, 4731–4739 (2010).
25. Ju, Y. M. *et al.* Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study. *Acta Biomater* **59**, 58–67 (2017).
26. Tschoeke, B. *et al.* Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Eng Part A* **15**, 1909–1918 (2009).
27. McIlhenny, S. E. *et al.* Linear shear conditioning improves vascular graft retention of adipose-derived stem cells by upregulation of the alpha5beta1 integrin. *Tissue Eng Part A* **16**, 245–255 (2010).
28. McIlhenny, S. *et al.* eNOS transfection of adipose-derived stem cells yields bioactive nitric oxide production and improved results in vascular tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **9**, 1277–1285 (2015).
29. Ormond, K. E. *et al.* The clinical application of gene editing: ethical and social issues. *Per Med* **16**, 337–350 (2019).
30. Chue, W.-L. *et al.* Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *J. Vasc. Surg.* **39**, 859–867 (2004).
31. Nakayama, Y., Ishibashi-Ueda, H. & Takamizawa, K. In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube). *Cell Transplant* **13**, 439–449 (2004).
32. Watanabe, T. *et al.* Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **98B**, 120–126 (2011).
33. Watanabe, T., Kanda, K., Ishibashi-Ueda, H., Yaku, H. & Nakayama, Y. Autologous small-caliber ‘biotube’ vascular grafts with argatroban loading: a histomorphological examination after implantation to rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **92**, 236–242 (2010).
34. Rothuizen, T. C. *et al.* Development and evaluation of in vivo tissue engineered blood vessels in a porcine model. *Biomaterials* **75**, 82–90 (2016).
35. Yamanami, M. *et al.* Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications. *Artif Organs* **43**, 773–779 (2019).
36. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76 (2006).
37. Krawiec, J. T. & Vorp, D. A. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: a review. *Biomaterials* **33**, 3388–3400 (2012).
38. Roh, J. D. *et al.* Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *PNAS* **107**, 4669–4674 (2010).
39. Roh, J. D. *et al.* Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model. *Biomaterials* **29**, 1454–1463 (2008).

40. Fukunishi, T. *et al.* Formation of neoarteries with optimal remodeling using rapidly degrading textile vascular grafts. *Tissue Eng Part A* (2018) doi:10.1089/ten.TEA.2018.0167.
41. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).
42. Djouad, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102**, 3837–3844 (2003).
43. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. & Papamichail, M. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS* **24**, 74–85 (2006).
44. Hashi, C. K. *et al.* Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11915–11920 (2007).
45. Akentjew, T. L. *et al.* Rapid fabrication of reinforced and cell-laden vascular grafts structurally inspired by human coronary arteries. *Nature Communications* **10**, 1–15 (2019).
46. Afra, S. & Matin, M. M. Potential of mesenchymal stem cells for bioengineered blood vessels in comparison with other eligible cell sources. *Cell Tissue Res* (2020) doi:10.1007/s00441-019-03161-0.
47. Jyothi Prasanna, S. & Sowmya Jahnavi, V. Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells as Off-The-Shelf Cellular Therapeutics: A Closer Look into their Regenerative and Immunomodulatory Properties. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal* **4**, (2011).
48. Rammal, H. *et al.* Stem cells: a promising source for vascular regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* **23**, 2931–2949 (2014).
49. El Omar, R. *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* **20**, 523–544 (2014).
50. Bajpai, V. K. & Andreadis, S. T. Stem Cell Sources for Vascular Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* **18**, 405–425 (2012).
51. El Omar, R. *et al.* Immunomodulation of endothelial differentiated mesenchymal stromal cells: impact on T and NK cells. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 342–356 (2016).
52. Qu-Petersen, Z. *et al.* Identification of a novel population of muscle stem cells in mice. *J Cell Biol* **157**, 851–864 (2002).
53. Nieponice, A. *et al.* In vivo assessment of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable elastomeric scaffold and muscle-derived stem cells in a rat model. *Tissue Eng Part A* **16**, 1215–1223 (2010).
54. Soletti, L. *et al.* A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* **27**, 4863–4870 (2006).
55. Hibino, N. *et al.* Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **143**, 696–703 (2012).
56. Wang, Y. *et al.* Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPSC cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* **35**, 8960–8969 (2014).
57. Doss, M. X. & Sachinidis, A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* **8**, (2019).
58. Fricain, J.-C. *et al.* Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *Med Sci (Paris)* **33**, 52–59 (2017).
59. Itoh, M. *et al.* Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. *PLoS ONE* **10**, e0136681 (2015).

60. Buttery, L. D. K. & Bishop, A. E. 18 - Introduction to tissue engineering. in *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering* (eds. Hench, L. L. & Jones, J. R.) 193–200 (Woodhead Publishing, 2005). doi:10.1533/9781845690861.4.193.
61. Weiss, A. R. R. & Dahlke, M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* **10**, (2019).
62. Syedain, Z. H., Meier, L. A., Bjork, J. W., Lee, A. & Tranquillo, R. T. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials* **32**, 714–722 (2011).
63. Syedain, Z. H., Meier, L. A., Lahti, M. T., Johnson, S. L. & Tranquillo, R. T. Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Eng Part A* **20**, 1726–1734 (2014).
64. Syedain, Z. H. *et al.* A completely biological ‘off-the-shelf’ arteriovenous graft that recellularizes in baboons. *Sci Transl Med* **9**, (2017).
65. Dahl, S. L. M. *et al.* Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Sci Transl Med* **3**, 68ra9 (2011).
66. Olausson, M. *et al.* Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet* **380**, 230–237 (2012).
67. Shin’oka, T. *et al.* Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **129**, 1330–1338 (2005).
68. Roy-Chaudhury, P. *et al.* Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney Int.* **59**, 2325–2334 (2001).
69. Shindo, S., Takagi, A. & Whittemore, A. D. Improved patency of collagen-impregnated grafts after in vitro autogenous endothelial cell seeding. *Journal of Vascular Surgery* **6**, 325–332 (1987).
70. Zilla, P. *et al.* In vitro-lined endothelium: initial integrity and ultrastructural events. *Surgery* **116**, 524–534 (1994).
71. Zilla, P. *et al.* Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J. Vasc. Surg.* **19**, 540–548 (1994).
72. Deutsch, M. *et al.* Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J. Vasc. Surg.* **49**, 352–362; discussion 362 (2009).
73. Bachetti, T. & Morbidelli, L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res.* **42**, 9–19 (2000).
74. Lawson, J. H. *et al.* Bioengineered Human Acellular Vessels for Dialysis Access in Patients with End-Stage Renal Disease: Two Phase 2 Single-Arm Trials. *Lancet* **387**, 2026–2034 (2016).
75. Kirkton, R. D. *et al.* Bioengineered human acellular vessels recellularize and evolve into living blood vessels after human implantation. *Sci Transl Med* **11**, (2019).
76. L’Heureux, N. *et al.* Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* **12**, 361–365 (2006).
77. McAllister, T. N. *et al.* Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* **373**, 1440–1446 (2009).
78. Wystrychowski, W. *et al.* First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J. Vasc. Surg.* **60**, 1353–1357 (2014).
79. Magnan, L. *et al.* Human Textiles: a cell-synthesized yarn as a truly ‘bio’ material for tissue engineering applications. *Acta Biomater* (2020) doi:10.1016/j.actbio.2020.01.037.

80. Stadler, P., Dvoracek, L., Vitasek, P. & Matous, P. The da Vinci Robot in the Field of Vascular Surgery. *Journal of Vascular Surgery* **61**, 584 (2015).
81. Gong, W. *et al.* Robot-assisted coronary artery bypass grafting improves short-term outcomes compared with minimally invasive direct coronary artery bypass grafting. *J Thorac Dis* **8**, 459–468 (2016).

Figure legends

Figure 2. Fabrication approaches to produce a small diameter TEVG. Dotted frames represent optional steps found in the literature. *Cells can be seeded using cellularized gel or cell suspension. (TEVG: Tissue Engineered Vascular Graft ; HAV: Human Acellular Vessel; SBTE: Sheet-Based Tissue Engineering)

Table 1. Overview of in vivo studied small diameter TEVG produced by using cells. (ECs: Endothelial Cells; EPCs: Endothelial Progenitor Cells; SMCs: Smooth Muscle Cells; ASCs: Adipose Stem Cells; ELCs: Endothelial-Like Cells; hBMMCs: human Bone Marrow Mononuclear Cells; hBM-MSCs: human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; MDSCs: Muscle Derived Stem Cells; iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells; HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells; TEVG: Tissue Engineered Vascular Graft)

Acknowledgments

This work was supported by the “Fondation Recherche Médicale” No. 20170638051. We would like to thank the federation 3209 BMCT (Nancy, France) and the BioSE Doctoral scholarship for Adrien Fayon.

Author contributions

A.F. reviewed bibliography, wrote the manuscript, prepared the figure and the table; R.E. and P.M. reviewed bibliography and revised the manuscript

Competing interests

The authors declare no competing interests

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

What makes Human Wharton's jelly interesting as an innovative biomaterial in tissue engineering?

Adrien FAYON¹, Deborah HELLE¹, Gregory FRANCIUS², Jean-Baptiste VINCOURT^{1,3}, Véronique REGNAULT⁴, Dominique DUMAS¹, Patrick MENU*¹ & Reine El OMAR¹

¹Université de Lorraine, CNRS, IMoPA, F-54000 Nancy, France

²CNRS, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, Université de Lorraine, Villers-lès-Nancy, F-54600, France

³Université de Lorraine, CNRS, INSERM, IBSLor (UMS2008/US40), F-54000 Nancy, France

⁴INSERM U1116, Défaillance Cardiovasculaire Aigüe et Chronique, Université de Lorraine, Vandœuvre-Lès-Nancy, 54505, France

*Corresponding author

Keywords: Wharton's Jelly, Human Extracellular Matrix, Biomaterial, Coating, Tissue Engineering.

Abstract:

The extracellular matrix (ECM) offers the opportunity to create a biomaterial consisting of a microenvironment with interesting biological and biophysical properties for improving and regulating cell functions. Animal-derived ECM are the most widely used as an alternative to human tissues that are of very limited availability. However, incomplete decellularization of these tissues presents a high risk of immune rejection and disease transmission. In this study, we present an innovative human ECM derived from the Wharton's jelly (WJ-ECM) of umbilical cords as a novel biomaterial to be used in tissue engineering. WJ-ECM was very efficiently decellularized, suggesting its possible use in allogeneic conditions.

Characterization of its content allowed the identification of type I collagen as its main component. Various other matrix proteins, playing an important role in cell adhesion and proliferation, were also detected. WJ-ECM applied as a surface coating was analyzed by fluorescent labeling and atomic force microscopy. The results revealed a particular arrangement of collagen fibers not previously described in the literature. This biomaterial

also presented better cytobiocompatibility compared to the conventional collagen coating. Moreover, it showed adequate hemocompatibility, allowing its use as a surface with direct contact with blood. Taking these results together, our study proposes a novel human ECM as a very promising biomaterial with many potential applications in tissue engineering. Further characterization of the composition and functionality will help explore the ways it can be used in tissue engineering applications, especially as a scaffold or a surface coating.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

1 Disease or trauma to the human body leads to tissue damage and degeneration, requiring
2 repair, replacement or regeneration. Common methods of treatment include autologous
3 tissue grafts, donor tissue grafts and the use of biomaterials. Autologous tissue is an ideal
4 biological material, but unfortunately it is only available in limited quantities, the recovery
5 method can be invasive and often it may not be available due to the critical condition of the
6 patient or due to prior use. Tissues from living human or animal donors may be subject to
7 compatibility problems and risks of infection or rejection. In addition, allografts and
8 xenografts do not provide the cellular components and growth factors necessary for tissue
9 regeneration. Hence the need for tissue engineering, the ultimate goal of which is to restore
10 or even replace defective organs. Tissue engineering requires an optimal combination of
11 cells, scaffold(s) and a suitable microenvironment (medium, growth factors, mechanical
12 influences, etc.). To be used in tissue engineering, a scaffold should constitute a structure
13 that promotes cell colonization and interactions, and the formation of an extracellular
14 matrix (ECM), providing a structural support for the neofomed tissue. Ideally, it should be
15 porous, biocompatible, non-immunogenic and have appropriate mechanical properties
16 suitable for the implant. Biomaterials commonly used for scaffold fabrication in tissue
17 engineering include metals, ceramics and synthetic or natural polymers [1]. Although
18 synthetic polymers have several advantages (lack of immunogenicity, simple processing and
19 controllable mechanical properties), natural materials, such as ECM, are naturally bioactive,
20 biodegradable and are considered as surface ligands for cell adhesion [2,3]. Recently, natural
21 acellular ECM, derived from various tissues such as heart valves [4,5], blood vessels [6],
22 skeletal muscle [7], placenta [8] and skin [9], have been intensively studied as a “coating” for
23 the surface of “scaffolds”. The ECM of these organs and tissues constitutes a rich reservoir of
24 growth factors and bioactive molecules playing a role in cell adhesion, proliferation,
25 differentiation and migration. However, since most of the natural ECM used in tissue
26 engineering are derived from animals, plants or cadavers, problems of immunogenicity and
27 transmission of pathogens are increasingly observed [10], which reduces their applications.
28 In the present study, we focused on an ECM derived from neonatal human tissue (Wharton’s
29 jelly from umbilical cord) that could be a very promising tool for regenerative medicine and
30 tissue engineering fields [11].

1 Wharton's jelly (WJ) is a connective tissue found within the umbilical cord in which the two
2 umbilical arteries and the umbilical vein are anchored. Until a few years ago, it was
3 considered as a waste product and was discarded after birth. Very recently, interests in this
4 tissue and its potential applications have been intensively investigated, and several teams
5 have been working to better characterize it. This tissue, composed of different matrix
6 proteins, is relatively gelatinous and has the function, among others, of protecting the
7 umbilical vessels against compression and torsion [12]. WJ is essentially composed of an
8 ECM containing mainly various types of collagen (types I, III, IV and V), hyaluronic acid and
9 several proteoglycans (mainly decorin), proteins that play a major role in cell adhesion
10 [13,14]. This tissue is also a source of growth factors such as FGF (fibroblast growth factor),
11 IGF-1 (insulin growth factor- 1), PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal
12 growth factor) and TGF- β (transforming growth factor beta 1) playing a major role in
13 proliferation, cell differentiation, and the synthesis and remodeling of the ECM [15,16]. In
14 addition, WJ is easily isolated from the umbilical cord and is becoming increasingly central in
15 several fields of application in tissue engineering and regenerative medicine [17,18] such as
16 cartilage regeneration [19,20] dermal regeneration [21,22], vascular engineering [23], etc.
17 Thus, because of all these aspects mentioned above, WJ has been of particular interest for
18 several teams working in the field of tissue engineering. For example, the decellularized
19 form of this tissue has been proposed as a 3D porous scaffold [18]. The interest of this
20 support has consisted in its bioactivity which can support and optimize cellularization,
21 particularly in the context of cellularization by mesenchymal stem cells (MSC), the cell type
22 of choice in tissue engineering. This same principle has been studied in the promotion of
23 hepatic differentiation of reprogrammed human cells (hiPSC) [24], or more recently in the
24 context of regenerative therapy of intervertebral discs [25].

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 In order to propose an innovative biomaterial for tissue engineering fields, we have
49 developed a new method to obtain a decellularized Wharton's jelly extracellular matrix (WJ-
50 ECM) in a solution form compatible with the use as a surface "coating" having a positive
51 impact on cell behavior. This study describes a decellularization and extraction protocol for a
52 solution of WJ-ECM and validation of the decellularization efficiency and aims to better
53 characterize its proteomic content and profile its 3D conformation, physical properties, and
54 its biocompatibility.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Wharton's Jelly extracellular matrix (WJ-ECM)

Human umbilical cords were obtained from full term pregnancies and with the mother's consent in accordance with the Cell Therapy Unit of the University Hospital Center (CHRU) of Nancy (Authorization number: TCG/11/R/011). Umbilical cords were stored in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) at 4 °C until reception and processing at the laboratory. After extensive washing of the umbilical cord with phosphate buffered saline (PBS), its outer membrane was cut longitudinally to expose and remove the umbilical vessels. Then, the WJ was carefully isolated without taking the outer membrane of the umbilical cord and cut into small pieces (3–5 mm³). The collected tissue was then washed three times with PBS and dry-frozen at –80 °C. After slow defrosting, the WJ of three different umbilical cords was pooled to constitute one batch of WJ-ECM. Every pool of WJ was washed twice with 1 % PBS followed by three washes under stirring for 5 min with sterile deionized ultrapure water. Two volumes of acetic acid were then added to one volume of WJ and homogenized for 10 min with an Ultra-Turrax homogenizer (Yellowline by IKA), on ice. The suspension was left under stirring overnight at 4 °C and was finally centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 °C. At the end of the centrifugation, the supernatant was collected and stored at –20 °C. In this study, three different WJ-ECM pools (nine different umbilical cords) were analyzed, referred to as WJ-ECM A, WJ-ECM B and WJ-ECM C.

2.2. Characterization of WJ-ECM content

2.2.1. DNA quantification and nucleic acid electrophoresis

In order to proceed to the determination of the nucleic acids contents in each sample, DNA was extracted from the different samples using a Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (D4068, ZymoResearch). A native WJ tissue from each extracted ECM was conserved as a control for decellularization. Thus, two sample processing protocols were applied according to the sample state: DNA extraction from tissue for the native WJ, and from biological fluid for the WJ-ECM. Briefly, DNA extraction from the native WJ was done as follows: 25 mg of WJ was placed in a microtube to which 95 µL of distilled water, 95 µL of Solid Tissue Buffer and 10 µL of Proteinase K were added. The tube was then vortexed for 15 s and incubated for 5 h at 55 °C. The tube was then centrifuged for 1 minute at 14,000 g and the supernatant volume

1 was then transferred to a new tube. Two volumes of “Genomic Binding Buffer” were added
2 and the tube content was then vigorously vortexed.

3
4 For DNA extraction from WJ-ECM, 200 μ L of each WJ-ECM was placed in a microtube, to
5 which 200 μ L of Biofluid & Cell Buffer solution and 20 μ L of proteinase K were added. The
6 tube was then vortexed for 25 s and incubated for 10 min at 55 °C; 420 μ L of Genomic
7 Binding Buffer was then added to the digested samples and the tube content was mixed
8 vigorously.
9

10
11
12 After digestion, samples were transferred to Zymo-Spin™ IIC-XLR columns in a recovery tube
13 and then centrifuged for 1 min at 12,000 *g*. The column was then placed in a new recovery
14 tube and 400 μ L of DNA Pre-Wash Buffer was added into the column. The tube was then
15 centrifuged for 1 min at 12,000 *g*. Two washing steps were performed by adding,
16 respectively, 700 μ L and 200 μ L of g-DNA Wash Buffer followed by a 1 min centrifugation at
17 12,000 *g*. DNA was eluted by adding 75 μ L of DNA Elution Buffer and the mixture was
18 incubated for 5 min and centrifuged for 1 min at 12,000 *g*. The total amount of isolated DNA
19 was quantified using a Nanodrop One reading nanospectrophotometer (Thermo Scientific).
20 The digested products were also analyzed by gel electrophoresis (0.8 % [wt/vol] agarose in
21 Tris–acetate–EDTA buffer) and visualized with GelRed (Biotium, Hayward, CA).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 2.2.2. Relative Protein quantification

35 WJ-ECM protein content was evaluated by a BiCinchoninic acid assay (BCA; UP40840A,
36 Interchim). For preparation of the standard curve, bovine serum albumin (BSA; Sigma) was
37 diluted to 2 mg/mL, then serial dilutions ranging from 0 to 2 mg/mL were prepared.
38 Standards or samples (25 μ L) were added in triplicate to a clear-bottomed 96-cell plate;
39 200 μ L of the reagent solution (prepared by adding 1 volume of CuSO₄ to 50 volumes of BCA
40 solution) were added to each well. The plate was incubated for 30 min at 37 °C in the dark.
41 The optical density (OD) was measured at 570 nm using an automated plate reader
42 (Varioskan Flash®, Thermo Fisher Scientific).
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 This test does not allow the determination of collagen, the main protein of the WJ-ECM.
53 Indeed, this BCA assay is based on the optical detection of copper reduction mainly due to
54 four amino acids which are cysteine or cystine, tyrosine and tryptophan [26]. However,
55 collagen is a triple-helix protein composed of repeated sequences of glycine followed
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

frequently by proline or hydroxyproline [27]. Thus, the BCA assay shows a low affinity for the quantification of collagen present in a sample.

2.2.3. Collagen quantification

The collagen content of the ECM was quantified with a Total Collagen Assay Kit (perchlorate-free; ab222942, Abcam) and determined according to a standard curve. ECM samples were hydrolyzed by adding 10 N NaOH solution (1 v/1 v) for 1 h at 120 °C. After cooling on ice, 10 N HCl solution was added (1 v/1 v/1 v) to neutralize the pH of the solution. Samples were then centrifuged for 5 min at 10,000 g and supernatants were collected; 10 µL of supernatants was placed in a clear-bottomed 96-well plate and incubated at 65 °C in order to evaporate the extraction solution. The remaining crystals of each well were dissolved by adding 100 µL of Oxidation Reagent Mix (6 µL of chloramine T + 94 µL of oxidation buffer) for 20 min at room temperature. Developer (50 µL) was added to each reaction well and the plate was incubated at 37 °C for 5 min. DMAB Concentrate Solution (50 µL) was added to each well and the plate was incubated for 45 min at 65 °C. The OD of each well was measured at 560 nm using an automated plate reader (Varioskan Flash, Thermo Scientific, France).

2.2.4. Glycosaminoglycans (GAG) quantification

The GAG content of the extracted ECM was quantified using a spectrophotometric method and determined according to a standard curve. Standard dilutions were prepared by serially diluting a standard solution of chondroitin-6-sulfate (C4384-1G, Sigma) to 1 mg/mL with Tris buffer (50 mM, pH 8) in order to obtain these different concentrations: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 and 200 µg/mL. To prepare samples, 1 mL of each ECM was dried for 48 h in an incubator at 56 °C. They were then digested overnight at 60 °C in a 200 µL buffer solution (20 mM Na_2HPO_4 (28028.298, VWR), 1.4 mM EDTA (ED-5K, Sigma), 0.2 mM dithiothreitol (DTT; 43819-1G, Sigma)) to which was added 10 µL of a papain solution (6 mg/mL; P4762-100MG, Sigma). The reaction was stopped with 10 µL of 0.22 M iodoacetic acid solution (L328074 009, Merck) and 380 µL of Tris buffer (50 mM, pH 8). A 20 µL aliquot of each sample preparation and standard was placed in triplicate in a clear-bottomed 96-well plate. After adding 250 µL of Goldberg solution [made by dissolving 32 mg of 1,9-dimethylmethylene blue (DMB; 23481-50-7, Polysciences Inc.) in 5 mL of ethanol] to each

1 well, the OD of each well was measured at 525 nm using an automated plate reader
2 (Varioskan Flash, Thermo Scientific, France).
3
4

5 2.2.5. Mass spectrometry analysis 6

7 Aliquots (10 µg) of each WJ-ECM acidic batch were used. Triplicate aliquots were analyzed
8 for each pool. Volumes were equilibrated to 10 µL in 0.5 M acetic acid. Pepsin (100 ng;
9 Sigma) was added to allow overnight digestion at 4 °C. Thereafter, samples were dried for
10 2 h in a speed-vac evaporator (Eppendorf® Concentrator Plus), resuspended in 10 µL of 6 M
11 urea, 50 mM Tris, pH 8.0 and processed as follows: cysteine residues were reduced by
12 addition of 4 mM DTT for 45 min, then alkylated by addition of 40 mM iodoacetamide (IAA)
13 for another 45 min. The IAA reaction was blocked by adding another portion of 40 mM DTT
14 for 10 min. Then 90 µL of 100 mM Tris and 10 mM CaCl₂ were added together with 1/40th
15 (weight trypsin/weight protein extract) sequencing-grade trypsin (Promega) and digestion
16 was allowed to proceed overnight at 37 °C. Samples were acidified by addition of 5 µL of
17 10% trifluoroacetic acid. Samples were fractionated by nanoHPLC on an Ultimate3000
18 system equipped with a 20 µL sample loop, a pepMap 100 C18 desalting precolumn and a
19 15 cm pepMap RSLC C18 fractionation column (all from Dionex). Samples (5 µL) were
20 injected using the µL pickup mode and eluted by a 2% to 45% ACN gradient over 90 min at
21 300 nL/min. Fractions (226, 6 s each) were collected on a ProteinerFcell (Bruker) over
22 22.6 min and eluted fractions were directly mixed on MTP-1536 BC target (Bruker) spots
23 with α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker). LC-MALDI runs dedicated to peptide relative
24 quantification were processed using dedicated automatic methods piloted by WARP-LC
25 software on an Autoflex speed MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker), first in MS
26 mode in the 700–4500 mass range, using next-neighbor external calibration for all MALDI
27 spots. Relative quantification was performed from the MS analysis using ProfileAnalysis
28 software (Bruker) with time alignment and quantile normalization, requiring a minimal
29 bucket value of 3, to highlight significant changes between independent extracts (fold
30 changes above 2, *t*-test *p*-value < 0.05) and generate the corresponding Scheduled Precursor
31 Lists. Thereafter, the corresponding masses, as well as all masses *S/N* > 20 were processed
32 for MS/MS analysis in LIFT mode. Peptide assignments were performed from TOF/TOF
33 spectra by Mascot interrogation (Matrix Science) of the whole human database piloted in
34 Mascot and compiled by Proteinscape with a mass tolerance of 50 ppm in TOF mode and
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
0.8 Da in TOF/TOF mode, with optional cysteine carbamidomethylation, methionine and proline oxidation, and trypsin cut. The minimal Mascot score for peptides was set to 20 and that for proteins was set to 80. Results were cross-validated by interrogating an irrelevant database using the same criteria. Relative quantification data were exported to Proteinscape with the following alignment criteria: maximal time deviation, 2 min; maximal mass deviation, 0.03 Da. Protein change calculations were allowed from a minimum of two peptides passing relative quantification quality control as defined in ProfileAnalysis.

15 2.3. Evaluation of the WJ-ECM coating

16 2.3.1. Fluorescent labelling of primary amine residues of the WJ-ECM deposit

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
The WJ-ECM coating was evaluated by binding and staining the primary amine groups of ECM proteins using NH₂-sulfo-NSS-biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-biotin, 21331, Thermo Scientific). First, the WJ-ECM was incubated at 4 °C overnight under stirring with NH₂-NSS-biotin (at a concentration of 0.48 mg/mL). The link reaction was stopped by adding 50 mM Tris-Base solution. Labeled ECM-WJ (400 µL) was then deposited into triplicate wells in a clear-bottomed 24-well plate for 24 h at 37 °C. Each well was washed with deionized ultrapure water and incubated for 30 min at room temperature with Invitrogen streptavidin–AlexaFluor™ 488 conjugate (S11223, Thermo Fisher Scientific) at 1/200 dilution. After incubation, the coatings were washed with deionized water before imaging with epifluorescence microscopy (Leica DMI 3000B microscope). For confocal imaging, WJ-ECM was deposited on glass slides. Samples were observed with a Leica TCS SP5 X microscope.

2.3.2. Characterization of the surface coating by Atomic Force Microscopy

Before each measurement, fresh samples deposited on glass slides were intensively rinsed with Milli-Q water and then slowly and completely dried with nitrogen. AFM experiments were carried out using an MFP-3D-BIO instrument (Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany). The Peakforce-HIRS-SSB silicon nitride cantilevers used for these experiments were conical in shape and purchased from Olympus (Bruker). Experiments were performed in air at room temperature. AFM images were recorded at room temperature in contact mode. All images were collected with a resolution of 512 × 512 pixels at a scan rate of 1 Hz.

2.4. Cytocompatibility assays

The cytobiocompatibility of the WJ-ECM was evaluated with human mesenchymal stem cells derived from the Wharton's jelly (WJ-MSC) cultured on this coating for 12 days with medium renewal every 2 days. In order to compare the results obtained, a control condition was carried out consisting of a coating of collagen which is the most used ECM protein for cell culture (Collagen Type I Rat Tail, 354236, Corning). Briefly, to obtain this control coating, 400 μL of collagen at a concentration of 0.1 mg/mL was placed in a 24-well culture plate in triplicate. The plate was then incubated at 37 °C for 1 h before complete removal of the solution. Wells were intensively washed with 1 \times PBS before cell seeding.

2.4.1. WJ-MSC isolation and culture

WJ was also used in this study for its important content of MSC. WJ-MSC were mechanically collected by applying the explant method based on the ability of cells to migrate out of the tissue and adhere to the culture surface. Briefly, the WJ was isolated as mentioned above, then it was cut into approximately 5 mm pieces that were placed in a six-well culture plate and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ in a complete medium: α -MEM (BE12-169F, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; lot S132507, Dutscher), Fungizone (100 mg/mL; 11520496, Fischer), penicillin (100 IU/mL; P0781, Sigma) and L-glutamine (200 mM; G7513, Sigma). The culture medium was changed every 3 days until day 15 when WJ explants were removed from wells. hWJ-MSC were then trypsinized for 5 min at 37 °C (trypsin-EDTA 0.05%, Gibco), counted and seeded at a concentration of 1×10^5 cells/cm² in a T75 cell culture flask. Cells at that stage are at the first passage (P1). When reaching a confluence of approximately 90%, the trypsinization step is repeated until cells reach the third passage. The phenotype of the P3 WJ-MSC used in this study was confirmed by flow cytometry according to a panel of several positive and negative surface antigens (cluster of differentiation, CD) described for MSC, including: positive expression of CD90, CD73, CD44 and CD105 and a lack expression of CD45, CD34, HLA-DR and CD86 [28].

2.4.2. Cell metabolic activity

1 The metabolic activity of WJ-MSC was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
2 diphenyltetrazolium bromide) assay. Briefly, cells were seeded at a density of 1.5×10^3
3 cells/cm² onto a 24-well plate coated with WJ-ECM. After 1, 7 and 12 days of culture, the
4 2 mg/mL MTT solution (thiazolyl blue tetrazolium bromide; M2128-5G, Sigma) was added to
5 the wells containing 100 μ L of α -MEM medium and cells were incubated for 4 h at 37 °C. The
6 medium was then carefully removed, and formazan crystals were dissolved with 200 μ L of
7 dimethylsulfoxide (DMSO) for 5 min. A 100 μ L aliquot from each well was transferred to a
8 96-well plate in duplicate and the OD was measured at 550 nm using an automated plate
9 reader (Varioskan Flash, Thermo Scientific, France).
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 2.4.3. Coating cytotoxicity

20 The potential cytotoxicity of the coating was evaluated by measuring the lactate
21 dehydrogenase (LDH) released by WJ-MSC cultured on WJ-ECM using an LDH assay
22 Cytotoxicity Detection Kit^{plus} (04744934001, Roche) on hWJ-MSC at 1, 7 and 12 days. Cells
23 were seeded at a density of 1.5×10^3 cells/cm² onto a 24-well plate previously coated with
24 WJ-ECM. At each time point, triplicates of 100 μ L of each well were transferred to a 96-well
25 plate containing 100 μ L/well of the reaction solution (prepared by mixing 1 volume of
26 catalyst with 45 volumes of dye solution). After 20 min of incubation under stirring in the
27 dark at room temperature, the absorption was measured at 490 nm using an automated
28 plate reader (Varioskan Flash, Thermo Scientific, France). For each condition, an additional
29 well was used as a positive control for cytotoxicity. Cells in the control well were lysed by
30 incubation at 37 °C for 10 min with 20 μ L of Triton™ X-100 (T8787-50mL, Sigma) before the
31 cytotoxicity analysis. The percentage toxicity was then calculated for each condition and
32 normalized to the percentage obtained in the collagen coating condition.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

$$46 \left(1 - \left(\frac{X_{ECM}}{X_{ECM\ Death}} - \frac{X_{Collagen}}{X_{Collagen\ Death}}\right)\right) * 100$$

51 2.4.4. Cell proliferation

52 In parallel, at each time point, the total DNA of each sample was collected and quantified
53 using a Hoechst 33258 fluorescent dye assay (H3569, Invitrogen, France). Briefly, WJ-MSC
54 were cultivated on WJ-ECM coating in a 24-well plate. The culture medium was removed and
55 cells were lysed by three freeze–thaw cycles (liquid nitrogen to 37 °C water bath) in 100 μ L
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 of Hoechst buffer (Tris-base (10 mM); EDTA (1 mM); NaCl (0.1 M, pH 7.4). Hoechst solution
2 (900 μ L, 0.1 μ g/mL) was then added to each well. Samples were then placed in triplicate in a
3 96-well microplate for a fluorescence-based assay with a volume of 300 μ L for each well. The
4 fluorescence was measured with a microplate fluorescence reader (Varioskan Flash, Thermo
5 Scientific, France) at excitation/emission wavelengths, respectively, of 356 and 458 nm. The
6 number of viable cells per coating was calculated by extrapolation from an 8-point standard
7 curve generated with calf thymus DNA (D3664, Sigma).
8
9

15 2.5. Evaluation of WJ-ECM hemocompatibility by thrombin generation assay

17 Thrombin is a key enzyme of the coagulation cascade. Its measurement will give direct
18 information about the thrombogenicity of our biomaterial. This evaluation is required
19 according to ISO 10993-4/2002. A 96-well plate was coated with WJ-ECM as described
20 above. After rinsing the wells thoroughly with 1 \times PBS, 10 μ L of HEPES saline buffer (HBS) was
21 added to each well, as well as 40 μ L of human plasma (pool from three different donors) and
22 phospholipid vesicles (Avanti Polar Lipids, USA) at a final concentration of 4 μ mol/L.
23 Coagulation was triggered by adding recombinant human tissue factor (Innovin[®], Dade
24 Behring) at 1/30,000 dilution, and thrombin generation was monitored by quantification of a
25 fluorescent substrate specific to thrombin, P2Rho (Synapse B.V.), in a Fluoroskan Ascent
26 fluorometer (LabSystem). Thrombin generation was measured every 15 s for 50 min at
27 excitation and emission wavelengths of 390 and 460 nm, respectively. Results were then
28 analyzed in comparison with the same pool of plasma used as a control, with the dedicated
29 software Thrombinoscope[®] (Synapse, Maastricht), and expressed as the endogenous
30 thrombin potential (ETP, corresponding to the area under the generation curve), peak (the
31 maximal value of generated thrombin concentration) and velocity index (the effective rate of
32 thrombin generation between lag time and time to peak).
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 2.6. Statistical analyses

52 Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism Version 8. Normality was
53 verified by the Shapiro–Wilk test. Normally distributed data were then analyzed using one-
54 way analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s post hoc test, two-way ANOVA with
55 Bonferroni post hoc test, or unpaired *t*-test.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Differences between the groups with a probability value higher than 95% ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

3. Results

This study aimed to characterize a new ECM for potential use as a natural surface biological coating in the field of tissue engineering. The originality of this biomaterial is its human origin combined with easy, short and inexpensive extraction from umbilical cords.

The protocol applied on WJ to obtain the WJ-ECM is easily reproducible and is composed of two major steps. First the WJ was decellularized by SDS baths and washed several times. Proteins contained in the connective tissue were then extracted with acetic acid. This extraction protocol allows the solubilization and decellularization of the ECM from WJ and its use as a biocompatible surface coating promoting cell adhesion, viability and proliferation.

3.1. WJ-ECM DNA content

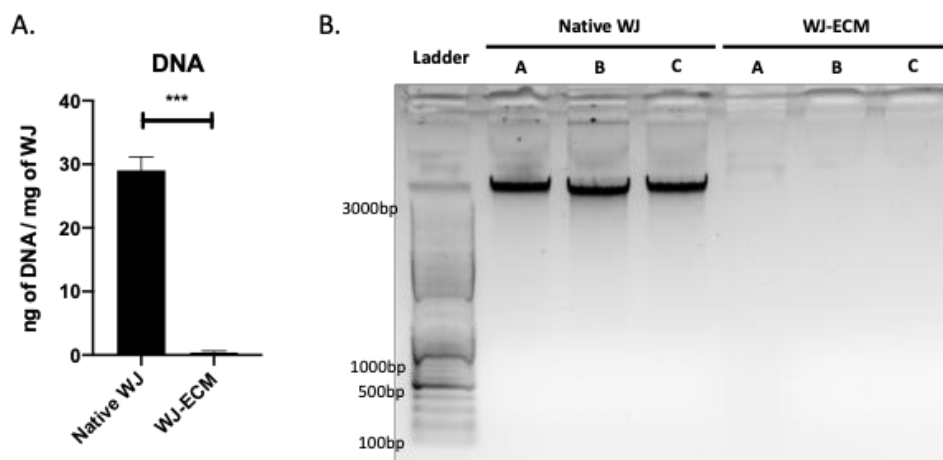


Fig. 1. Evaluation of the decellularization efficiency of WJ-ECM. (A) DNA quantification in native WJ and decellularized WJ-ECM. Results represent the mean of three different assays. (B) Acetic acid migration profile for the three native WJ and their respective decellularized WJ-ECM. Results are presented as the mean \pm SEM for each condition, and statistically analyzed following an unpaired t-test (p -value: *** < 0.001); $n = 3$.

The DNA content of the different WJ-ECM was determined and the results were compared to the amount of DNA found in the native tissue before extraction (Fig. 1). An average of 29 mg of DNA was identified for 1 mg of native WJ. This value decreased drastically in the decellularized extracted ECM, in which an average of 0.424 ng of DNA was found for 1 mg of WJ (Fig. 1A). This result was confirmed by nucleic acid electrophoresis showing the absence

of nucleic material in the three extracted WJ-ECM compared to their original native tissue (Fig. 1B).

3.2. WJ-ECM protein content

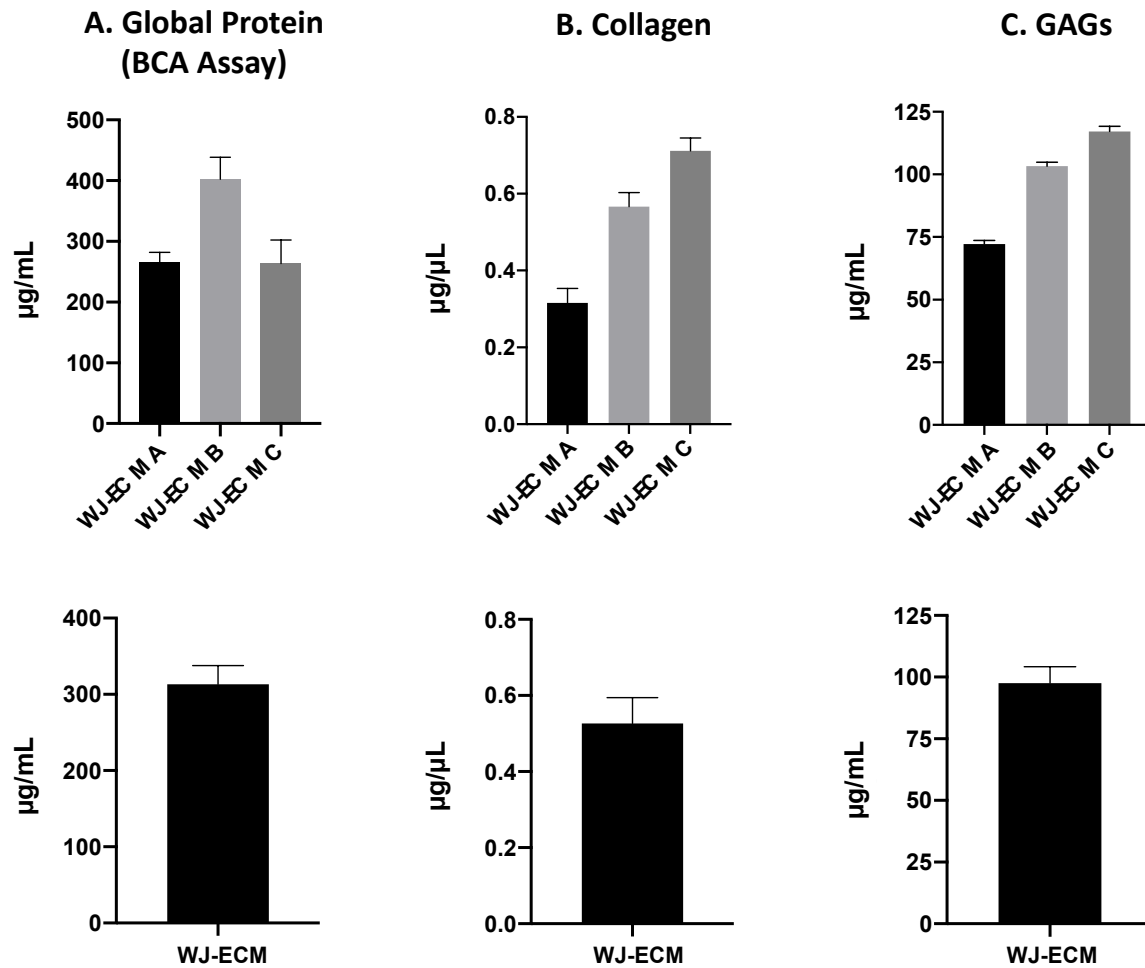


Fig. 2. Global protein, collagen and glycosaminoglycan (GAG) content of WJ-ECM. (A) Protein content for each pool of WJ-ECM (upper panel) and the corresponding mean values (lower panel). (B) Collagen content for each pool of WJ-ECM (upper panel) and the corresponding mean value (lower panel). (C) GAG content for each pool of WJ-ECM (upper panel), and the corresponding mean value (lower panel). For the upper panel, the results for each pool of WJ-ECM are presented as the mean of three replicates \pm SEM. For the lower panel, results are presented as the mean of the three pools of WJ-ECM \pm SEM.

To best characterize the protein content of our three pools of WJ-ECM, a first general protein quantification was performed using a BCA assay, allowing determination of the global protein content by quantification of cysteine or cystine, tyrosine and tryptophan residues. Thus, this assay strongly underestimates the collagen content which is principally composed of glycine, proline and hydroxyproline [26,27]. Thus, the three pools of ECM in our study contained an average of 309.1 $\mu\text{g/mL}$ of protein (A: 260.2 $\mu\text{g/mL}$; B: 402.4 $\mu\text{g/mL}$;

C: 264.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 2A). The dosage of soluble collagen allowed us to obtain an average collagen concentration of 0.592 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (A: 0.316 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; B: 0.749 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; C: 0.712 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Fig. 2B). Moreover, analysis of the content of GAGs in each ECM indicated their presence at an average concentration of 97.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (72.18, 103.3 and 117.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each of the different matrices, respectively) (Fig. 2C).

Table 1. Protein content identified by mass spectrometry analysis of the WJ-ECM pool. Results represents the mean of the values obtained for the three pools of WJ-ECM.

| <u>Row</u> | <u>Accession</u> | <u>Scores</u> | <u>Protein</u> | <u>Mass Weight</u> <u>(kDa)</u> | <u>#Peptides</u> |
|-------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|--|-------------------------|
| 1 | CO1A1_HUMAN | 4696.0 | Collagen alpha-1(I) chain | 138.9 | 87 |
| 2 | CO1A2_HUMAN | 3123.9 | Collagen alpha-2(I) chain | 129.2 | 54 |
| 3 | CO3A1_HUMAN | 2571.3 | Collagen alpha-1(III) chain | 138.5 | 46 |
| 4 | ACTH_HUMAN | 277.9 | Actin. gamma-enteric smooth muscle | 41.8 | 4 |
| 5 | LUM_HUMAN | 212.6 | Lumican | 38.4 | 5 |
| 6 | ACTB_HUMAN | 158.6 | Actin. cytoplasmic 1 | 41.7 | 3 |
| 7 | ALBU_HUMAN | 133.5 | Serum albumin | 69.3 | 4 |
| 8 | IGHG1_HUMAN | 87.9 | Ig gamma-1 chain C region | 36.1 | 3 |
| 9 | CO6A3_HUMAN | 85.4 | Collagen alpha-3(VI) chain | 343.5 | 2 |
| 10 | DERM_HUMAN | 41.5 | Dermatopontin | 24.0 | 1 |
| 11 | TAGL_HUMAN | 40.2 | Transgelin | 22.6 | 1 |
| 12 | PGS2_HUMAN | 37.8 | Decorin | 39.7 | 1 |

To better characterize the protein profile of our WJ-ECM, three aliquots from each pool of WJ-ECM were analyzed by mass spectrometry. The results show that for the three WJ-ECM pools, the main protein extracted from WJ was collagen, with a predominance of type I

followed by type III. Other proteins such as lumican, decorin, dermatopontin and transgelin were also identified, but to a lesser extent (Table 1).

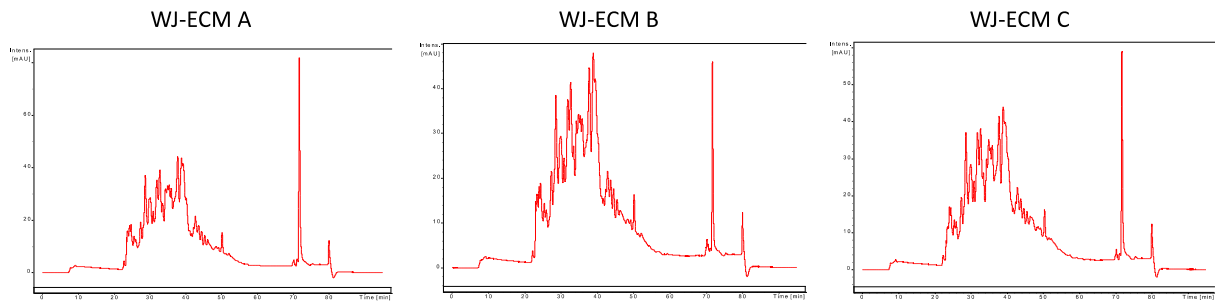


Figure 3. Nano HPLC profiles analysis of WJ-ECM composing the pool.

The amounts of these different proteins varied moderately between the three pools of WJ-ECM, highlighting the heterogeneity of the amount of protein contained in each of the analyzed WJ-ECM (Fig. 3).

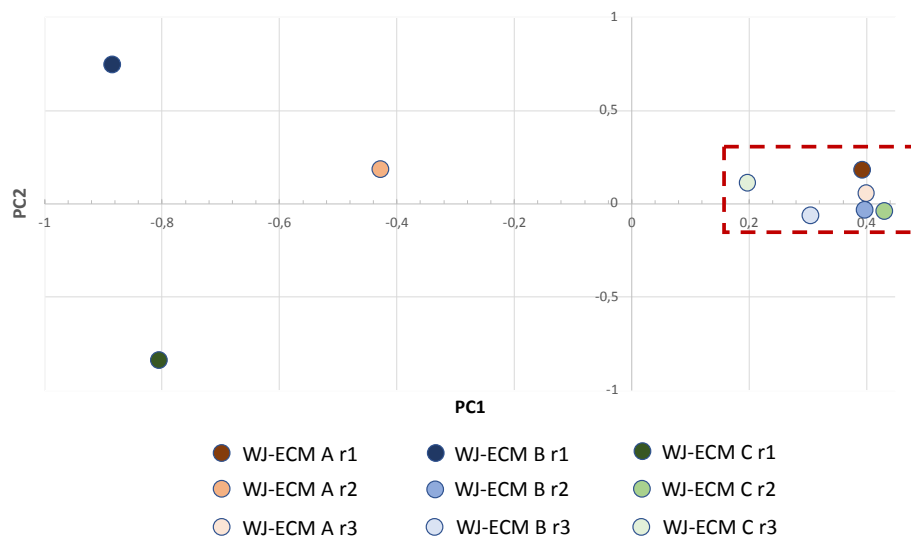
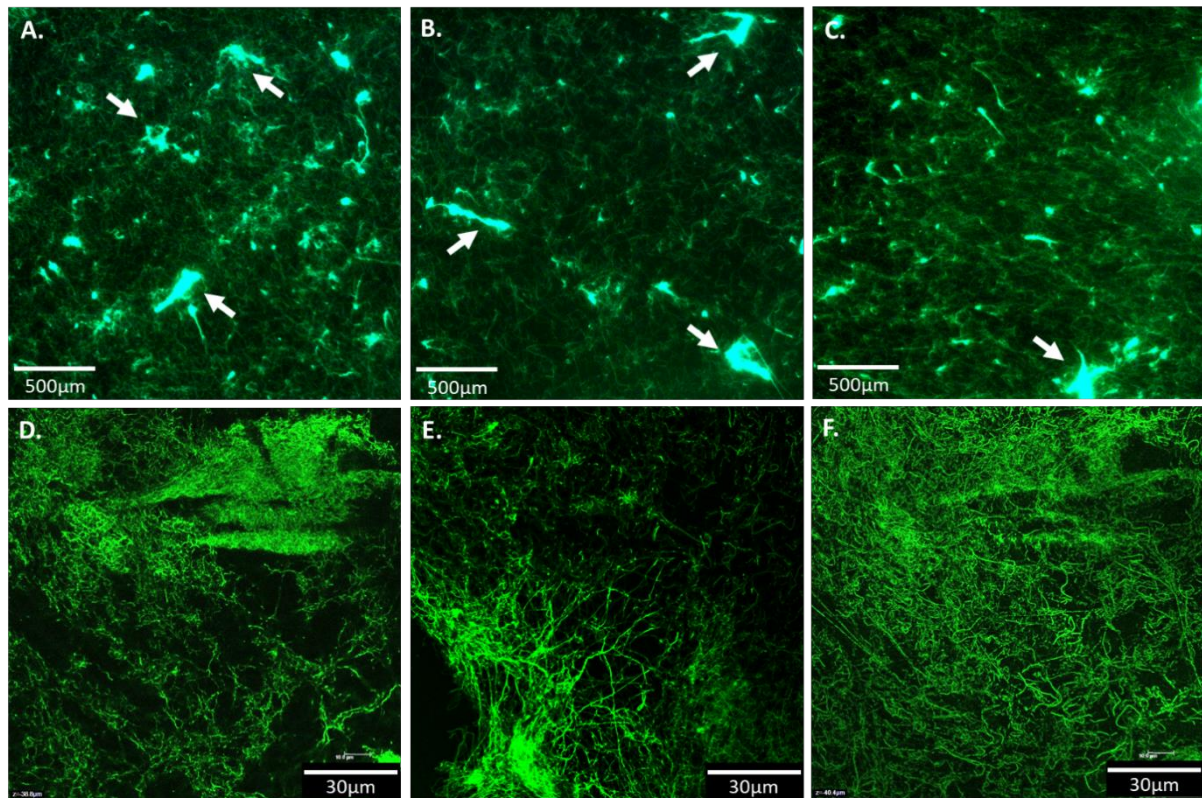


Fig. 4. Principal component analysis along two axes, reflecting the differences between the different replicates of each of the WJ-ECM composing the pool. The colored areas highlight the heterogeneity of the replicates obtained for each of the WJ-ECM (WJ-ECM A in orange, WJ-ECM B in blue and WJ-ECM C in green); the red square highlights the homogeneity of two replicates per sample among the three different WJ-ECM (r1: first replicate; r2: second replicate; r3: third replicate).

Principal component analysis of the mass did not suggest significant differences between the three ECM (nor between replicates if all variables are considered) (Fig. 4). In fact, this analysis allowed us to observe that two of the three replicates of each WJ-ECM are

1
2 remarkably close (area represented by the dashed red square), thus underlining the
3 homogeneity of the various WJ-ECM composing the pool. The quantitative analysis
4 highlights some proteins that vary between the three pools, notably serum albumin (data
5 not shown).
6
7
8
9

10 3.3. WJ-ECM coating observations



39 **Fig. 5.** Microscopic observations of WJ-ECM coating. (A, B, C) Epifluorescence images of WJ-ECM A, WJ-ECM B and WJ-ECM
40 C, respectively (aggregates are indicated with white arrows). (D, E, F) Confocal microscopy observations of WJ-ECM A, WJ-
41 ECM B and WJ-ECM C coating, respectively.
42

43
44 Labeling of the primary amine residues of WJ-ECM proteins allowed the visualization and
45 characterization of the deposit of the matrix used as a 2D surface coating.

46
47 The WJ-ECM coating formed an almost continuous layer as shown by epifluorescence
48 microscopy observations. The resulting deposit was observed as a dense network of
49 heterogeneous fibers with some aggregates (Fig. 5A–C). These observations were verified by
50 observation at higher resolution by confocal microscopy (Fig. 5D–F). Although the overall
51 shape of the deposit was identical for all three pools of WJ-ECM, differences were noted,
52 especially for the deposit of WJ-ECM C which showed a denser distribution of fibers.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

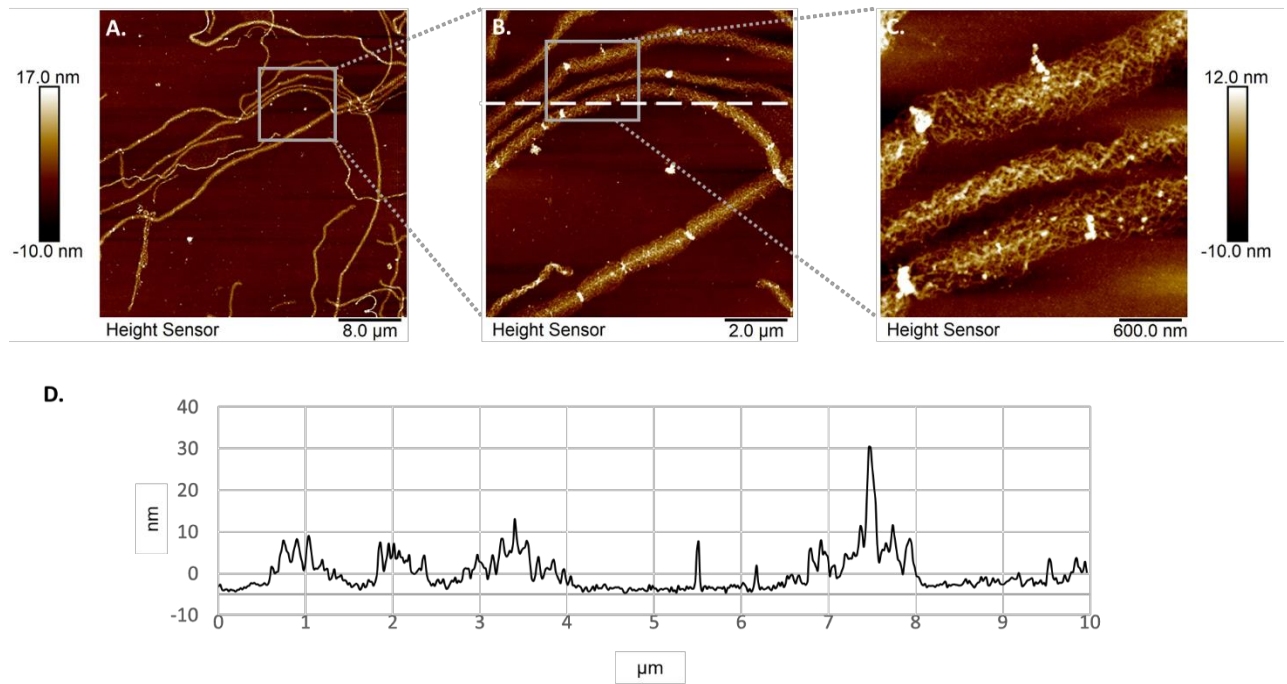


Fig. 6. Atomic force microscopy observations of fibers composing the WJ-ECM. (A, B, C) Height sensor acquisitions of fibers present in the WJ-ECM coating. (D) Cross-section analysis of height sensor acquisition B.

The optically observable fibers found in the WJ-ECM deposit were randomly arranged. However, AFM analysis, allowing a better resolution observation, showed that they were structured in the same way. Fibers were around 10 nm thick, 1 μm wide and showed asperities up to 40 nm. At higher resolution, the specific internal structure of these fibers can be observed. They seem to be the assembly of several smaller fibers arranged in a helicoidal manner (Fig. 6).

3.4. Biocompatibility of WJ-ECM coating

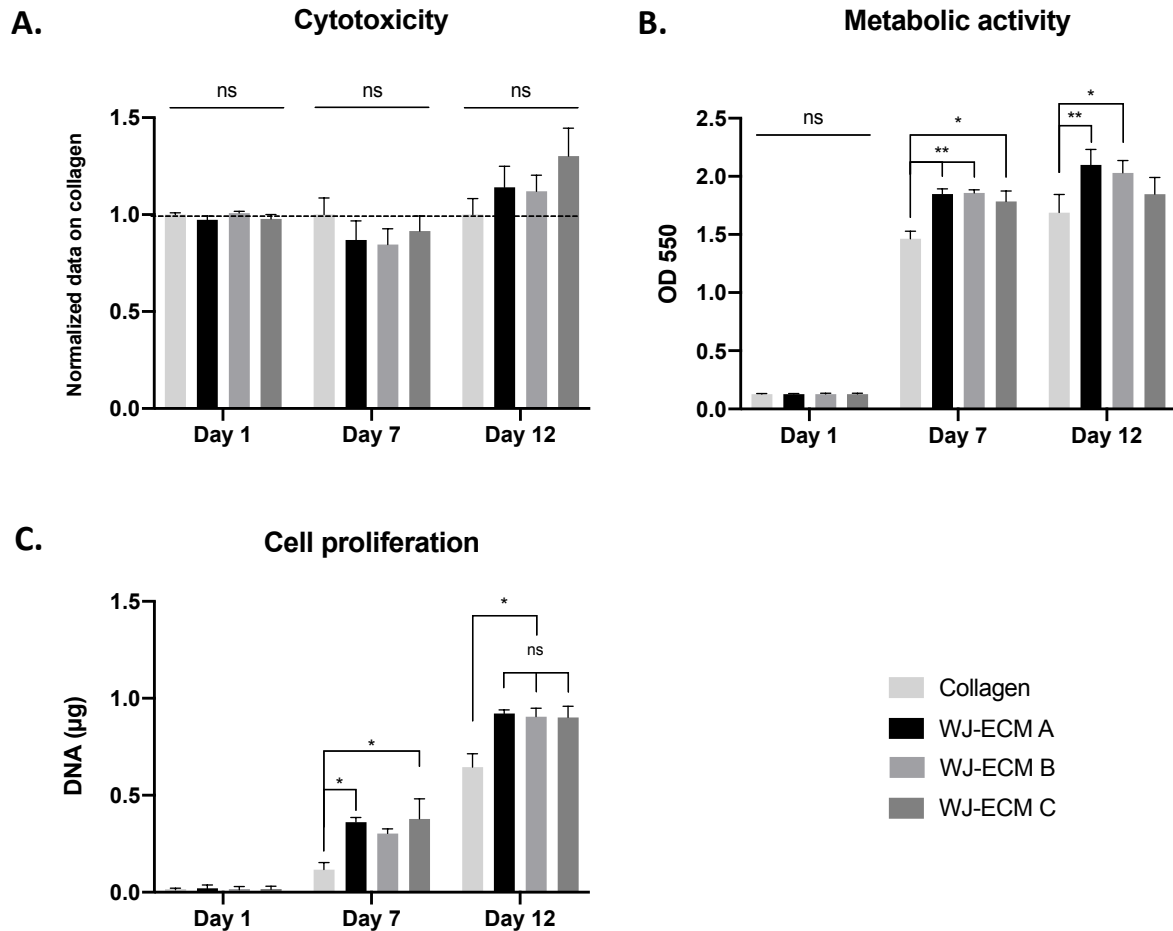


Fig. 7. Study of the cytobiocompatibility of WJ-ECM coating with h-WJ-MSC. WJ-MSC were seeded and expanded on WJ-ECM and collagen coatings, and cell behavior was evaluated at 1, 7 and 12 days of culture. (A) Cytotoxicity of the coating was evaluated by release of LDH by cells. For each day, results were normalized to collagen-induced cytotoxicity. (B) Metabolic activity of WJ-MSC observed at days 1, 7 and 12 according to the coating. (C) Monitoring of the cell proliferation rate by DNA quantification at days 1, 7 and 12 according to the seeded coating. Results are presented as the mean \pm SEM for each condition, and were statistically analyzed following two-way ANOVA (p-value: * < 0.05, ** < 0.01); n = 3.

To examine the cytobiocompatibility of our WJ-ECM coating, human WJ-MSC viability, mitochondrial activity and proliferation on this surface were analyzed for a culture period of 12 days. The results obtained were compared to a coating control condition consisting of a commercially available collagen I (0.1 mg/mL), frequently used as a support for cell adhesion and proliferation (Fig. 7).

To evaluate the potential cytotoxicity of our WJ-ECM coating, LDH assays were performed on WJ-MSC seeded on this surface at 1, 7 and 12 days of culture (Fig. 7A). For each day, cytotoxic results were analyzed and normalized to those obtained with cells seeded on the collagen I coating. For days 1 and 7, normalized results obtained for the LDH released by

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cells seeded on the three different pools of WJ-ECM showed no significant differences from the control condition. Moreover, no differences in the cytotoxicity results were detected between each of the three WJ-ECM. Even if not significant, at day 12, cytotoxicity results for cells seeded on WJ-ECM coatings showed an increasing trend compared to those obtained with the control condition (1.141 ± 0.10 , 91.121 ± 0.082 and 1.302 ± 0.145 for WJ-ECM A, B and C, respectively).

An MTT assay was also performed to check if our WJ-ECM had an impact on the metabolic activity of the cells seeded on this coating compared to cells seeded on collagen I coating (Fig. 7B). At day 1, no significant differences in mitochondrial activity were found between each of the different conditions. At day 7, the OD recorded for each of the WJ-ECM A, B and C conditions as well as for collagen was 1.850 ± 0.044 , 1.857 ± 0.028 , 1.784 ± 0.090 and 1.464 ± 0.064 , respectively. These values reflect a significantly higher metabolic activity for cells deposited on the different WJ-ECM compared to those seeded on the collagen control. Cell metabolic activity increased mildly at day 12 for all conditions, with significantly higher values for cells seeded on WJ-ECM A and B coatings compared to the control condition. The metabolic activity of the MSC deposited on WJ-ECM C was not significantly different from that for the control condition (p-value of 0.5779) although a tendency to increase was notable.

On the other hand, in terms of proliferation, at day 7, cells seeded on WJ-ECM showed significantly higher proliferation rates compared to the control condition (Fig. 7C). At day 12, results were homogeneous for the three pools of ECM, indicating that WJ-MSC seeded on our WJ-ECM have improved proliferation compared to those cultured on collagen, with a mean value of $0.910 \pm 0.066 \mu\text{g}$ for WJ-ECM conditions (A: $0.922 \pm 0.02 \mu\text{g}$; B: $0.905 \pm 0.044 \mu\text{g}$; C: $0.902 \pm 0.057 \mu\text{g}$) while $0.645 \pm 0.069 \mu\text{g}$ of DNA was quantified for cells seeded on the collagen coating. These results explain the high values of LDH released by the cells seeded on the WJ-ECM at day 12 since the cells had a higher proliferation rate under these conditions. Thus, they reached confluence more quickly and apoptosis could be induced.

3.5. Hemocompatibility of WJ-ECM

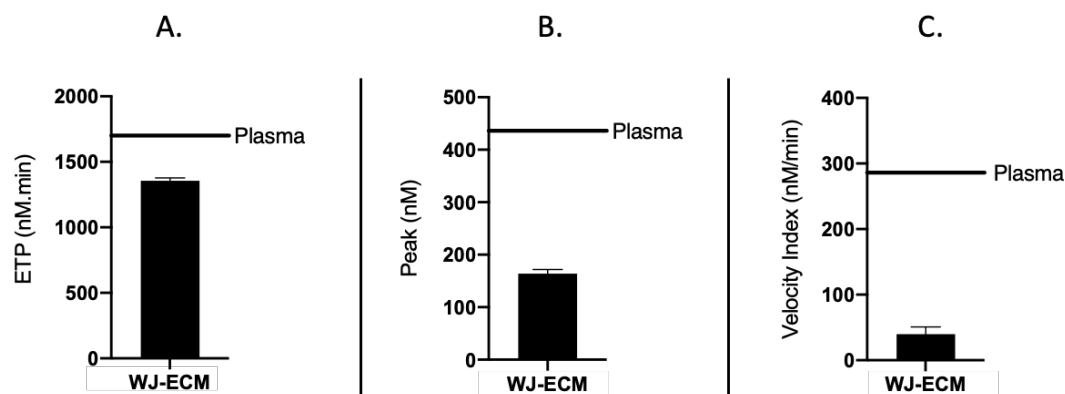


Fig. 8. Thrombogenicity evaluation of the WJ-ECM coating monitored by thrombin generation assay. (A) ETP: endogenous thrombin potential, a reflection of the thrombogenic potential of the sample; peak: maximum value of active thrombin generated with the sample; velocity index: reflecting the slope of the explosive thrombin generation. Results presented as mean ± SD.

Our mechanically extracted WJ-ECM is intended to be used as a biomaterial surface coating so it can be in direct contact with the blood. Thus, it is crucial to evaluate its hemocompatibility. WJ-ECM coatings were subjected to thrombin generation tests. Results were compared to those obtained in conditions where only the plasma used for the experiment was tested (Fig. 8). Thus, the values of ETP, maximum peak and velocity index observed for the reference plasma were 1707 nM.min, 436.45 nM and 286.51 nM/min, respectively. The results show that our WJ-ECM coating has a good hemocompatibility profile with reduced thrombogenicity compared to the control condition, with an ETP of 1355.833 ± 73.734 nM.min, a maximum peak value of 164.013 ± 27.121 nM and a velocity index of 39.923 ± 10.897 nM/min (Fig. 8B).

4. Discussion

The ECM provides a microenvironment that plays a key role in promoting tissue remodeling, modulating gene expression and regulating cell functions such as adhesion, migration, proliferation and differentiation. Thus, it has had remarkable success when used as a scaffold in tissue engineering. Depending on the desired application, the initial conformation of the ECM may be retained, or ECM can be processed into other forms such as solutions that can be used as a coating applied to the surface of synthetic or biological biomaterials [29].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Indeed, an ECM-derived coating will be of particular interest in the field of vascular tissue engineering where the development of functional and patent small-diameter tissue-engineered vascular grafts (TEVG) remains a considerable challenge. In fact, the failure of existing small-diameter vascular substitutes is due to various phenomena including thrombosis, intimal hyperplasia, infections and atherosclerosis. The occurrence of thrombosis, which is the major cause of vascular graft failure, can be explained by the absence of a functional endothelium on the luminal surface, which would prevent the adhesion of blood proteins and the triggering of coagulation mechanisms [30,31]. Therefore, having a uniform and continuous cell layer on the luminal surface of the graft seems to be a prerequisite for obtaining a hemocompatible small-diameter TEVG. Adding a luminal coating step prior to cellularization in the TEVG manufacture protocol is strongly recommended because it can create a microenvironment that can modify cell behavior by enhancing cell adhesion, proliferation and/or differentiation. We are one of the multiple teams concerned by the lack of small-caliber vascular substitutes and seeking to develop a long-term patent and efficient small-diameter TEVG. In this study, we propose a luminal coating consisting of a natural complex ECM of human origin, extracted from the WJ of umbilical cords that is totally biocompatible and suitable for various uses in tissue engineering.

Several methods of extracting ECM proteins have already been described in the literature, according to mechanical, chemical or enzymatic protocols, in order to obtain a product reflecting as much as possible the biological cell microenvironment [32–35].

We have previously described and characterized the WJ-ECM extracted by an enzymatic method [23]. In this study, we compared the results to those obtained after extraction of the same ECM in 0.02 N acetic acid that is commonly used to isolate collagen I [36]. This study has shown that the enzymatic extraction of WJ-ECM improves cell adhesion and proliferation in static and dynamic culture conditions, whereas extraction with a solution of 0.02 N acetic acid only allows the acquisition of very small quantities of matrix with unsatisfactory results. However, in order to produce a WJ-ECM under conditions that could be suitable for clinical applications, we decided to abandon the use of enzymes and to develop an efficient ECM extraction method with a higher concentration of acetic acid that can be more efficient than the one previously tested. This optimized extraction protocol allows the acquisition of ECM with an insignificant DNA content, thus making this biomaterial suitable for implantation protocols [37].

1 Proteomic analysis of the decellularized WJ has already been performed and determined
2 that it is mainly composed of collagen, fibronectin and lumican [18]. Except for fibronectin,
3 these proteins are also found as the main components of our WJ-ECM, thus validating the
4 interest that our method of preparation can carry. Analysis of the obtained deposit allowed
5 us to highlight a particular arrangement of proteins, supposedly collagen fibers, in a fibril
6 form. This arrangement of collagen fibers differs from the usually described conformation, a
7 triple helix known to be the result of the collagen's ability to self-assemble [38,39]. In this
8 case, the acetic acid extraction dismantles the collagen triple helix, allowing the extraction of
9 collagen monomers [40]. We assume here that the WJ collagen does not have the capacity
10 to reform a triple helix, contrary to the collagen self-assembly described in the literature.
11 Although collagen is a protein that has been intensively studied for a long time, many
12 variations and subtypes of collagen are still being discovered [41]. In particular, collagen
13 from fetal or neonatal tissue such as WJ seems to show some specificities [42,43]. Despite
14 advances in this field, it appears that the form of collagen found in our study has never been
15 described before. It would be interesting to investigate and characterize the types of
16 collagen found in neonatal tissue and to propose them as an alternatives for collagen type I
17 of animal origin which is the most widely used for cell culture but also in tissue engineering
18 applications [44–46].
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 Despite the unconventional structure of the collagen, it has allowed together with the other
38 extracellular proteins found in our WJ-ECM, to obtain a uniform deposit with an optimal
39 cytocompatibility. In fact, better cell adhesion, proliferation and metabolic activity were
40 observed when WJ-MSC were seeded on WJ-ECM compared to the condition where they
41 were seeded on a conventional collagen coating.
42
43
44
45

46 Hemocompatibility results have indicated that our WJ-ECM coating could have an interesting
47 anticoagulant activity. We suppose that this activity could be due to the presence of
48 dermatan sulfate in the WJ, consistent with other studies [14,47,48], that have been
49 demonstrated as a clotting regulator via the modulation of fibrin assembly [49].
50
51
52
53

54 Endowed with a porous structure, an excellent cytocompatibility, and an anticoagulant
55 action, our acetic acid-extracted ECM is perfectly suited as a covering surface for vascular
56 substitutes since it would allow a more efficient cellularization of the luminal surface and
57 prevent the coagulation phenomena that is a major cause of their failure.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

As described above, the obtained solution allows to perform 2D surface coating resulting in a deposit of protein fibers according to the dip coating technique. It would be interesting to continue our characterization work in the case of dip coatings of porous materials, or according to different coating methods such as spray coating, which can be used for prosthesis covering [50].

The same method of dip coating could be used to coat the surface of a 3D scaffold or to impregnate a porous scaffold, whether synthetic or natural for tissue engineering applications. The evaluation of obtained coating under different forms, as hydrogel by example, should be relevant and could allow its use in other contexts as a scaffold whose 3D structure could vary depending on the mold [51]. Another improvement of such a coating could consist in the incorporation of functionalized nanoparticles allowing a controlled release of biomolecules.

3. Conclusion

In this study, WJ-ECM was analyzed to characterize this new biomaterial of human origin and recovered in a noninvasive manner. The decellularization and ECM isolation protocol is easy, short, noninvasive and non-expensive. To limit potential heterogeneity inherent to the natural and human-derived product, we chose to produce each batch of WJ-ECM by pooling three WJ derived from different umbilical cords. The three resulting batches of WJ-ECM, although presenting a relative quantitative heterogeneity for their protein, have shown homogeneous results. It has allowed to obtain a uniform porous biocompatible coating, showing a higher cytocompatibility than commercially available collagen when seeded with WJ-MSC, cells of choice for tissue engineering. Moreover, it contains only a negligible amount of DNA, suggesting its potential use without the risk of an immune reaction in response to the insertion of foreign DNA. We were also able to perform proteomic analysis indicating its rich content in an unconventional form of human type I collagen. Although collagen is the main component of WJ-ECM, other proteins were also found including various proteoglycans known to promote cell adhesion and proliferation, in particular lumican [52,53]. Moreover, this coating has shown an interesting hypocoagulant potential that is a key feature for a use in the vascular engineering field.

In conclusion, all these characteristics make this natural ECM extracted from human umbilical cord a very promising biomaterial for cell culture and various tissue engineering

1 applications, such as vascular tissue engineering due to its hypocoagulant potential. Its
2 application as a vascular graft luminal coating can greatly improve the cellularization of this
3 surface and avoids coagulation mechanisms.
4
5
6

7 Acknowledgments

8
9 This work was supported by the “Fondation Recherche Médicale” No. 20170638051. We
10 would like to thank the federation 3209 BMCT (Nancy, France) and the BioSE Doctoral
11 scholarship for A.F. We thank also J-B. V. from the Proteomics Core Facility of UMS2008/US40
12 IBSLor (Université de Lorraine, CNRS, INSERM), F-54000 Nancy, France.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

- [1] Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 2008;89:338–44. <https://doi.org/10.1002/bip.20871>.
- [2] Guan J, Stankus JJ, Wagner WR. Development of Composite Porous Scaffolds Based on Collagen and Biodegradable Poly(ester urethane)urea. *Cell Transplant* 2006;15:S17–27.
- [3] Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 2009;462:433–41. <https://doi.org/10.1038/nature08602>.
- [4] Moroni F, Mirabella T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *Am J Stem Cells* 2014;3:1–20.
- [5] Bloch O, Erdbrügger W, Völker W, Schenk A, Posner S, Konertz W, et al. Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves. *Med Sci Monit* 2012;18:BR487–92. <https://doi.org/10.12659/MSM.883618>.
- [6] Dall’Olmo L, Zanusso I, Di Liddo R, Chioato T, Bertalot T, Guidi E, et al. Blood Vessel-Derived Acellular Matrix for Vascular Graft Application. *BioMed Research International* 2014;2014:e685426. <https://doi.org/10.1155/2014/685426>.
- [7] Porzionato A, Sfriso MM, Pontini A, Macchi V, Petrelli L, Pavan PG, et al. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. *Int J Mol Sci* 2015;16:14808–31. <https://doi.org/10.3390/ijms160714808>.
- [8] Choi JS, Kim JD, Yoon HS, Cho YW. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. *Tissue Eng Part A* 2013;19:329–39. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0738>.
- [9] Eweida AM, Marei MK. Naturally Occurring Extracellular Matrix Scaffolds for Dermal Regeneration: Do They Really Need Cells? *BioMed Research International* 2015;2015:e839694. <https://doi.org/10.1155/2015/839694>.
- [10] Yang C, Hillas PJ, Báez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 2004;18:103–19. <https://doi.org/10.2165/00063030-200418020-00004>.
- [11] Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Organogenesis* 2008;4:23–7.
- [12] Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009;144:S108–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.02.024>.
- [13] Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997;18:53–64.

[https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(97\)90071-0](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(97)90071-0).

[14] Gogiel T, Bańkowski E, Jaworski S. Proteoglycans of Wharton's jelly. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1461–9. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00128-6](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00128-6).

[15] Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 1997;11:51–9. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.1.9034166>.

[16] Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta* 2005;26:747–52.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.008>.

[17] Dan P, Velot É, Mesure B, Groshenry G, Bacharouche J, Decot V, et al. Human umbilical cord derived matrix: A scaffold suitable for tissue engineering application. *Biomed Mater Eng* 2017;28:S95–100. <https://doi.org/10.3233/BME-171629>.

[18] Jadalannagari S, Converse G, McFall C, Buse E, Filla M, Villar MT, et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLoS ONE* 2017;12:e0172098.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172098>.

[19] Basiri A, Farokhi M, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Mohamadnia A, Rashtbar M, et al. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering. *Prog Biomater* 2019;8:31–42. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-0108-7>.

[20] Xiao T, Guo W, Chen M, Hao C, Gao S, Huang J, et al. Fabrication and In Vitro Study of Tissue-Engineered Cartilage Scaffold Derived from Wharton's Jelly Extracellular Matrix. *Biomed Res Int* 2017;2017:5839071. <https://doi.org/10.1155/2017/5839071>.

[21] Herrero-Mendez A, Palomares T, Castro B, Herrero J, Granado MH, Bejar JM, et al. HR007: a family of biomaterials based on glycosaminoglycans for tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:989–1001. <https://doi.org/10.1002/term.1998>.

[22] Beiki B, Zeynali B, Seyedjafari E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017;78:627–38. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.074>.

[23] Dan P, Velot É, Francius G, Menu P, Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater* 2017;48:227–37.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.018>.

[24] Kehtari M, Beiki B, Zeynali B, Hosseini FS, Soleimanifar F, Kaabi M, et al. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular*

Biochemistry 2019;120:6683–97. <https://doi.org/10.1002/jcb.27965>.

[25] Penolazzi L, Pozzobon M, Bergamin LS, D’Agostino S, Francescato R, Bonaccorsi G, et al. Extracellular Matrix From Decellularized Wharton’s Jelly Improves the Behavior of Cells From Degenerated Intervertebral Disc. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:262.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00262>.

[26] He F. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-Protocol* 2011;1:e44.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.44>.

[27] Prockop DJ. Collagens. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, New York: Elsevier; 2004, p. 482–7. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00131-9>.

[28] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.

<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

[29] Edgar L, Altamimi A, García Sánchez M, Tamburrinia R, Asthana A, Gazia C, et al. Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering. *Organogenesis* 2018;14:172–86.

<https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1503771>.

[30] Fayon A, Menu P, El Omar R. Cellularized small-caliber tissue-engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard. *NPJ Regen Med* 2021;6:46.

<https://doi.org/10.1038/s41536-021-00155-x>.

[31] Skovrind I, Harvald EB, Juul Belling H, Jørgensen CD, Lindholt JS, Andersen DC. Concise Review: Patency of Small-Diameter Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Meta-Analysis of Preclinical Trials. *Stem Cells Transl Med* 2019. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0287>.

[32] Rahman MA. Collagen of Extracellular Matrix from Marine Invertebrates and Its Medical Applications. *Mar Drugs* 2019;17. <https://doi.org/10.3390/md17020118>.

[33] Moore MC, Pandolfi V, McFetridge PS. Novel human-derived extracellular matrix induces in vitro and in vivo vascularization and inhibits fibrosis. *Biomaterials* 2015;49:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.022>.

[34] Coelho RCG, Marques ALP, Oliveira SM, Diogo GS, Pirraco RP, Moreira-Silva J, et al. Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017;78:787–95. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.122>.

[35] Schmidt MM. Collagen extraction process. 2016.

- 1 [36] Rajan N, Habermehl J, Coté M-F, Doillon CJ, Mantovani D. Preparation of ready-to-
2 use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering
3 applications. *Nat Protoc* 2006;1:2753–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.430>.
4
- 5 [37] Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in Biologic Scaffold
6 Materials. *Journal of Surgical Research* 2009;152:135–9.
7 <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.02.013>.
8
- 9 [38] Gross J. THERMAL DENATURATION OF COLLAGEN IN THE DISPERSED
10 AND SOLID STATE. *Science* 1964;143:960–1.
11 <https://doi.org/10.1126/science.143.3609.960>.
12
- 13 [39] Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of
14 tendon mechanical properties. *J Biomech* 2003;36:1529–53. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(03\)00135-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(03)00135-0).
15
- 16 [40] Davison PF, Cannon DJ, Andersson LP. The Effects of Acetic Acid on Collagen
17 Cross-Links. *Connective Tissue Research* 1972;1:205–16.
18 <https://doi.org/10.3109/03008207209152076>.
19
- 20 [41] Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
21 2011;3:a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
22
- 23 [42] Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and
24 glycosaminoglycans of Wharton’s jelly. *Biol Neonate* 1997;71:11–21.
25 <https://doi.org/10.1159/000244392>.
26
- 27 [43] Vizza E, Correr S, Goranova V, Heyn R, Angelucci PA, Forleo R, et al. The collagen
28 skeleton of the human umbilical cord at term. A scanning electron microscopy study after 2N-
29 NaOH maceration. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:885–94. <https://doi.org/10.1071/rd9960885>.
30
- 31 [44] Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue
32 Engineering Applications. *Materials (Basel)* 2010;3:1863–87.
33 <https://doi.org/10.3390/ma3031863>.
34
- 35 [45] Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen Tissue Engineering: Development of
36 Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr Res* 2008;63:492–6.
37 <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3>.
38
- 39 [46] Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, Becerra J, Visser R.
40 Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*
41 2021;13:599. <https://doi.org/10.3390/polym13040599>.
42
- 43 [47] Sobczak AIS, Pitt SJ, Stewart AJ. Glycosaminoglycan Neutralization in Coagulation
44 Control. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2018;38:1258–70.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311102>.

[48] Yu Y, Duan J, Leach FE, Toida T, Higashi K, Zhang H, et al. Sequencing the Dermatan Sulfate Chain of Decorin. *J Am Chem Soc* 2017;139:16986–95.

<https://doi.org/10.1021/jacs.7b10164>.

[49] Dugan TA, Yang VW-C, McQuillan DJ, Höök M. Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem* 2006;281:38208–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607244200>.

[50] Monteiro IP, Shukla A, Marques AP, Reis RL, Hammond PT. Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2015;103:330–40. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35178>.

[51] Kopeček J. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? *Biomaterials* 2007;28:5185–92. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.044>.

[52] Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* 2008;60:818–23. <https://doi.org/10.1002/iub.131>.

[53] Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* 1992;4:793–801. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90102-I](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90102-I).

Résumé : Nouvelles approches dans la conception d'un substitut vasculaire de petit diamètre d'origine fœtale et premières évaluations de pontage artériel chez le gros animal

Les maladies cardiovasculaires représentent près d'un tiers des décès dans le monde. Parmi les traitements vasculaires proposés, le pontage artériel reste le traitement le plus efficace pour restaurer une revascularisation à long-terme. A l'heure actuelle, les substituts vasculaires de choix pour les pontages restent les vaisseaux autologues mais leur récupération implique un acte chirurgical invasif. Il existe des prothèses vasculaires synthétiques mais celles-ci sont inadaptées pour le remplacement de vaisseaux de petit calibre. Leur utilisation entraîne des complications telles que la thrombose, probablement due à un défaut de fonctionnalisation de leur surface interne. Un greffon vasculaire de petit calibre intégrant une composante cellulaire luminale produit par ingénierie vasculaire (TEVG) pourrait remédier à cette problématique et présenter une alternative thérapeutique potentielle. Dans ce contexte, nous proposons notre greffon, développé à partir d'une artère ombilicale humaine décellularisée et dont la surface luminale est recouverte avec une matrice extracellulaire extraite de la gelée de Wharton (MEC-GW) puis cellularisée par des cellules souches mésenchymateuses (CSM-GW) provenant de ce même tissu. Cette proposition se base notamment sur la synergie structure/cellules, optimisée par une méthode innovante de retournement permettant d'accéder facilement à la surface luminale de l'artère, zone critique dont les modifications impactent directement le comportement du substitut face aux conditions vasculaires. La première grande partie de ma thèse a consisté en l'optimisation des différents composants du greffon, et notamment la MEC-GW dont l'extraction a été repensée afin de convenir à une utilisation clinique. La caractérisation de ce nouveau biomatériau a permis d'identifier le collagène comme étant son principal composant, auquel s'ajoute différentes protéines matricielles jouant un rôle important dans l'adhésion et la prolifération cellulaire. De plus, le protocole de décellularisation de la GW a montré une très bonne efficacité supposant sa possible utilisation en condition allogène sans induire de réaction immunitaire chez l'hôte. Mes résultats ont montré que la MEC-GW est hémocompatible parfaitement biocompatible, et présentant des possibilités de fonctionnalisation. La deuxième grande partie de ma thèse a consisté au développement du greffon vasculaire et l'étude de ses propriétés mécaniques confirmant sa capacité à être utilisé dans un contexte vasculaire. Cette étude a notamment permis de déterminer que le retournement de l'artère n'impacte aucunement ses propriétés mécaniques. La troisième partie a consisté en une étude préliminaire du greffon dans plusieurs modèles de pontages artériels chez le porc évaluant sa capacité d'intégration, son immunogénicité ainsi que sa perméabilité à court et moyen terme. Ce projet a démontré d'une part l'intérêt particulier que peut porter la MEC-GW en tant que biomatériau prometteur en ingénierie tissulaire, comme étant un produit d'origine humaine, facilement isolable, biocompatible et pouvant être fonctionnalisé selon le contexte visé. D'autre part, bien que l'étude in vivo soit encore préliminaire, notre greffon pourrait présenter une solution thérapeutique de choix en offrant un produit prêt à l'emploi, pouvant être greffé par des techniques robotiques mini-invasives évitant une chirurgie très lourde au patient impliquant une longue période de convalescence.

Mots clés : Ingénierie tissulaire vasculaire, Gelée de Wharton, Matrice extracellulaire, Cellules souches mésenchymateuses, Greffon vasculaire

Abstract: New approaches in the design of a tissue engineered vascular graft, from fetal origin, and preliminary studies in arterial bypass model in large animal,

Cardiovascular diseases are responsible for nearly one-third of all deaths worldwide. Among the vascular treatments proposed, arterial bypass surgery remains the most effective treatment to restore long-term revascularization. Currently, the vascular substitutes of choice for bypass surgery are autologous vessels, but their recovery involves an invasive surgical procedure. Synthetic vascular prostheses are available, but they are unsuitable for the replacement of small vessels. Their use leads to complications such as thrombosis, probably due to a defect in the functionalization of their internal surface. A small caliber vascular graft integrating a luminal cellular component produced by vascular tissue engineering (TEVG) could address this issue and present a potential therapeutic alternative. In this context, we propose our graft, developed from a decellularized human umbilical artery and whose luminal surface is coated with an extracellular matrix extracted from Wharton's jelly (WJ-ECM) and then cellularized by mesenchymal stem cells (WJ-MSC) derived from this same fetal tissue. This proposal is based on the scaffold/cell synergy, optimized by an innovative "inside-out" method allowing easy access to the luminal surface of the artery, a critical zone whose modifications directly impact the behavior of the substitute in vascular conditions. The first major part of my thesis consisted in the optimization of the different components of the graft, and in particular the WJ-ECM whose extraction was redesigned in order to be suitable for a clinical use. The characterization of this new biomaterial allowed to identify collagen as its main component, to which is added various matrix proteins playing an important role in cell adhesion and proliferation. Moreover, the decellularization protocol of WJ showed a very good efficiency assuming its possible use in allogenic condition without induction of an immune reaction. My results showed that the WJ-ECM is hemocompatible, perfectly biocompatible and presenting possibilities of functionalization. The second major part of my thesis consisted in the development of the vascular graft and the study of its mechanical properties confirming its capacity to be used in a vascular context. This study allowed to determine that the inversion of the artery does not impact its mechanical properties. The third part consisted of a preliminary study of the graft in several arterial bypass models in pigs, evaluating its integration capacity, its immunogenicity and its short- and medium-term patency. This project has demonstrated the particular interest that the WJ-ECM can have as a promising biomaterial in tissue engineering, as it is a product of human origin, easily isolable, biocompatible and can be functionalized in according to the desired application. On the other hand, although the in vivo study is still preliminary, our graft could present a therapeutic solution of choice by offering a ready-to-use product, which can be grafted by minimally invasive robotic techniques avoiding a very invasive surgery to the patient involving a long convalescence period.

Key Words: Vascular tissue engineering, Wharton's Jelly, Extracellular matrix, Mesenchymal stem cells, Vascular graft.