Nancy-Université
Université Henri Poincaré

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 SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Spécialité :
Bioingénierie cellulaire et tissulaire

Présentée

Par

Halima-Assia KERDJOUDJ

Le 26 Octobre 2007

MODIFICATION DE LA SURFACE LUMINALE ARTERIELLE PAR FILMS DE POLYELECTROLYTES EN VUE D'OBTENIR UN SUBSTITUT VASCULAIRE NON THROMBOGENIQUE

Directeur de thèse : Dr. P. MENU

JURY

Rapporteurs :

D. LETOURNEUR	**Directeur de recherche**	**INSERM Paris**
A. GAIRARD	**Professeur Emérite**	**ULP-Strasbourg**

Examinateurs :

J. F. STOLTZ	**Professeur**	**UHP-Nancy I**
J. C. VOEGEL	**Directeur de recherche**	**INSERM Strasbourg**
L. BORDENAVE	**Professeur**	**Univ. V. Ségalen Bordeaux 2**
P. MENU	**Maître de conférences**	**UHP-Nancy I**

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563 (Faculté de Médecine de Nancy) et l'unité INSERM 595 (Faculté de chirurgie dentaire, Strasbourg).

A mes parents

A mes sœurs

Avec toute ma reconnaissance et ma profonde affection.

Mes travaux ont été effectués au laboratoire de mécanique et ingénierie cellulaire et tissulaire de l'UMR-CNRS- 7563 de l'Université Henri Poincaré de Nancy. Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur du Laboratoire et membre de l'Académie Française de Médecine, ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et proposé le thème de recherche. La confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements m'ont beaucoup aidée à mener à terme le travail. C'est un grand honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail. Qu'il soit assuré de mon attachement.

Monsieur **Patrick MENU**, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie, a assuré la direction scientifique de cette thèse. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions et les conseils qu'il m'a souvent prodigués m'ont été d'une très grande utilité. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie particulièrement Monsieur **Jean-Claude VOEGEL**, Directeur de Recherche à l'INSERM (Strasbourg), qui m'a fait bénéficier de sa riche expérience. Il a montré un intérêt et un enthousiasme constants pour mes travaux. Ses remarques et ses suggestions ont constitué un précieux apport. Je suis fière de le compter parmi les membres du jury.

Monsieur **Didier LETOURNEUR,** Directeur de recherche à l'INSERM Paris et Monsieur **Alexis GAIRARD,** Professeur Emérite à l'Université de Strasbourg ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Leurs commentaires et leurs remarques constitueront sans doute un précieux concours. Je les remercie vivement.

Je suis également très sensible à l'honneur que me fait Madame **Laurence BORDENAVE**, Professeur à l'Université de Bordeaux 2 en acceptant de juger ma thèse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Madame **Sylvaine MULLER**, Chargée de recherche à l'INSERM, qui a guidé mes premiers pas dans la recherche et qui m'a initiée aux techniques du laboratoire.

Je remercie vivement Monsieur **Patrick LACOLLEY**, Directeur de recherche de l'unité INSERM 684, ainsi que toute son équipe, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et mis à ma disposition tous les équipements nécessaires aux expérimentations sur l'animal.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **François PLENAT**, Chef du Service d'Anatomie Pathologie à l'Hôpital Universitaire de Brabois (Nancy) ainsi que toute son équipe, pour leurs conseils et leur aide particulièrement efficace notamment en histologie.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame **Anna KEARNEY-SCHWARTZ**, Angiologue à l'Hôpital Universitaire de Brabois (Nancy), pour son aide précieuse pour les exploitations *in vivo*.

Le Docteur **Simon RINCKENBACH**, Chirurgien vasculaire à l'Hôpital Universitaire de Besançon, m'a appris à effectuer les anastomoses sur les carotides de lapin. Je lui en suis particulièrement reconnaissante.

Je remercie vivement Monsieur **Cédric BOURA**, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie, qui a bien souvent trouvé une réponse à mes questions, et Messieurs **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche et **Luc MARCHAL**, Ingénieur d'étude au laboratoire pour leur aide précieuse en microscopie.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'animalerie de la faculté de médecine.

Je ne saurais oublier l'ensemble des chercheurs, doctorants et personnel technique du laboratoire pour l'atmosphère amicale qu'ils ont su faire régner et leur soutien efficace.

Je remercie également mes amies d'Alger (Assia, Faiza, Fériel, Lila, Samia) ainsi que mes amis de Nancy (Caroline, Cédric, Emilie, Farida, Ghania A, Ghania B, Nicolas, Saoussen) pour leur soutien pendant ces trois années de thèse.

Je n'aurais certainement pas pu réaliser ces travaux dans les délais impartis si je n'avais pas bénéficié d'une allocation de recherche octroyée par le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

TABLE DES MATIERES

Introduction 1

Partie I

I. Le système vasculaire : sa composante, ses propriétés et ses pathologies 5
I.1. Le milieu sanguin 5
I.2. Les vaisseaux sanguins 6
I.3. Les pathologies vasculaires 8
I.4. Les techniques curatives 9
II. Prothèses vasculaires 9
II.1. Substituts vasculaires d'origine biologique 12
II.1.1. Substituts biologiques non traités 12
II.1.2. Substituts biologiques traités 14
II.2. Substituts vasculaires d'origine synthétique 15
III. Ingénierie tissulaire vasculaire 20
III.1. Obtention de vaisseaux par génie tissulaire 20
III.1.1. Constructions utilisant du collagène et des cellules vasculaires cultivées en conditions statiques 21
III.1.2. Constructions utilisant des polymères poreux et des cellules vasculaires cultivées en conditions dynamiques 22
III. 1. 3. Assemblage de feuillets cellulaires 24
III. 2. Endothélialisation des substituts vasculaires 26
III. 2. 1. Matrices 27
III. 2. 2. Cellules endothéliales 29
III. 2. 3. Conditionnement des prothèses vasculaires issues de l'ingénierie cellulaire 39
IV. Films multicouches de polyélectrolytes 44
IV. 1. Films a croissance linéaire 45
IV. 2. Films a croissance exponentielle 47
IV. 3. Applications dans le domaine des biomatériaux 47
IV. 3. 1. Elaboration de surfaces non adhérentes 48
IV. 3. 2. Elaboration de surfaces adhérentes 48

Partie II

I. Méthodes de culture cellulaire et de préparation de la matrice artérielle 52
I. 1. Culture cellulaire 52
I. 1. 1. Réactifs et milieu de culture 52
I. 1. 2. Description anatomique des cordons ombilicaux humains 53
I. 1. 3. Culture des cellules endothéliales issues du cordon ombilical humain 55
I. 2. Préparation de la matrice artérielle 57
I. 2. 1. Milieux de conservation 57
I. 2. 2. Isolement et congélation des artères ombilicales humaines 57
I. 2. 3. Décongélation et désendothélialisation des artères ombilicales humaines 58
I. 2. 4. Modification de la lumière de l'artère par un film multicouche de polyélectrolytes 58
I. 3. Ensemencement des cellules endothéliales dans la lumière des matrices artérielles 60
I. 4. Stimulation mécanique : contraintes de cisaillement 61
II. Méthodes de caractérisation et d'investigation 63
II. 1. Evaluation mécanique de la matrice artérielle 63
II. 2. Caractérisation histologique et immunohistochimique 65
II. 2. 1. Histologie 65
II. 2. 2. Immunohistochimie 69
II. 3. Caractérisation par microscopie électronique à balayage 70
II. 3. 1. Description de l'appareillage 70
II. 3. 2. Préparation de l'échantillon 71
II. 4. Caractérisation par microscopie confocale à balayage laser 72
II. 4. 1. Description de l'appareillage 72
II. 4. 2. Visualisation du film multicouche de polyélectrolytes 73
II. 4. 3. Visualisation du phénotype endothélial 74
III. Evaluation *in vivo* des substituts artériels 76
III. 1. Animaux 76
III. 2. Anesthésie 77
III. 3. Mise en place du substitut vasculaire 77
III. 4. Suivi du substitut au cours du temps 79
III. 5. Euthanasie et prélèvement des substituts vasculaires 81
IV. Analyses statistiques 81

Partie III

I. Développement d'une matrice artérielle 84
I. 1. Résultats expérimentaux 84
I. 2. Discussion 92
I. 3. Conclusion 94
II. Construction d'un film multicouche de polyélectrolytes dans la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée 95
II. 1. Résultats expérimentaux 95
II. 2. Discussion 99
II. 3. Conclusion 100
III. Evaluation des propriétés mécaniques de la matrice artérielle 101
III. 1. Résultats expérimentaux 101
III. 2. Discussion 103
III. 3. Conclusion 104
IV. Evaluation de l'endothélialisation des artères 105
IV. 1. Résultats expérimentaux 105
IV. 2. Discussion 113
IV. 3. Conclusion 115
V. Evaluation *in vivo,* chez le lapin, de l'antithrombogénicite des artères traitées par un film multicouche de polyélectrolyte 116
V. 1. Résultats expérimentaux 116
V. 2. Discussion 121
V. 3. Conclusion 124

Partie IV

Conclusion générale 126
Référence 127
Publications

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES

N. Berthelemy*, **H. Kerdjoudj***, C. Gaucher, P. Schaaf, J. F. Stoltz, P. Lacolley, J. C. Voegel, P. Menu. Polyelectrolyte films boost progenitor cells differentiation into endothelial like monolayers. Soumise. (* les deux premiers auteurs ont contribué de façon égale au travail) *Adv. Mater.* sous presse (IF: 7.9).

H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, K. Montagne, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Re-endothelialization of human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayers: a tool for damaged vessel replacement. *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007), 2667-2673 (IF: 6.77).

V. Moby, C. Boura, **H. Kerdjoudj**, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. (Poly (styrene Sulfonate)/Poly (allylamine)) Multilayers: a route to favour Endothelial Cell Growth on ePTFE Vascular Grafts. *Biomacromolecules* 8 (2007), 2156-2160. (IF: 3.66).

H. Kerdjoudj, V. Moby, N. Berthelemy, M. Gentils, C. Boura, L. Bordenave, J. F. Stoltz, P. Menu. The ideal small arterial substitute: role of cell seeding and tissue engineering. *Clin. Hemorheol. Microcirc*. 37 (2007), 89-98. (IF: 1.24).

E. Werkmeister, **H. Kerdjoudj**, L. Marchal, J. F. Stoltz, D. Dumas. Multiphoton microscopy for blood vessel imaging: new non-invasive tools (Spectral, SHG, FLIM). *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 37 (2007), 77-88. (IF: 1.24).

H. Kerdjoudj, C.Boura, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: Potential use in vascular engineering**.** *Bio-med. Mater. Eng.* 16 (2006), S123-129. (IF: 0.92).

C. Boura, **H. Kerdjoudj**, V. Moby, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer films. *Bio-med. Mater. Eng.* 16 (2006), S115-121. (IF: 0.92).

C. Huselstein, N. de Isla, M. N. Kolopp-Sarda, **H. Kerdjoudj**, S. Muller, A. El Jaafari, J. F. Stoltz. Effect of mechanical stress on chondrocytes intracellular signaling. *Biorheology* 43 (2006), 371-375. (IF: 2.65).

BREVET FRANÇAIS

Procédé de prolifération de cellules sur des multicouches de polyélectrolytes et son application notamment à la préparation de biomatériaux cellularisés.
Inventeurs : Inventeurs : P. MENU, J. C. VOEGEL, **H. KERDJOUDJ**, N. BERTHELEMY, V. MOBY, C. BOURA, P. SCHAAF, J. F. STOLTZ.
Date de dépôt : 18 juin 2007
Numéro : 07/04313

PUBLICATIONS DE CHAPITRES DANS DES OUVRAGES SCIENTIFIQUES ET/OU DANS DES COMPTES RENDUS DE CONGRES

H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, L. Marchal, D. Dumas, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Interest of polyelectrolyte multilayer thin films in tissue engineering: application to vascular allograft. *J. Biomed. Eng.* 2005; 22: 116.

C. Boura, **H. Kerdjoudj**, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Potential use of polyelectrolyte multilayer thin films in vascular tissue engineering: Evaluation of the viability and adhesion of endothelial cells. *J. Biomed. Eng*. 2005; 22: 117-118.

C. Gigant-Huselstein, **H. Kerdjoudj**, N. de Isla, E. Payan, P. Netter, A. El Jaafari, J. F. Stoltz, S. Muller. Influence of mechanical stress an interaction between chondrocyte and extracellular matrix and a cellular cycle. In: Mechanotransduction. 2004 (Société de Biomécanique): Biologie – Physiologie – Mécanique, 2004; 31-38.

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES

E. Werkmeister, N. de Isla, **H. Kerjoudj,** J. F. Stoltz, D. Dumas. Interest of SHG imaging for diagnosis in thick and opaque tissue. Focus On Microscopy (F.O.M.) Valencia, Span. Avril, 2007.

E. Werkmeister, N. De Isla, **H. Kerdjoudj**, J. F. Stoltz, D. Dumas. Interest of second harmonic generation imaging for diagnosis in thick and opaque tissue. 5th International Symposium "Mechanobiology of cartilage and chondrocyte". Athens, Greece, May 2007.

H. Kerdjoudj, C. Boura, N. Berthelemy, V. Moby, K. Montagne, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Biomechanical properties of re-endothelialized cryopreserved umbilical arteries, 3rd International Meeting on Medical Engineering and Therapy. Nancy, France. Mai 2006.

H. Kerdjoudj, V. Moby, C. Boura, N. Berthelemy, L. Marchal, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Improvement of endothelial cells adhesion on vascular substitutes modified with a polyelectrolyte multilayer film, First international symposium on "cardiovascular biology" Praha, Czech Republic. Juin 2006.

C. Boura, S. Muller, **H. Kerdjoudj**, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Polyelectrolyte multilayer thin films used as new tool for vascular tissue engineering. European Society for Clinical Hemorheology (E.S.C.H.). Siena, Italy. Juin 2005.

H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, D. Dumas, L. Marchal, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Potentiel use of polyelectrolyte multilayer thin films in tissue engineering: application to vascular allograft. 2nd International Meeting on Medical Engineering and Therapy. Nancy, France. Mai 2005.

C. Boura, **H. Kerdjoudj**, V. Moby, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Interest of polyelectrolyte multilayer thin films in vascular tissue engineering. 2nd International Meeting on Medical Engineering and Therapy. Nancy, France. Mai 2005.

LISTE DES ABREVIATIONS

α SMA : α *smooth muscle actin*.

ΔD: Pourcentage de déformation.

A : adventice.

AFSSAPS : Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé.

AOC : Artère ombilicale cryoconservée.

AOCD : Artère ombilicales cryoconservée et désendothélialisée.

AOCD-MPE : Artères ombilicale cryoconservée, désendothélialisée dont la lumière est recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes

AOF : Artère ombilicale fraîche.

BSA : Albumine sérique bovine.

CE : Cellules endothéliales.

CHI : Chitosan.

CLCD : Carotide de lapin cryoconservée et désendothélialisée.

CLCD-MPE : Carotide de lapin cryoconservée, désendothélialisée dont la lumière est recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes.

CLMS : *Confocal laser microscopy scanning*.

CML : Cellules musculaires lisses.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique.

EPC : Cellules progénitrices endothéliales.

ET-1 : Endotheline-1.

bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor*.

GPa : Giga Pascal.

GW : gelée de Wharton.

HA : Acide hyaluronique.

Hépès : acide N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfoxide].

HUVEC : Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine.

I : intima.

ICAM : *Intercellular adhesion molecule*.

IL : Interleukins.

IP : iodure de propidium.

IVG : Interruptions volontaires de grossesse.

kV : kilo Volt.

M : média.

MB : Membrane basale.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

MEC : Matrice extracellulaire.

MPE : multicouche de polyélectrolytes.

n : Noyau.

NO : Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote.

ON : Ouverture numérique.

P-4HB : Poly-4-hydroxybutyrate.

Pa : Pascal.

PAF : Paraformaldéhyde.

PAH : Hydrochloride de polyallylamine.

PAH* : Polyallyamine couplé à la rhodamine.

PBS : *Phosphate Buffer Saline*.

PCL : Polycaprolactone.

PDL : Poly (D-Lysine).

PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*.

PEI : Polyethylènimine.

PET : Polyéthylène téréphtalate.

PGA : Acide polyglycolique.

PHA : Polyhydroxyalkanoate.

PGI_2 : Prostacycline.

PLLA : Acide Poly-L-lactique.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

PSS : Poly (sodium-4-styrène sulfonate).

~PSS-PAH : PAH-(PSS-PAH)$_3$.

PTFE : Polytétrafluoroéthylène.

PTFE(e): Polytétrafluoroéthylène (expansé).

PU : Polyuréthane.

SIS : Sous-Muqueuse Intestinale.

TCPS : *Tissue Culture Polystyrene*.

TGF β: *Transforming Growth Factor β*.

TNF: *Tumor Necrosis Factor*.

VCAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule*.

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*.

vWF : Facteur de von Willebrand.

WP : corps de Weibel Palade.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Structure pariétale d'une artère 7

Figure 2 : Les différents types de substituts vasculaires 10

Figure 3 : Localisation des différentes artères pouvant être substituées chez l'homme 11

Figure 4 : Aspect macroscopique d'une carotide bovine traitée 14

Figure 5 : Prothèses en polytetrafluoroéthylène microporeux 16

Figure 6 : Prothèse en polyéthylène téréphtalate tricoté et tissé 18

Figure 7 : Prothèse en polyuréthane 19

Figure 8 : Représentation schématique d'une construction à base de collagène et amélioration de ses propriétés mécaniques avec du Dacron® 21

Figure 9 : Vue du dispositif pour générer un flux pulsatile *in vitro* 24

Figure 10 : Production de vaisseaux humains par auto assemblage 25

Figure 11 : Protocole d'obtention d'un substitut vasculaire endothélialisé 26

Figure 12 : Réorganisation des cellules endothéliales exposées au flux 29

Figure 13 : Structure schématique d'une cellule endothéliale 30

Figure 14 : Différentes sources d'approvisionnement en cellules endothéliales 32

Figure 15 : Représentation des forces hémodynamiques exercées par le flux sanguin sur la paroi vasculaire 40

Figure 16 : Principe de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes 44

Figure 17 : Evolution de l'épaisseur des films à croissance linéaire et à croissance exponentielle en fonction du nombre de paires de couches déposées 45

Figure 18 : Evolution du potentiel zêta obtenu en potentiel d'écoulement au cours de la construction d'un film multicouche PEI-$(PSS\text{-}PAH)_5$ 46

Figure 19 : Observation de l'étalement des cellules endothéliales par microscopie de fluorescence confocale et microscopie à force atomique en mode contact 49

Figure 20 : Observation d'une coupe histologique d'un cordon ombilical humain 54

Figure 21 : Aspect des cellules endothéliales issues de la veine ombilicale à confluence 56

Figure 22 : Isolement des artères ombilicales humaines 58

Figure 23 : Chambre de cisaillement utilisée au cours de notre étude 61

Figure 24 : Représentation schématique du banc d'essai mécanique 64

Figure 25 : Artère montée dans la cuve en plexiglas 64

Figure 26 : Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage 71

Figure 27 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser 73
Figure 28 : Anastomose termino - latérale en surjet 78
Figure 29 : Image obtenue par Echo-Doppler 80
Figure 30 : Coupes histologiques d'artères ombilicales fraîches et cryoconservées 86
Figure 31 : Expression du PECAM-1 et de l'αSMA par les cellules vasculaires des d'artères ombilicales fraîches et cryoconservées 87
Figure 32 : Topologie de la lumière de l'artère ombilicale fraîche et cryoconservée 88
Figure 33 : Immunomarquage des marqueurs spécifiques à l'endothélium vasculaire 89
Figure 34 : Observation de coupes histologiques d'artères ombilicales cryocongelées, désendothélialisée 90
Figure 35 : Topologie de la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée 91
Figure 36 : Recouvrement de la lumière des artères par le film PAH-$(PSS-PAH)_3$ marqué par de la rhodamine 96
Figure 37 : Topologie de la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée et recouverte par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 97
Figure 38 : Coupe histologique d'une artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée, après dépôt du film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 98
Figure 39 : Courbe représentant la pression exercée sur les artères soumises aux différents traitements en fonction du pourcentage de déformation 102
Figure 40 : Coupes histologiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 105
Figure 41 : Coupes immunohistochimiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 106
Figure 42 : Expression du facteur von Willebrand par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 107
Figure 43 : Topologie de la lumière d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ 108
Figure 44 : Topologie de la lumière d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ après cisaillement 109
Figure 45 : Expression des récepteurs membranaires PECAM-1 par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS-PAH)_3$ avant et après cisaillement. 111

Figure 46 : Expression du facteur von Willebrand par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées ou traitées par un film PAH-$(PSS\text{-}PAH)_3$ avant et après cisaillement 112
Figure 47 : Illustration des tracés obtenus par Echo-Doppler après trois et douze semaine(s) d'implantation 117
Figure 48 : Visualisation des artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après une et douze semaine(s) d'implantation 118
Figure 49 : Coupes histologiques d'artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après une semaine d'implantation 119
Figure 50 : Coupes histologiques d'artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après douze semaines d'implantation 120

TABLEAUX

Tableau 1 : Pressions exercées en fonction du diamètre des vaisseaux artériels 8
Tableau 2 : Caractéristiques physiques des prothèses vasculaires synthétiques 15
Tableau 3 : Différentes préparation de vaisseaux artificiels 23
Tableau 4 : Résultats cliniques obtenus après endothélialisation des substituts vasculaires 28
Tableau 5 : Facteurs intervenant dans la balance des propriétés thrombogéniques des cellules endothéliales 31
Tableau 6 : Composition des tampons sans Calcium ni magnésium. 52
Tableau 7 : caractéristiques des polyélectrolytes 59
Tableau 8 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence indirecte 75
Tableau 9 : Propriétés biomécaniques des artères ombilicales fraîches, des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées et des artères ombilicales cryoconservées, désendothélialisées dont la lumière est recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes 102

INTRODUCTION GENERALE

Avec près de 180 000 décès par an, les pathologies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité en France. Face à ce fléau, les techniques curatives endovasculaires comme l'angioplastie ou l'endoprothèse vasculaire, restent insuffisantes et les cliniciens ont souvent recours au remplacement du vaisseau lésé. Ce remplacement peut être effectué soit par des vaisseaux autologues (veine saphène ou artère mammaire) soit par des prothèses synthétiques. Dans le premier cas, les praticiens se heurtent bien souvent à l'indisponibilité des vaisseaux autologues, tandis que dans le second cas, en plus des risques d'infection, leur utilisation n'est recommandée que pour des vaisseaux de gros calibres (> 6 mm de diamètre). Le remplacement des vaisseaux de petit calibre, qui représente un nombre non négligeable d'interventions vasculaires, pose donc problème et la seule alternative à ce jour est l'utilisation d'allogreffes issues de banques de tissus. Deux principales limites à l'utilisation des allogreffes sont décrites :

- La diminution des propriétés biomécaniques de la paroi artérielle qui mène souvent à la rupture de la greffe.
- La thrombogénicité de leur surface luminale. En effet, la perte de l'endothélium vasculaire suite à la congélation peut engendrer une thrombose précoce du substitut.

Le développement spectaculaire des biotechnologies et leur élargissement à de nombreuses branches d'activités a entraîné l'émergence de nouveaux domaines de recherche et l'introduction de nouveaux concepts susceptibles de lever nombre d'handicaps liés à l'utilisation de substituts vasculaires. C'est ainsi qu'au cours de ces deux dernières décennies, est apparue une nouvelle discipline basée sur les concepts du génie biologique. Il s'agit de l'**ingénierie tissulaire**. Cette discipline permettra de concevoir un substitut apte à être utilisé dans une application spécifique. Elle fait appel à plusieurs disciplines comme la biologie, la chimie, la physique et les sciences de l'ingénieur.

L'ingénierie vasculaire tissulaire a pour but de développer des substituts implantables présentant des caractéristiques biologiques et biomécaniques se rapprochant le plus possible de celles des vaisseaux natifs. L'ingénierie vasculaire doit garantir entre autres leur biofonctionnalité : être non immunogène, non thrombogène, compliant et résister à la pression sanguine. De plus, ces substituts doivent présenter une biodurabilité suffisante, afin qu'ils puissent supporter sans se dégrader, l'environnement biologique dans lequel ils sont implantés.

De multiples recherches sont actuellement orientées vers la mise au point, la réalisation et le développement de tels substituts.

Notre travail s'inscrit dans le cadre des activités du groupe « ***Ingénierie Vasculaire*** » de l'UMR CNRS 7563 qui se fixe comme objectif de conférer une surface luminale non thrombogène aux substituts vasculaires (artères issues du cordon ombilical humain et cryoconservées) de petit calibre. La préparation puis la modification de la surface luminale des artères peuvent être réalisées par des méthodes basées sur l'adsorption de molécules chargées. Celles-ci permettent alors de transformer le support où elles sont déposées en une surface pouvant fixer sélectivement des cellules ou les empêcher d'adhérer.

Nous avons choisi de déposer sur la lumière d'artères de petit calibre, un film multicouche de polyélectrolytes. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (thèse C. Boura) ont été consacrés au choix et à l'association de divers polyélectrolytes pour produire la surface désirée. Nous avons retenu dans notre travail deux polyélectrolytes de charge différente : l'hydrochlorure de polyallyamine comme polycation et le poly (sodium-4-styrène sulfonate) comme polyanion.

Au cours de ce travail, nous avons vérifié l'intégralité du recouvrement de la surface luminale d'une artère par le film multicouche de polyélectrolytes et son impact sur les propriétés biomécaniques de la paroi. En fonction de la charge de surface, nous avons suivi deux approches. Dans le cas d'une charge de surface positive, nous avons endothélialisé la surface luminale de l'artère puis testé la résistance des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillements. Dans le cas d'une charge de surface négative, nous avons vérifié la fonctionnalité des artères, en particulier la non thrombogénicité des greffons, en les implantant chez le lapin.

Notre mémoire comporte quatre parties :

La première sera consacrée à une revue bibliographique. L'analyse des travaux récents parus sur le sujet nous a permis de faire un état des connaissances, de définir la problématique de recherche et de préciser la démarche adoptée.

Dans la deuxième partie, nous présenterons les matériels biologiques ainsi que les produits chimiques utilisés au cours de ce travail. Nous décrirons les techniques et les procédures ainsi que l'appareillage utilisé.

Nous exposerons dans la troisième partie, les résultats expérimentaux obtenus et les commentaires apportés. Ces résultats concernent les différentes étapes majeures, à savoir la préparation de la matrice, la construction du film multicouche, la caractérisation biomécanique et l'endothélialisation de l'artère après dépôt du film et les études *in vivo*. Chacune de ces parties sera suivie par une discussion.

Enfin dans une discussion et une conclusion générales, nous globaliserons l'ensemble de nos résultats et fixerons les perspectives futures.

PARTIE I

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE
ET
OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le principal but de ce travail de thèse est de modifier les propriétés physicochimiques de la paroi interne des substituts vasculaires naturels pour permettre la création d'une surface luminale non thrombogène. Dans la littérature, divers types d'approches ont été envisagés et de nombreux travaux y ont été consacrés. Cette partie bibliographique est divisée en quatre chapitres. Après un bref rappel sur le système vasculaire et ses pathologies, nous avons passé en revue les différents substituts vasculaires employés par les cliniciens ainsi que leur(s) limite(s). Nous avons ensuite abordé les différentes approches de l'ingénierie vasculaire notamment l'endothélialisation de la lumière des substituts. Dans le dernier chapitre, et dans le but de faire adhérer les cellules, une nouvelle technique basée sur la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes sera décrite de façon détaillée.

I. LE SYSTEME VASCULAIRE : SA COMPOSANTE, SES PROPRIETES ET SES PATHOLOGIES

Le système vasculaire est constitué du sang contenu dans des vaisseaux sanguins.

I. 1. LE MILIEU SANGUIN

Le sang appartient au groupe des tissus appelés "tissus connectifs". Il se présente sous la forme d'une suspension aqueuse. Son volume dans le corps humain est d'environ 5 litres, représentant près de 7% de la masse du corps. Sa température est, en moyenne de 37,7°C. Son pH varie entre 7,35 et 7,45 et sa viscosité est comprise entre 3×10^{-3} et 4×10^{-3} N.S.m^{-2}. Le milieu sanguin est constitué du plasma et de cellules.

Le **plasma sanguin** constitue 55 à 60% du volume du sang. C'est un fluide aqueux de pH 7,4, composé de sels minéraux, de protéines, de traces de graisses, de glucose, d'acides aminés, d'urée… etc. Les protéines plasmatiques assurent certaines fonctions de nutrition des tissus, transportent des substances insolubles dans l'eau (lipides, vitamines liposolubles,…) et contribuent au maintien de la pression osmotique et de la viscosité du sang.

Les **cellules sanguines** représentent 40 à 45% du volume du sang, elles sont réparties en trois catégories : les **érythrocytes,** les **leucocytes** et les **plaquettes** (thrombocytes).

1- Les **érythrocytes** sont des cellules anucléées d'une durée de vie moyenne de 50 à 120 jours. Leur membrane cellulaire en forme de disque concave (diamètre ~ 7 µm) est très

sensible aux contraintes de cisaillement provoquées par des rugosités de surface. Ils contiennent de l'hémoglobine, pigment respiratoire du sang, qui rempli les fonctions suivantes : elle se charge d'oxygène dans les poumons, le transporte dans la sang et le cède aux tissus ; elle contribue au transport de l'anhydride carbonique ; elle intervient dans la régulation de l'équilibre acide-base du sang ; elle donne naissance à la bilirubine et celle-ci à l'urobiline, en libérant la globine qui, part hydrolyse, donne des acides aminés.

2- Les **leucocytes** sont des cellules nucléées dont les dimensions varies de 9 à 18 µm. Leur nombre est compris entre 5 et 8×10^6 /mL de sang. Ils sont répartis en deux grands groupes suivant la forme du noyau : les cellules mononucléées (⅓ de l'enemble des leucocytes), les cellules polynucléées (⅔ de l'ensemble des leucocytes). Ces cellules sont importantes dans les défenses spécifiques du système immunitaire.

3- Les **plaquettes** sont des fragments de cellules dépourvues de noyau, leur nombre est d'environ 2 à 4×10^8 /mL de sang. Elles ont pour rôle d'activer le processus d'adhésion des cellules aux parois des vaisseaux, au niveau de la coagulation et de la hiérarchie de ses mécanismes.

En raison de sa composante chimique, notamment la prépondérance des ions chlorure et de l'oxygène dissous, le milieu sanguin exerce sur les corps étrangers plusieurs réactions biochimiques. De plus, le sang exerce sur les parois des vaisseaux des contraintes mécaniques dues à la pulsation du flux sanguin qui entraîne des déformations aux parois.

I. 2. LES VAISSEAUX SANGUINS

Ce sont des canaux qui transportent le sang aux différents tissus de l'organisme afin de permettre leur oxygénation et par conséquent leur fonctionnement. Les vaisseaux forment un système branché d'artères, de veines, et de capillaires, avec des tailles et des propriétés mécaniques et biochimiques différentes. Cependant, la paroi de tous les vaisseaux sanguins est constituée des mêmes éléments, dont l'importance varie d'une paroi à une autre, conférant à chacun des secteurs vasculaires des propriétés propres. Une paroi vasculaire est composée de trois couches successives (Figure 1) :

- L'**intima**, constituée d'éléments orientés longitudinalement, est recouverte d'une monocouche de cellules endothéliales.

- La **média,** constituée d'éléments arrangés de manière concentrique, contient essentiellement des cellules musculaires, du collagène et des fibres élastiques (élastine).
- L'**adventice** permet l'encrage du vaisseau aux tissus environnants et contient essentiellement des fibres de collagène, des nerfs et de petites artèrioles (*vasa vasorum*).

Entre l'intima et la média se trouve une mince membrane élastique appelée **limitante élastique interne** et entre la média et l'adventice il y a une autre membrane élastique encore plus fine appelée **limitante élastique externe**.

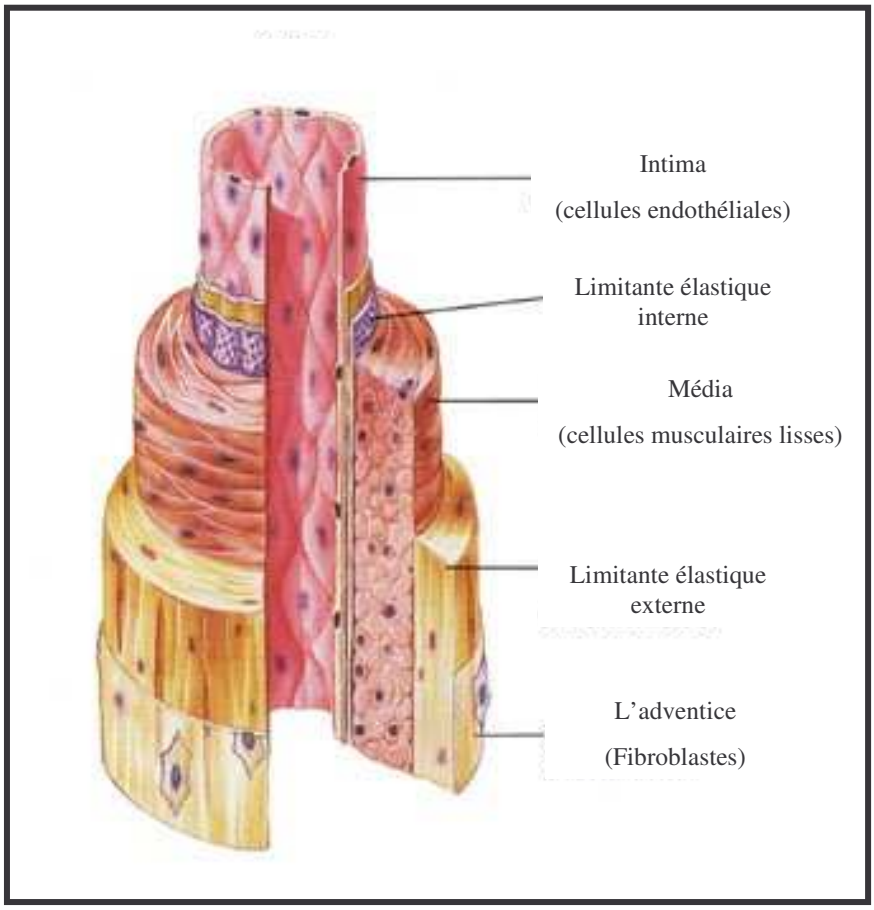


Figure 1 : ***Structure pariétale d'une artère.***

http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/artery-vein.jpeg.

Le comportement mécanique des différentes couches constituant les artères dépend de leur contenu en élastine, qui varie avec le diamètre du vaisseau. L'élasticité d'une artère mesurée par son module élastique ou module de Young est faible ; il est de l'ordre de 1 MPa [1].

Chaque type de vaisseau est donc conçu de façon à pouvoir supporter la pression du flux sanguin et la déformation qui en résulte. Le tableau 1 donne les valeurs des quelques grandeurs liées aux propriétés mécaniques.

Tableau 1 : ***Pressions exercées en fonction du diamètre des vaisseaux artériels.***

Type de vaisseau	Pression moyenne (mmHg)	Rayon du vaisseau (mm)	Tension de surface aux parois du vaisseau ($N.m^{-1}$)
Aorte, grosses artères	100	13	170
Petites artères	90	5	60
Artérioles	60	0,15-0,0002	0,5-1,2

Ces propriétés mécaniques peuvent se modifier avec le vieillissement, le remodelage des parois conséquence d'une hypertension et sous l'influence des facteurs de risque (tabagisme, sédentarité, …). Cela peut conduire à différentes pathologies.

I. 3. LES PATHOLOGIES VASCULAIRES

Plusieurs pathologies touchent l'arbre vasculaire, dont les principales sont l'athérosclérose, la thrombose, la formation d'anévrismes et la dissection.

- **L'athérosclérose :** C'est une pathologie qui se caractérise par une perte des propriétés structurales de la paroi artérielle. Ceci conduit à la formation d'une plaque athérosclérotique tapissant la paroi interne des artères, obstruant partiellement (sténose), ou totalement (occlusion) la circulation sanguine. L'athèrosclérose touche principalement les artères de gros calibre (aorte et ses principales ramifications), mais également les petits calibres (artères coronaires et cérébrales).

Malgré la fréquence de cette maladie et les nombreuses études qui s'y rapportent, ses origines sont encore mal connues. Plusieurs facteurs peuvent être incriminés : vieillesse, tabagisme, hypertension, la dyslipidémie, la ménopause chez les femmes… [2-4].

- **La thrombose :** La thrombose est due à un phénomène de coagulation du sang (caillot sanguin ou thrombus) se produisant quand le sang s'échappe d'un vaisseau. Un thrombus est constitué principalement de plaquettes, de fibrine et de globules rouges ; l'ensemble adhére à

la paroi artérielle. Les causes majeures de thrombose sont les modifications des propriétés des parois artérielles ou celles des propriétés du sang lui-même, qui entraînent le ralentissement du flux sanguin. Le thrombus peut grossir jusqu'à obstruer totalement la lumière du vaisseau et arrêter le flux sanguin ; c'est le phénomène de thrombose oblitérante.

- **Anévrisme :** Les parois artérielles peuvent, sous un effet mécanique, se distendre jusqu'à atteindre un diamètre égal à cinq fois le diamètre initial. Cette déformation appelée anévrisme, s'accompagne d'une perte porgressive des propriétés élastiques et peut conduire à une rupture du vaisseau, causant une hémorragie pouvant entraîner la mort.

- **La dissection :** Les trois couches constitutives d'une artère telles qu'elles apparaissent sur la Figure 1, peuvent se désolidariser par déchirure. Il se produit alors une pénétration du sang au sein de l'artère et la formation d'un hématome. La paroi artérielle se trouve alors fragilisée et les débris libérés lors de la déchirure risquent de provoquer une embolie.

I. 4. LES TECHNIQUES CURATIVES

Les remèdes pouvant être apportés à ces pathologies sont classés selon la gravité, en deux catégories :

- Les techniques curatives endovasculaires (angioplastie et endoprothèse vasculaire).
- Les techniques réparatrices (chirurgie) qui restent incontournables pour un nombre élevé de patient. C'est dans le cadre de cette deuxième catégorie que s'inscrit notre travail.

II. PROTHESES VASCULAIRES

Les greffons vasculaires peuvent être classés selon :

- leur origine,
- leur usage,
- leur calibre,
- leur propriété…etc.

Compte tenu de l'orientation donné à nos travaux, nous adopterons pour notre part une classification basée sur l'origine (Figure 2) : **biologique et synthétique**.

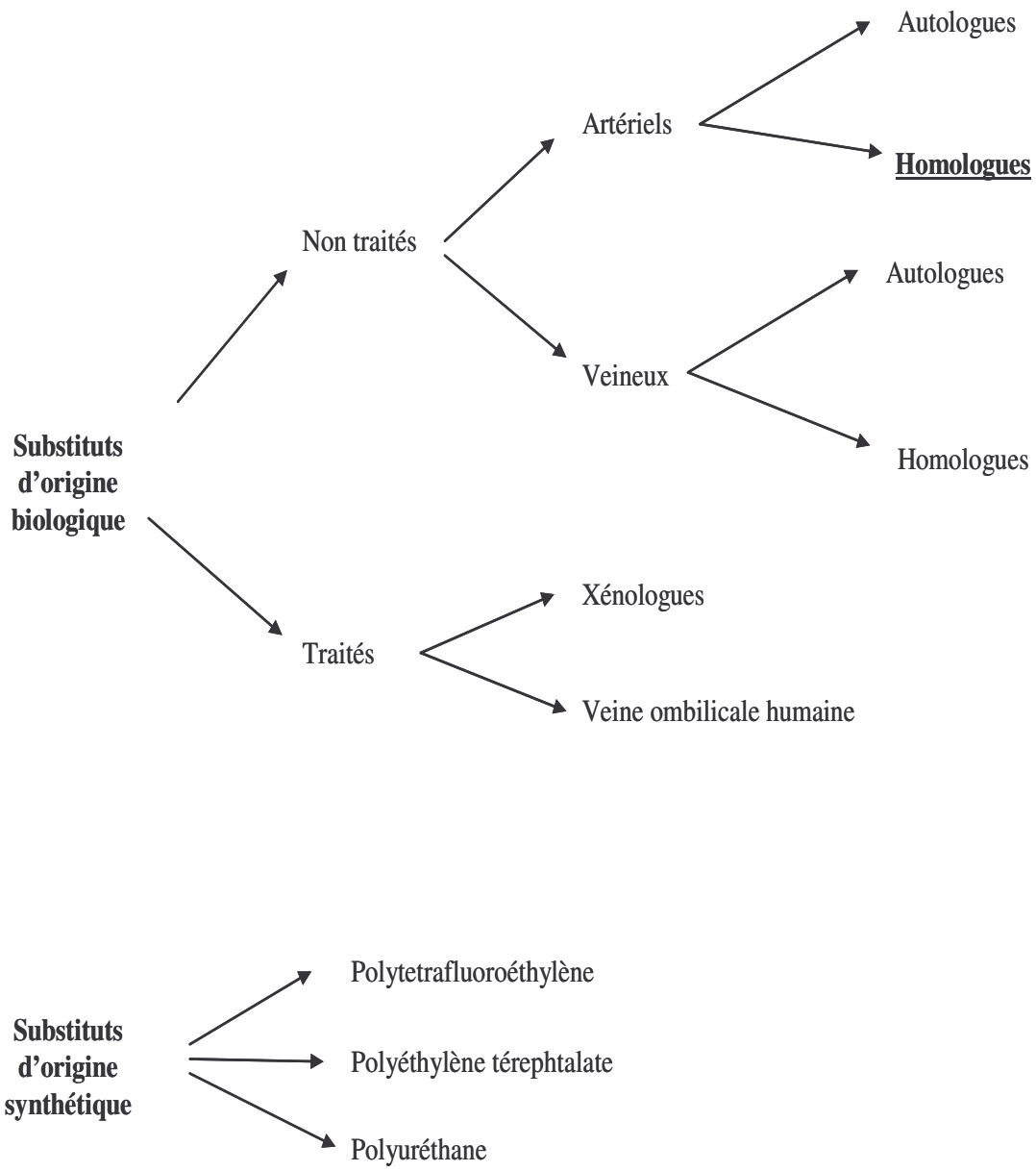


Figure 2 : ***Les différents types de substituts vasculaires***.

La figure 3 montre les différents sites du corps humain, sur lesquels peuvent être réalisés des pontages vasculaires.

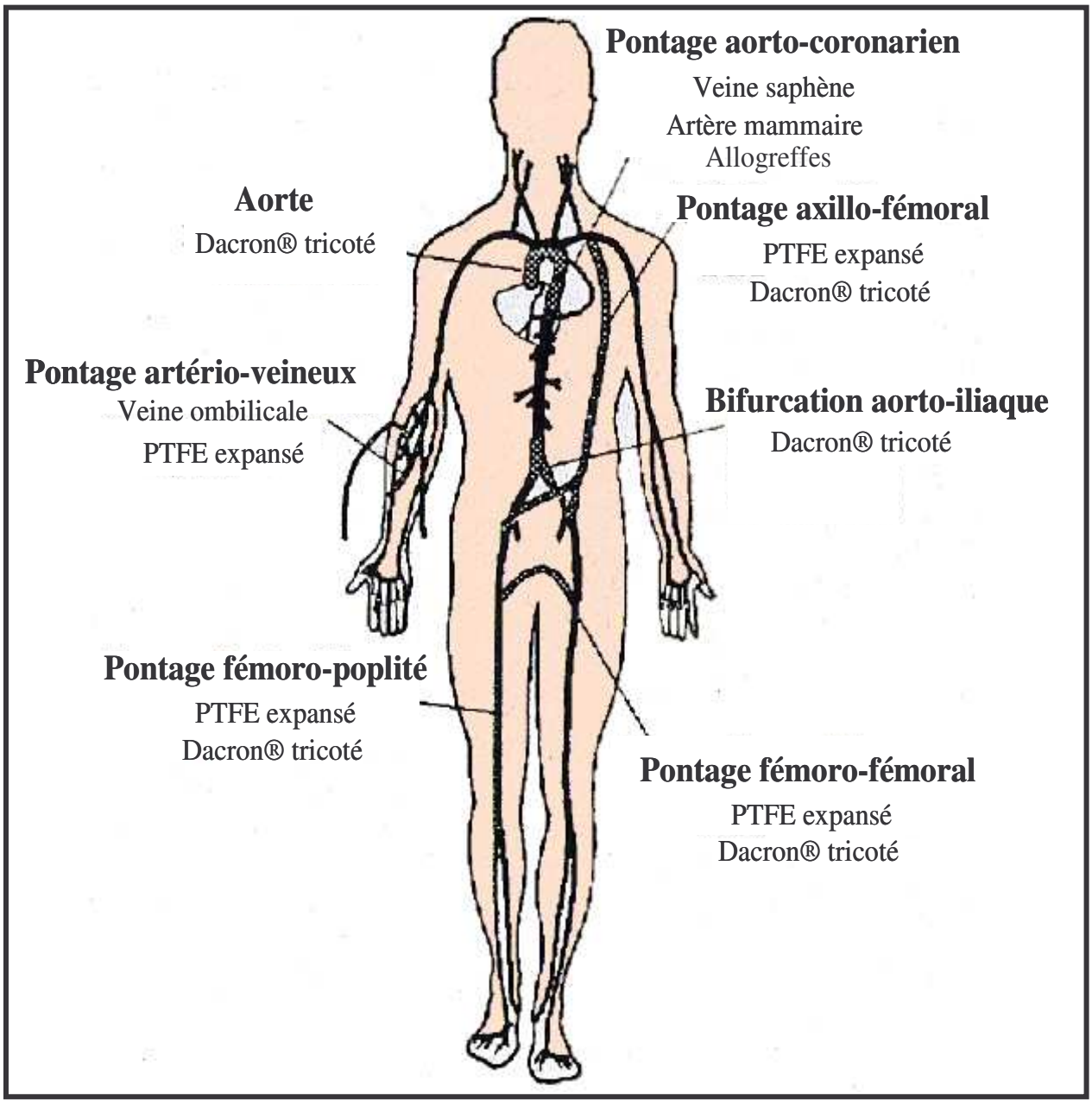


Figure 3 : ***Localisation des différentes artères pouvant être substituées chez l'homme.***

http://e2phy.in2p3.fr/2002/presentations/baquey.pdf.

II. 1. SUBSTITUTS VASCULAIRES D'ORIGINE BIOLOGIQUE

Les substituts d'origine biologique peuvent être subdivisé en deux groupes selon qu'elles soient utilisées en l'état ou après traitement.

II. 1. 1. SUBSTITUTS BIOLOGIQUES NON TRAITES

Ce sont des substituts vivants n'ayant subi aucun traitement susceptible de les rendre inertes. On distingue :

☞ **Les substituts autologues**

Appelé aussi autogreffes, ils sont utilisés notamment dans les pontages coronariens. Ces derniers sont obtenus après une intervention chirurgicale dans le but de modifier le parcours du sang par des déviations des artères coronaires obstruées pour améliorer la circulation sanguine et l'apport d'oxygène aux tissus. Cette intervention nécessite une greffe veineuse, prélevée sur la jambe, ou une greffe artérielle, prélevée sur la paroi de la cage thoracique ou sur le bras.

**** Les substituts autologues veineux***

Jose Goyanes (cité par [5]) a accompli avec succès dés 1906 la première interposition d'une greffe veineuse pour un segment d'anévrisme artériel chez l'homme.

Prés de cinq décennies plus tard, Kunlin a réalisé le premier pontage coronarien en utilisant la veine saphène autologue [6]. Depuis ce type de substitut constitue la meilleure alternative pour effectuer des pontages sur des artères de petit calibre. En effet, la supériorité du greffon veineux autologue, pour laquelle on enregistre 80 à 90% de réussite après un an de mise en place, est principalement attribué à sa surface luminale endothélialisée [7]. La dégénérescence tardive (occlusion au bout de 10 ans) de ces greffons est considérée comme un effet secondaire dû au développement d'une sténose hyperplasique ou fibroblastique au niveau de l'anastomose [8]. La prolifération cellulaire (cellules musculaires lisses), résulte en partie de la différence d'élasticité entre la veine saphène et l'artère receveuse [9, 10].

Les greffons veineux autologues ont aussi été utilisés pour la réalisation de pontages aorto-rénaux [11]. Cependant, dans près d'un tiers des cas, les greffes ont présenté des dilatations importantes et précoces. La technique de prélèvement des greffons veineux doit

être la plus atraumatique possible pour réduire les risques d'ischémie pariétale et de souffrance endothéliale. La crosse de la grande veine saphène est disséquée et sectionnée au ras de la veine fémorale, puis anastomosée sur une des artères du trépied fémoral. Son extrémité distale est ensuite disséquée et libérée des tissus environnants pour pouvoir être anastomosée sur l'artère receveuse.

***** ***Les substituts autologues artériels***

L'autogreffe artérielle constitue le substitut artériel idéal du fait de ses capacités de cicatrisation et de ses caractéristiques mécaniques. L'artère thoracique interne est la plus employée, notamment dans le cas de la revascularisation du myocarde. Les premiers résultats concernant l'utilisation de l'artère thoracique interne ont été obtenus par Loop *et al*. [12]. Ces résultats montrent que 90% des greffons restent fonctionnels au-delà de 10 ans après leur implantation. Dans une étude consacrée au pontage chirurgical à l'aide d'une artère mammaire, Cameron *et al.* [13] ont mis en évidence une différence significative de la fonctionnalité (*Patency*) entre les substituts artériels et les substituts veineux. Ce sont les propriétés mécaniques de la paroi artérielle ainsi que les propriétés biochimiques de l'endothélium artériel qui assurent une meilleure efficacité du substitut artériel et sa survie à long terme. Les inconvénients majeurs qui limitent l'utilisation des substituts artériels sont le nombre réduit des sites de prélèvement, la difficulté de dissection et leur fragilité [14].

☞ **Les substituts homologues**

Contrairement aux substituts autologues, les substituts homologues appelés aussi allogreffes, sont prélevés d'un donneur décédé par mort encéphalique. Le matériau fourni doît être le plus proche possible de celui auquel il est substitué. Des banques de tissus ont été créées pour assurer la fourniture aux chirurgiens du substitut recherché. Ainsi la conservation sur de très longues périodes de tissus viables constitue un enjeu socioéconomique important dans le domaine de la transplantation d'organes et un défi scientifique. Les conditions de prélèvement et de conservation sont définies en application des articles L. 1243-2 et R. 1243-3, notamment en ce qui concerne l'asepsie et le suivi du devenir sérologique du patient. La technique utilisée reste la congélation à des températures extrêmes (-180°C). Cette technique implique l'ajout de cryoprotecteurs comme le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le glycérol ou l'éthylène glycol.

Gross *et al.* (1948) ont réalisé la première procédure chirurgicale (pontage coronarien) en utilisant une veine saphène cryoconservée [5]. Dans une étude effectuée sur 91 patients Ochsner et ses collaborateurs [15] ont enregistré un taux de succès de 31% ; les greffons restent fonctionnels au delà de 12 mois après leur implantation. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Gelbfish *et al*. [16] qui ont obtenu moins de 50% de succès sur une population de 13 patients. Les modestes résultats obtenus ont pu être expliqués grâce à des travaux réalisés *in vitro*. En effet, les tests mécaniques effectués sur des segments artériels ou veineux cryoconservés ont révélé une instabilité structurelle de la matrice, qui entraîne une diminution de l'élasticité et de une distensibilité de la paroi vasculaire [17-19]. Les examens histologiques de ces segments ont révélé une perte cellulaire, notamment celle de l'endothélium natif conduisant à une thrombose précoce [20, 21].

II. 1. 2. SUBSTITUTS BIOLOGIQUES TRAITES

Le traitement des vaisseaux sanguins a pour but de garantir leur inertie sur le plan biologique. Ce sont des tissus non vivants appelés bioprothèses. On distingue deux groupes :

☞ **Hétérogreffes bovines**

Initialement ce type de substitut a été préparé en 1970 par Rosenberg [22] à partir d'artères carotides de boeuf et de veau. La figure 4 représente un segment de carotide bovine traitée.



Figure 4 : ***Aspect macroscopique d'une carotide bovine traitée*** [23].

L'artère est traitée à la ficine afin de la débarrasser des cellules, lui assurant une inertie biologique. Le squelette de collagène est ensuite réticulé afin d'assurer au substitut une rigidité suffisante. D'autres méthodes de préparation associant la réticulation à l'addition de charges de surface ont été décrites. Elles permettent de prévenir les faiblesses structurelles de ces substituts qui génèrent des dilatations et une calcification. Les auteurs ont montré qu'au bout de 28 mois d'implantation, seules 47% de ces prothèses restent fonctionnelles [22]. Plus

récemment une artère mammaire bovine a été préparée dans les conditions similaires, et a donné un pourcentage de fonctionnalité faible (< 16%) après 10 ans [24].

☞ **Veine ombilicale humaine traitée.**

La veine ombilicale humaine est obtenue à partir de la veine du cordon ombilical de nouveau-nés. Un mandrin est introduit dans sa lumière pour la redresser, puis elle est réticulée par un traitement au glutaraldéhyde ou au dialdéhyde d'amidon. La veine ombilicale ainsi traitée est ensuite enveloppée dans un large morceau de tissu (sorte de mantille) en polyéthylène téréphtalate pour augmenter sa résistance mécanique intrinsèque.

Les meilleurs résultats cliniques (50% de greffes gardent leur fonctionnalité au bout de 5 ans) ont été obtenus en 1978 par Dardik [25, 26], le concepteur de la prothèse Dardik-Biograft®. De plus, ce type prothèses présente l'avantage d'une conservation aisée et par conséquent d'une plus grande disponibilité. Ce substitut présente cependant l'inconvénient d'évoluer plus rapidement, de se dilater et de développer des anévrismes [27].

II. 2. SUBSTITUTS VASCULAIRES D'ORIGINE SYNTHETIQUE

Ces substituts sont élaborés à partir de matériaux polymères comme le polytetrafluoroéthylène et le polyéthylène téréphtalate. Ces matériaux se sont imposés en raison de leur inertie totale et de leur biocompatibilité. Le tableau 2 donne les caractéristiques physiques des principales prothèses synthétiques.

Tableau 2 : ***Caractéristiques physiques des prothèses vasculaires synthétiques***.

Prothèses synthétiques	Formule chimique	Résistance à la traction	Module d'élasticité
polytetrafluoroéthylène	$[-(CF_2-CF_2)-]_n$	14 MPa	0,5 GPa
Polyéthylène téréphtalate	$[O-C=O-C_6H_6-O-C=O-CH_2CH_2]_n$	170-180 MPa	14 GPa
Polyuréthane	$[NH-O=C-O-R-]_n$	20-90 MPa	5-1150 MPa

☞ **Prothèses en polytétrafluoroéthylène**

Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou Teflon® est un polymère linéaire thermoplastique qui possède des propriétés remarquables en particulier une grande inertie chimique. C'est un matériaux doux, facilement déformable, semi cristallin et son allongement est aisé. Il présente un coefficient de friction bas et reste stable à des températures élevées (327°C). De plus, il peut être transformé par frittage (densification sous des pressions élevées) pour la fabrication de tubes ou de canaux. Ces propriétés, associées à sa neutralité et sa biocompatibilité lui confèrent une valeur élevée pour une utilisation comme matériau d'implantation. Il est à noter cependant que l'hydrophobie du PTFE empêche l'adhésion des cellules endothéliales ce qui constitue un handicap pour la substitution des vaisseaux de petits calibres. Malgré cet handicap, le PTFE reste le matériel synthétique le plus utilisé pour les pontages fémoropoplités et axillofémoraux.

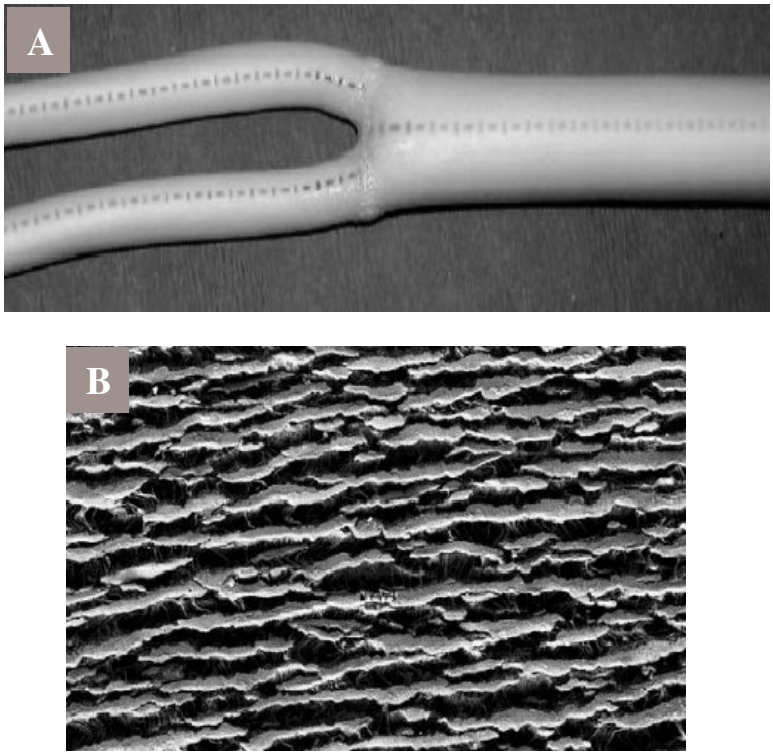


Figure 5 : ***Prothèses en polytetrafluoroéthylène microporeux.***

A : aspect macroscopique, B : observation de la surface luminale par microcopie électronique à balayage (grossissement × 250) [23].

En effet, la première génération de prothèses vasculaires Teflon® est apparue au début des années 60. Elles ont été rapidement abandonnées à cause des effets d'effilochage observés

sur les lignes d'anastomose [28]. La seconde génération a été commercialisée dans les années 70. La figure 5 représente une prothèse en PTFE microporeux. La structure microporeuse est obtenue par chauffage du polymère extrudé à une température supérieure à sa température de fusion. A cette température, les cristallites s'organisent en structures microporeuses. Les résultats enregistrés chez le lapin avec ce type de substitut sont de l'ordre de 12% au bout de sept mois [29].

Pour lever la contrainte résultante de l'hydrophobie (thrombogénécité) du PTFE, une modification de la surface interne du substitut a été entreprise. Elle consiste à recouvrir cette surface d'une fine couche de carbone. Cette traitement a montré une nette amélioration de la perméabilité après une semaine (86%) puis une décroissance spectaculaire de la perméabilité au cours des quatre dernières années (14%) [30].

☞ **Prothèses en polyéthylène téréphtalate**

Le polyéthylène téréphtalate (PET) ou Dacron® est un polymère dur et rigide. Il présente une bonne stabilité bidimensionnelle et une bonne résistance chimique sauf aux alcalis. Sa cristallinité est variable et son taux d'absorption d'eau est faible. Il se présente sous la forme textile tricotée ou tissée [31]. La figure 6 représente des exemples de prothèses de Dacron®.

Les prothèses vasculaires en Dacron® ont suivi plusieurs évolutions. L'amélioration des techniques d'élaboration (tissage) a modifié favorablement les propriétés de ces prothèses. En effet, les premières présentaient une faible porosité qui ralentissait la colonisation cellulaire et la cicatrisation, tandis que les prothèses à porosité élevée présentaient une faible stabilité mécanique.

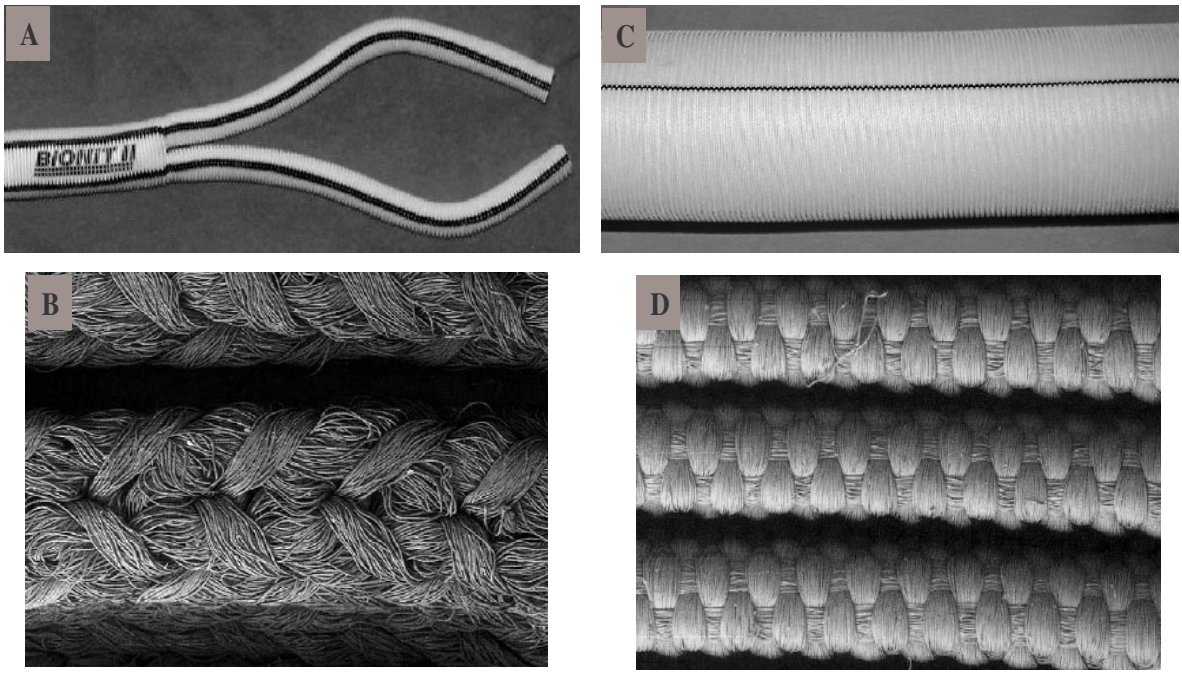


Figure 6 : ***Prothèse en poly (éthylène téréphtalate) tricoté*** *(A et B)* ***et tissé*** *(C et D).*

A et C : aspect macroscopique. B et D : observation de la surface interne des prothèses par microcopie électronique à balayage (grossissement × 250) [23].

L'incorporation de fibres texturées a permis d'améliorer la cicatrisation et la réendothélialisation de leur surface luminale, grâce à une meilleure encapsulation externe et à un meilleur ancrage tissulaire. Néanmoins, ces prothèses demeurent mécaniquement instables et subissent des dégradations chimiques. Par la suite, la généralisation des tricots chaînes et des structures tissées a permis d'améliorer leur résistance mécanique, tout en révélant une excellente capacité de cicatrisation. L'étenchéification de ces textiles est assurée par traitement préalable de la prothèse avec des molécules de la matrice extracellulaire comme la fibrine. Les prothèses Dacron® sont actuellement utilisées comme substituts des artères de gros et moyens calibres, mais demeurent inutilisables pour la substitution des vaisseaux de petits calibres (< 6 mm).

☞ **Prothèses en polyuréthane**

Des tentatives d'utiliser le polyuréthane (PU) comme substituts vasculaires ont été réalisées, en raison des qualités qu'il présente (élasticité, non générateur d'allergie….) et de la diversité des formes obtenues. Les premières prothèses en PU présentaient une structure non poreuse. Les études expérimentales et cliniques n'ont pas été concluantes [32]. A l'heure actuelle et à notre connaissance, une seule prothèse à base de PU est disponible. Il s'agit

d'une composite de PU et de silicone. Elle est constituée d'un enroulement de filaments de PU sur un mandrin. Les interstices sont comblés par de la gélatine. Cette prothèse composite est renforcée par une mantille externe de Dacron®. Elle est utilisée en clinique pour l'hémodialyse. La figure 7 représente un segment de prothèse de PU.

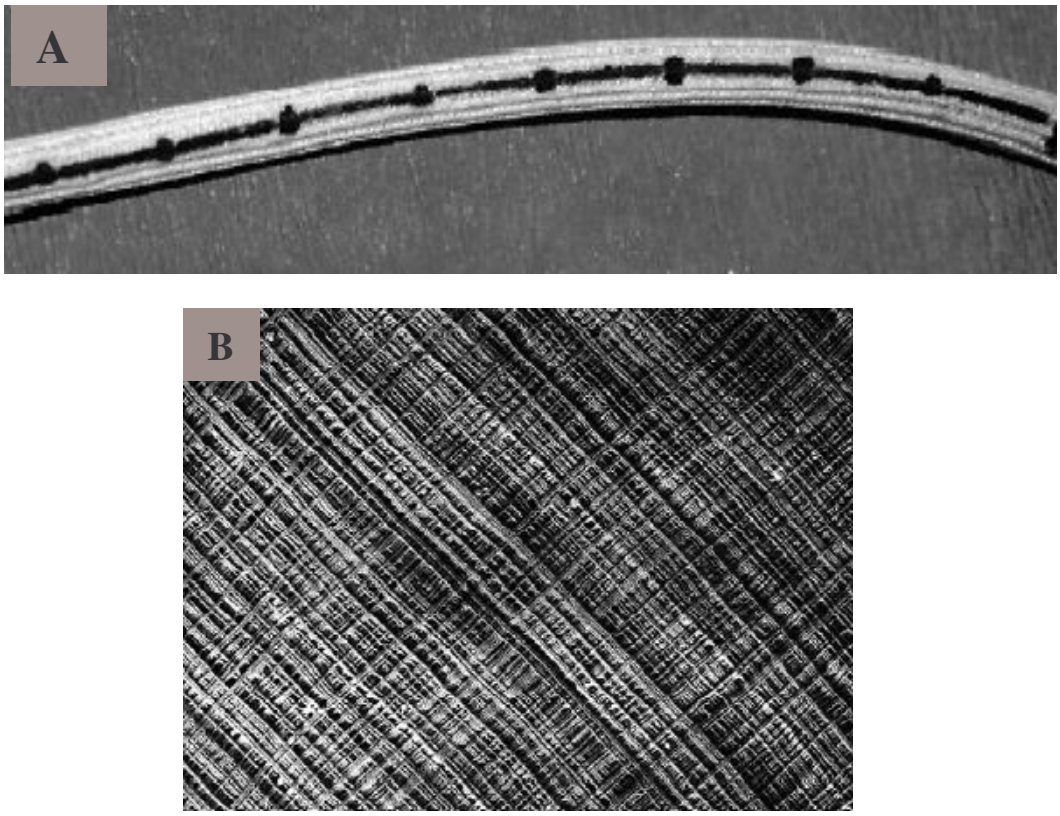


Figure 7 : ***Prothèse en polyuréthane.***

A : aspect macroscopique, B : observation de la surface interne par microcopie électronique à balayage (grossissement × 250) [23].

III. INGENIERIE TISSULAIRE VASCULAIRE

Grâce au progrès scientifiques et technologiques réalisés dans les sciences du vivant, la médecine et les sciences de l'ingénieur, de nombreuses thérapeutiques chirurgicales faisant appel à des biomatériaux sont apparues au cours de ces dernières décennies. L'émergence des concepts comme le génie tissulaire ou la bioingénierie ouvre de très larges perspectives pour la conception et la mise au point de tissus qui permettront de faire face au déficit d'organes devant une demande toujours croissante. Certains de ces produits sont proposés actuellement pour restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions tissulaires.

Dans des mises au points récentes [33-35] les auteurs ont énoncé des principes fondamentaux, notamment dans les domaines de la culture cellulaire, des biomatériaux, et des bioréacteurs qui permettent d'obtenir l'environnement approprié (stimulation biochimique et/ou mécanique) pour le développement du tissu recherché. Ces principes ont été appliqués dans le but de restaurer l'os après traumatisme [36], la peau dans le cas des brûlures [37] ou des ulcères [38], le cartilage après arthrose [39]…etc. Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'application de l'ingénierie tissulaire dans le domaine du vasculaire. Le développement des vaisseaux sanguins durables et fonctionnels pose un énorme défi. Les vaisseaux obtenus au laboratoire doivent obéir à certains critères comme être non immunogène, non thrombogène, stables dans le temps, avoir de caractéristiques mécaniques (élastiques, résistants à la pression)….etc [40].

Deux grandes approches de construction des substituts vasculaires par ingénierie tissulaire ont été envisagées. La première consiste à obtenir des greffons vasculaires autologues qui présentent des caractéristiques structurales proches des vaisseaux à remplacer [41]. La seconde propose d'endothélialiser la surface luminale des substituts vasculaires dans le but d'obtenir une surface non thrombogène [42]. C'est cette deuxième approche qui a été retenue dans le cadre de nos travaux.

III. 1. OBTENTION DE VAISSEAUX PAR GENIE TISSULAIRE

Ces vaisseaux ont été initialement imaginés soit pour des autogreffes, soit pour réaliser des tests pharmacologiques sans avoir recours à l'animal. Différentes stratégies ont été développées pour la reconstitution des vaisseaux possédant des caractéristiques histologiques et fonctionnelles se rapprochant le plus possible de celles des tissus natifs. Le tableau 3

résume les différentes matrices et cellules utilisées pour la préparation de vaisseaux artificiels, les propriétés mécaniques qui en résultent ainsi que l'évaluation de leur perméabilité à dates données. Ces préparations font intervenir diverses matrices (collagène et polymères poreux) et diverses cellules (musculaires et/ou endothéliales).

III. 1. 1. CONSTRUCTIONS UTILISANT DU COLLAGENE ET DES CELLULES VASCULAIRES CULTIVEES EN CONDITIONS STATIQUES

Les premiers travaux utilisant l'ingénierie tissulaire pour la préparation de vaisseaux artificiels ont été réalisés par Weinberg et Bell en 1986 [43]. Le protocole utilisé est basé sur l'inclusion de fibroblastes et de cellules musculaires lisses bovines dans des gels de collagène naturels tubulaires, à l'intérieur desquels ont été ensemencées des cellules endothéliales [43]. Les trois couches composant la paroi vasculaire sont reconstituées (selon les étapes décrites sur la figure 8 a). Elles présentent des aspects macroscopique et histologique semblables à ceux des vaisseaux natifs. Cependant la résistance mécanique à la pression est trop faible (pression de rupture : 10 mmHg seulement). L'heureux *et al.* [44] ont confirmé tous ces résultats en utilisant les collagènes de type I et III et des cellules humaines. Les essais réalisés sur le chien ont révélé des ruptures au bout de quelques jours après l'implantation [45]. Ces résultats, peu concluants, limitent l'utilisation de ces substituts en chirurgie vasculaire clinique.

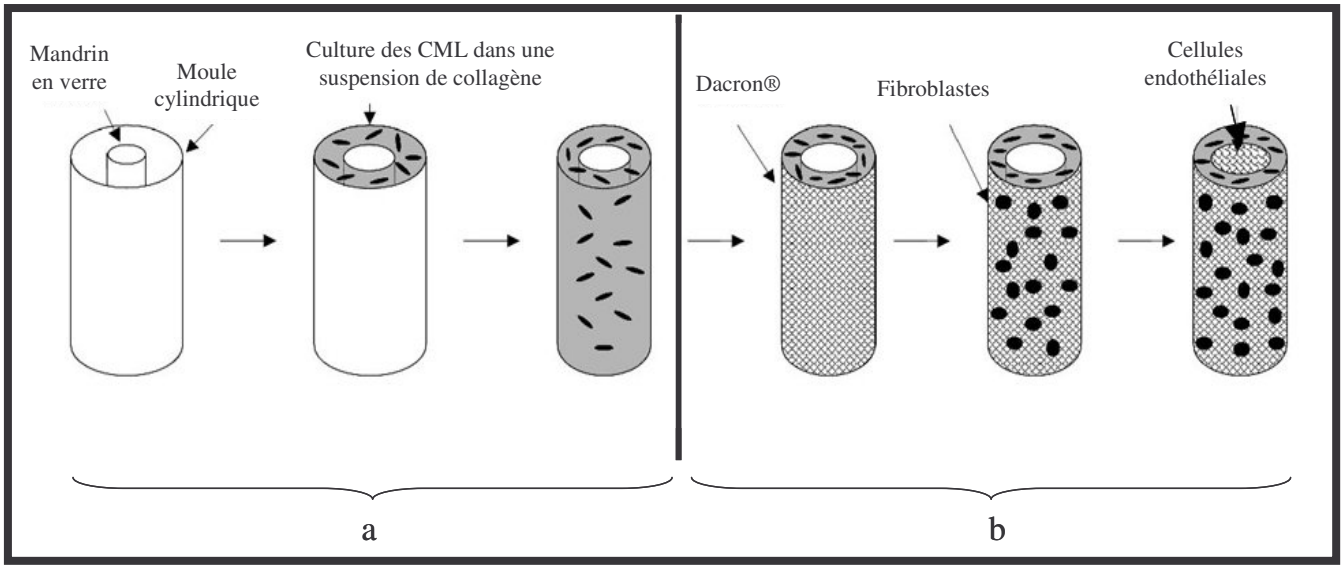


Figure 8 : ***Représentation schématique d'une construction à base de collagène*** *(a)* ***et amélioration de ses propriétés mécaniques avec du Dacron®*** *(b)* [46].

Plusieurs tentatives d'amélioration des propriétés mécaniques de ce type de vaisseau ont été faites [47-49]. Les trois tuniques sont enveloppées dans des mailles de Dacron® (Figure 8b). Cette technique permet d'obtenir des pressions de rupture comprises entre 120-180 mmHg. De plus, la fonctionnalité se trouve améliorée puisque 65% de ces substituts restent perméables six mois après l'implantation [50].

III. 1. 2. CONSTRUCTIONS UTILISANT DES POLYMERES POREUX ET DES CELLULES VASCULAIRES CULTIVEES EN CONDITIONS DYNAMIQUES

Niklason *et al.* [51, 52] ont entrepris de développer de nouveaux vaisseaux dans des conditions dynamiques. Pour cela, ils ont utilisé des cellules musculaires lisses (CML) d'aorte bovine ensemencées dans un tube polymère biodégradable élaboré à partir d'acide polyglycolique (PGA). Ces cellules sont cultivées dans un bioréacteur pouvant mimer les contraintes d'un vaisseau sanguin natif. Ce bioréacteur est décrit sur la figure 9.

Ces cellules ainsi cultivées, remplissent les treillis de la matrice polymère et produisent de la matrice extracellulaire (essentiellement du collagène). Après 8 semaines de culture, on réalise alors l'endothélialisation de la surface luminale du vaisseau [51, 53].

Les vaisseaux obtenus dans ces conditions présentent une densité cellulaire et un contenu en collagène proches des vaisseaux natifs, et résistent à des pressions de rupture de l'ordre de 2000 mmHg. Des essais réalisés sur le porc ont révélé une bonne perméabilité à un mois. Cependant, le PGA étant biodégradable, se pose alors le problème l'incidence de la dégradation des tissus vivants. Par ailleurs, la résorption rapide du polymère diminue fortement la résistance du vaisseau à la pression systémique.

L'association du PGA à d'autres polymères comme le poly-4-hydroxybutyrate (P4HB) [53], l'acide poly L lactique (PLLA), le polyéthylène glycol [54] ou le polycaprolactone (PCL) [55] a permis d'améliorer les caractéristiques mécaniques du PGA.

Une application clinique réalisée à l'aide de substituts vasculaires à base de matrices biodégradables (association de PLLA, et de PGA et de PCL) a donné des résultats positifs après 42 mois d'implantation ; aucune occlusion ni anévrisme n'ont été observées [56].

Tableau 3: ***Différentes préparation de vaisseaux artificiels.***

Matrices	Cellules	Propriétés mécaniques	Site d'implantation	Perméabilité	Références
Collagène naturel	CML, CE et fibroblastes bovins	Faible (<100 mmHg)	_	_	[43]
Collagène de type I et III	CE et CML de la veine ombilicale humaine	Faible	_	_	[44]
Collagène de type I	CE et CML de la jugulaire	Faible	Veine cave postérieur de chien	65% à 6 mois	[45]
PGA	CML et CE bovins	Correcte	Artère saphène	100% à 4 semaines	[51]
PGA-P4HB	CE et Fibroblastes bovins	Correctes	_	_	[53]
_	CE et CML de la veine ombilicale humaine Fibroblastes de la peau humaine	Bonnes	Artère Fémorale de chien	50% à 7 jours	[41]
_	Fibroblastes de la peau humaine et CEs de la veine saphène	Similaires au vaisseaux natifs	Artère iliaque et aorte abdominale chez le chien, rat et primates	85% à 8 mois	[57]

CML, cellules musculaires lisses ; CE, cellules endothéliales ; PGA, acide polyglycolique ; PHA, polyhydroxyalkanoate ; P-4HB, poly-4-hydroxybutyrate.

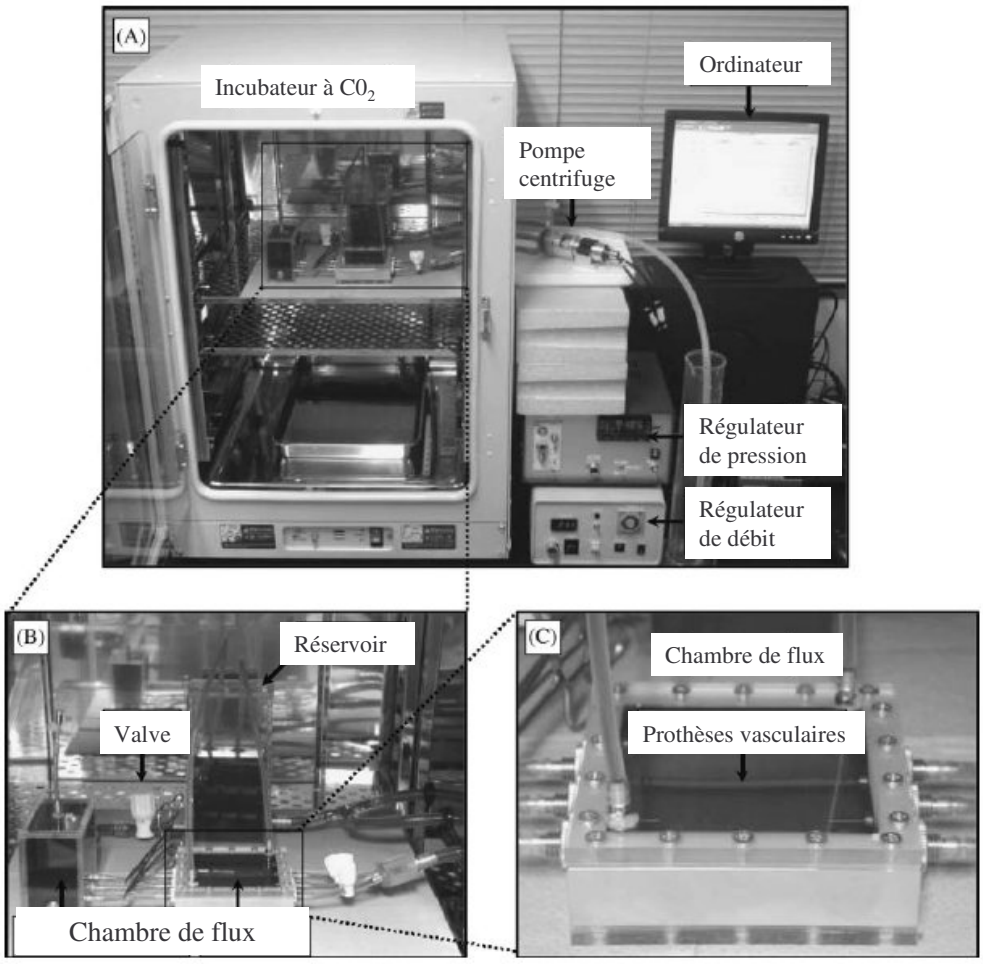


Figure 9 : ***Vue du dispositif pour générer un flux pulsatile in vitro.***

A et B : Bioréacteur, C : Chambre de flux [58].

III. 1. 3. ASSEMBLAGE DE FEUILLETS CELLULAIRES

Un modèle imaginé par L'Heureux *et al.* [41] a été développé à partir des substituts de peau. Le substitut vasculaire est construit à partir d'une méthode d'assemblement de feuillets cellulaires. Chacun des trois types cellulaires (fibroblastes, CML et CE) est cultivé à partir de tissus humains; les CE et CML sont respectivement isolées de l'endothélium et de la média de la veine issue du cordon ombilical. Les fibroblastes proviennent du derme. Des feuillets tissulaires produits à partir des cellules musculaires lisses (cultivées dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique pour favoriser la formation de la matrice extracellulaire) et des fibroblastes sont enroulés autour d'une matrice déposée sur un mandrin. Ceci permet la

reconstruction de la média et de l'adventice. Le mandrin est enlevé et les CE sont ensemencées à l'intérieur. Les différentes couches du vaisseau, décrites précédemment, ont pu être reconstituées (Figure 10). Ce substitut présente l'avantage de pouvoir résister à de fortes pressions de rupture (densité du collagène élevé). D'autres composantes de la matrice extracellulaire sont également présents, dont l'élastine dans l'adventice. Les essais réalisés *in vitro* chez le chien ont cependant montré une dissection après une semaine.

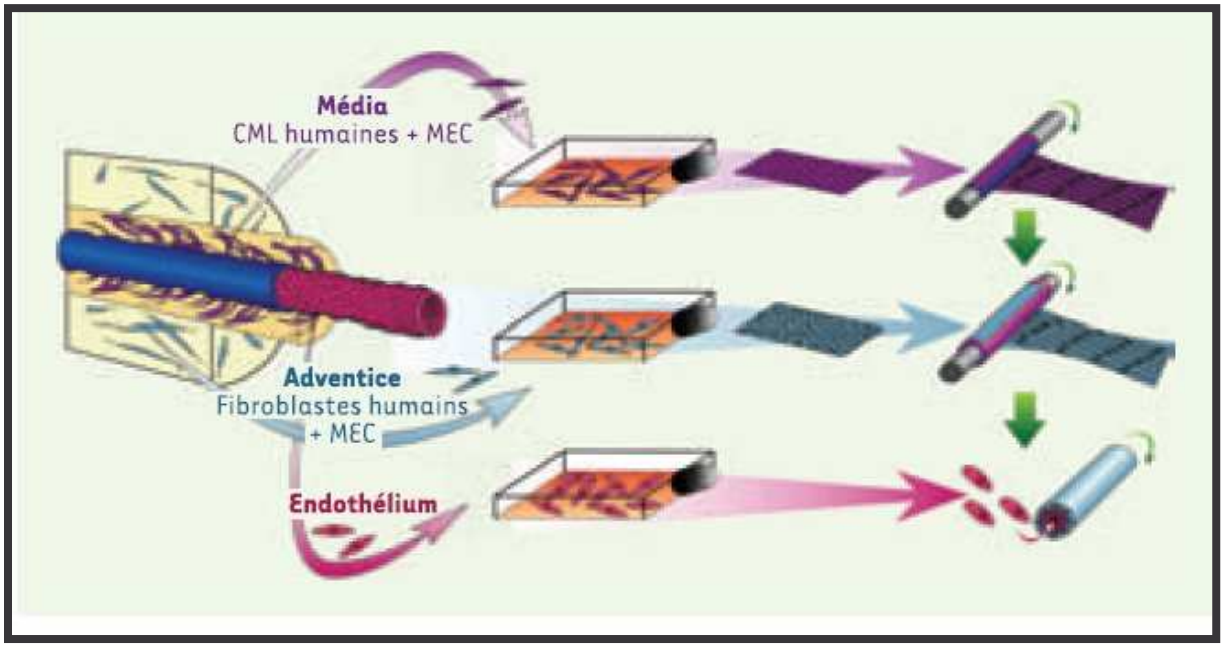


Figure 10 : ***Production de vaisseaux humains par auto assemblage.***

CML : Cellules musculaires lisses, MEC : Matrice extracellulaire [59].

Une étude publiée récemment par ces mêmes auteurs [57] a montré que l'assemblage du feuillet externe (Fibroblastes) et de l'endothélium a permis de reconstituer un nouveau vaisseau avec des propriétés mécaniques proches du vaisseau natif. Les résultats obtenus après 8 mois d'implantation chez le chien et chez le singe ont montré que 86% des substituts restaient perméables. Les examens histologiques effectués *ex vivo* ont révélé la formation du *vasa vasorum* et de la média (par migration des cellules musculaires lisses). Les essais cliniques, chez l'homme, sont à notre connaissance en cours de réalisation en Argentine et en Europe de l'est. Malgrès tous ces progrès, le temps de fabrication et de maturation (plus de deux mois) de ces vaisseaux demeure une limite à leur utilisation dans des situations d'urgence.

III. 2. Endothélialisation des substituts vasculaires

Cette approche consiste à former une monocouche de cellules endothéliales sur la surface luminale d'une matrice (substitut vasculaire synthétique ou biologique) avant son implantation (Figure 10). Cela implique la disponibilité d'une matrice vasculaire implantable, d'une source de CE autologues et nécessite un traitement dans le but est de faire adhérer ces cellules et les maintenir dans la lumière du substitut [60]. Ce traitement fait appel à différentes techniques de recouvrement surfacique décrites par Kerdjoudj *et al.* [61]. La figure 11 résume le protocole qui permet d'obtenir un substitut vasculaire endothélialisé. Nous allons décrire de manière précise dans ce qui suit les matrices et les cellules utilisables ainsi que les traitements et le conditionnement.

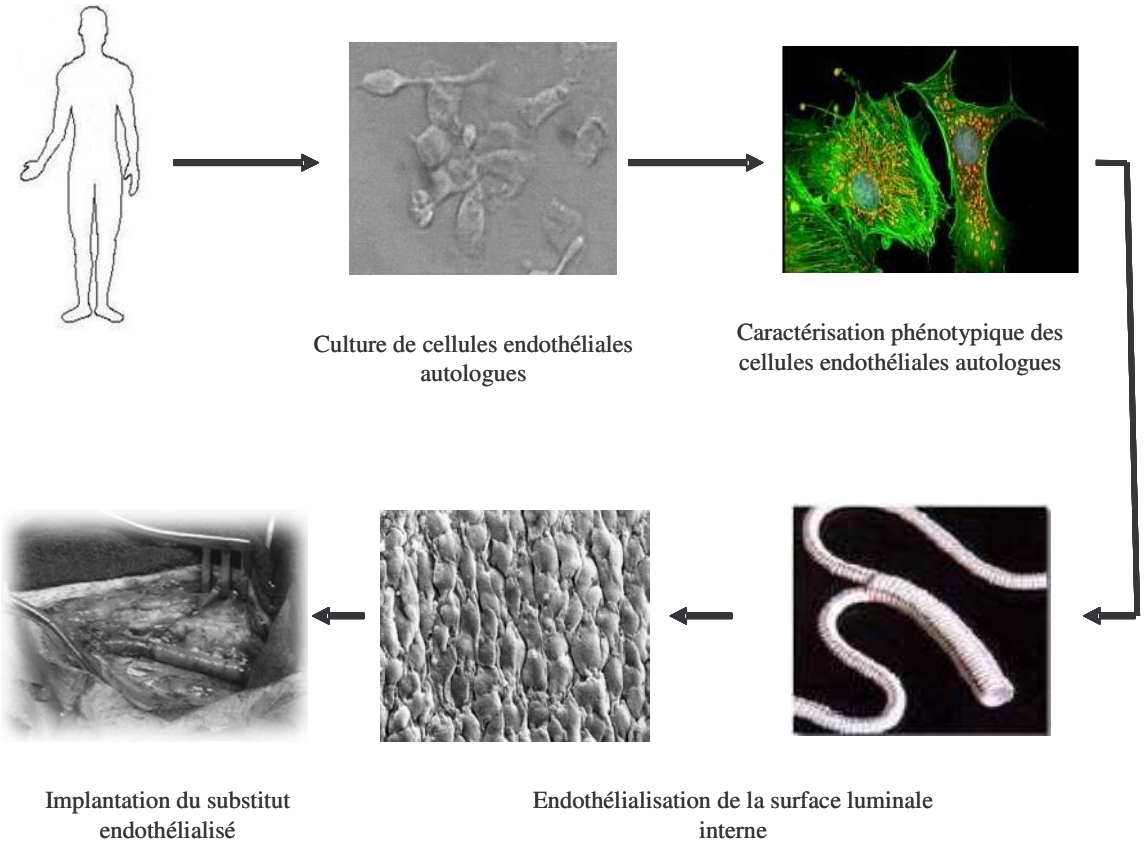


Figure 11 : ***Protocole d'obtention d'un substitut vasculaire endothélialisé*** [61].

III. 2. 1. MATRICES

Les matrices peuvent avoir deux origines : naturelle ou synthétique.

☞ **Matrices naturelles**

Ce sont des matrices biologiques, dérivées de tissus humains (allogreffes) ou animaux (xénogreffes). Elles sont sont divisées en deux groupes selon l'origine du prélèvement : [46, 40]

a- *les conduits vasculaires.*

b- *les conduits avasculaires*.

Les conduits vasculaires sont généralement congelés à –180°C puis décellularisées [62, 63] ou désendothélialisées [64]. Les techniques de décellularisation utilisées sont diverses. Elles comprennent :

- des traitements chimiques (Triton et dodecyl sulfate de sodium SDS),
- des traitements enzymatiques à la trypsine ou à la collagènase,
- des traitements mécaniques (éversion et abrasion).

Les matrices biologiques décellularisées présentent l'avantage d'être disponibles et d'avoir un faible pouvoir antigénique résultant de la congélation et de la décellularisation.

Plusieurs types de conduits avasculaires décellularisés ont été utilisés. Akimaru *et al*. [65] ont développé des substituts à partir d'uretère bovine réticulée chimiquement ou le péritoine. Sarac *et al.* [66] ont utilisé des prélèvements de fascia musculaire dorsal du lapin. Yavuz *et al.* [67] ont employé de la sous-muqueuse intestinale. Plusieurs essais sur l'animal ont été réalisés. Les résultats sont variables et les meilleurs ont été obtenus avec la sous muqueuse intestinale (SIS : *Small Intestinal Submucosa*) [68]. Ce bon résultat s'explique par le fait que le SIS est un biomatériau acellulaire naturel dérivé de la sous muqueuse du jéjunum de porc, composé de plus de 90% de collagène avec prédominance de collagène de type I [69]. Par ailleurs, cette matrice extracellulaire contient également des glycoaminoglycanes, des glycoprotéines, et certains facteurs de croissance angiogéniques comme le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF)… Enfin le SIS possède des qualités mécaniques intéressantes, notamment la résistance à l'étirement et à la suture.

Les essais expérimentaux effectués sur le chien ont montré que 75% des SIS restaient perméables au bout de 34 mois [68].

☞ **Les matrices synthétiques**

Lorsqu'une prothèse vasculaire synthétique de type polytetrafluoroéthylène expansé (PTFEe) est implantée chez l'homme, le processus d'endothélialisation se limite uniquement aux sites d'anastomoses [70, 71]. Au niveau des substituts de petit diamètre, la situation est problématique car le débit sanguin est plus faible (en comparaison avec les gros vaisseaux), il en résulte un dépôt rapide de caillots sur les surfaces luminales thrombogènes.

Afin d'améliorer la perméabilité fonctionnelle des prothèses vasculaires synthétiques de petit diamètre, Herring proposa en 1978 [72] d'ensemencer leur surface luminale avec des CE. Son concept d'ensemencement est basé sur le fait que ces cellules forment un endothélium possédant les propriétés antithrombogènique. Zilla *et al.* [42] ont été les premiers à fonctionnaliser des substituts synthétiques avec des cellules endothéliales autologues. Les résultats cliniques satisfaisants obtenus par cette équipe ont encouragé de nombreux chercheurs à explorer cette voie. Le tableau 4 décrit les substituts utilisés et les résultats cliniques obtenus. Bordenave *et al*. [73] ont récemment publié les résultats cliniques obtenus au cours de ces 20 dernières années à l'aide de matrices synthétiques en PTFEe endothélialisées.

Tableau 4 : ***Résultats cliniques obtenus après endothélialisation des substituts vasculaires.***

Substituts vasculaires	Nombre de substituts implantés	perméabilité des substituts	Références
Veine cryoconservée	15	85% à 3 ans	[64]
PTFE	14	91% à 2,5 ans	[74]
PTFEe	113	65% à 9 ans	[75]
Dacron®	21	67% ± 37% à 6,3 ans	[76]
PTFE	66	38% ± 9% à 2,5 ans	[72]
PTFE	9	100% à 14 semaines	[42]

III. 2. 2. CELLULES ENDOTHELIALES

☞ Endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire a été largement défini et décrit par Boneu et Cazenave [77]. Il est formé d'une monocouche continue de CE et occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. En effet, il maintient la vasomotricité des vaisseaux, inhibe la prolifération anormale des cellules musculaires lisses, et assure la fluidité du sang.

☞ Cytologie des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales mesurent entre 0,3 - 0,5 µm d'épaisseur, 25 - 50 µm de long et 15 µm de large. Elles ont une forme polygonale et leur juxtaposition forme un tapis en mosaïque. Elles sont orientées dans la direction du flux sanguin (Figure 12).

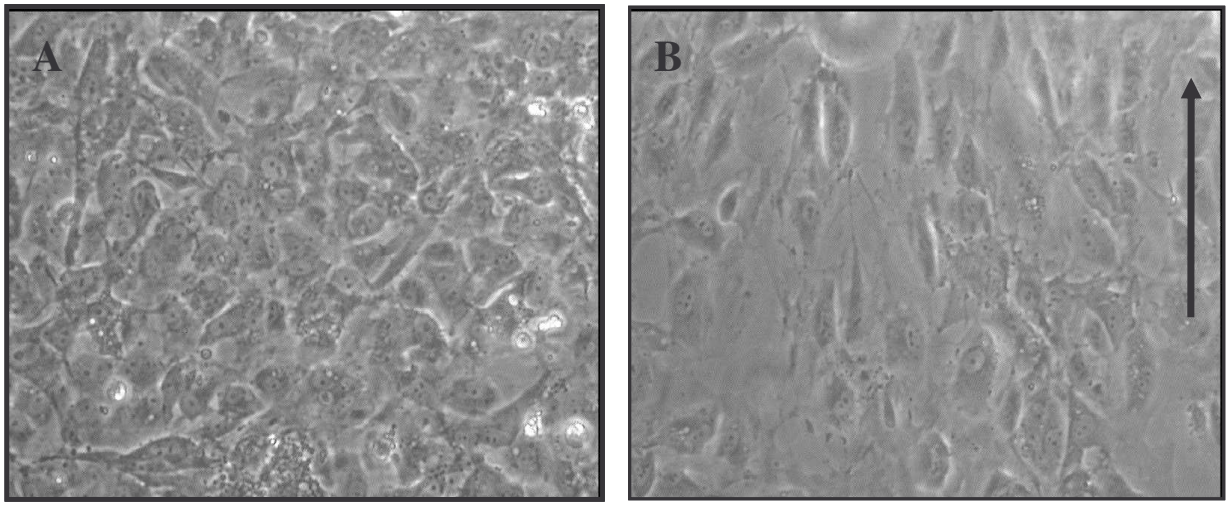


Figure 12 : ***Réorganisation des cellules endothéliales exposées au flux***.

A : monocouche cultivée en condition statique, B monocouche exposée pendant 6 heuresà un flux laminaire (contraintes de cisaillement 1 Pa) ; l'allongement individuel des cellules et leur orientation se fait dans la direction du flux (indiqué par la flèche) image obtenue au microscope à contraste de phase [78].

Les constituants intracellulaires sont ceux retrouvés habituellement dans le cytoplasme de toutes les cellules, tels que les mitochondries, les réticulums endoplasmiques lisses et rugueux, le cytosquelette…etc. Cependant, les CE (Figure 13) se distinguent par la présence d'une structure qu'elles partagent avec les mégacaryocytes, appelée corps de Weibel Palade.

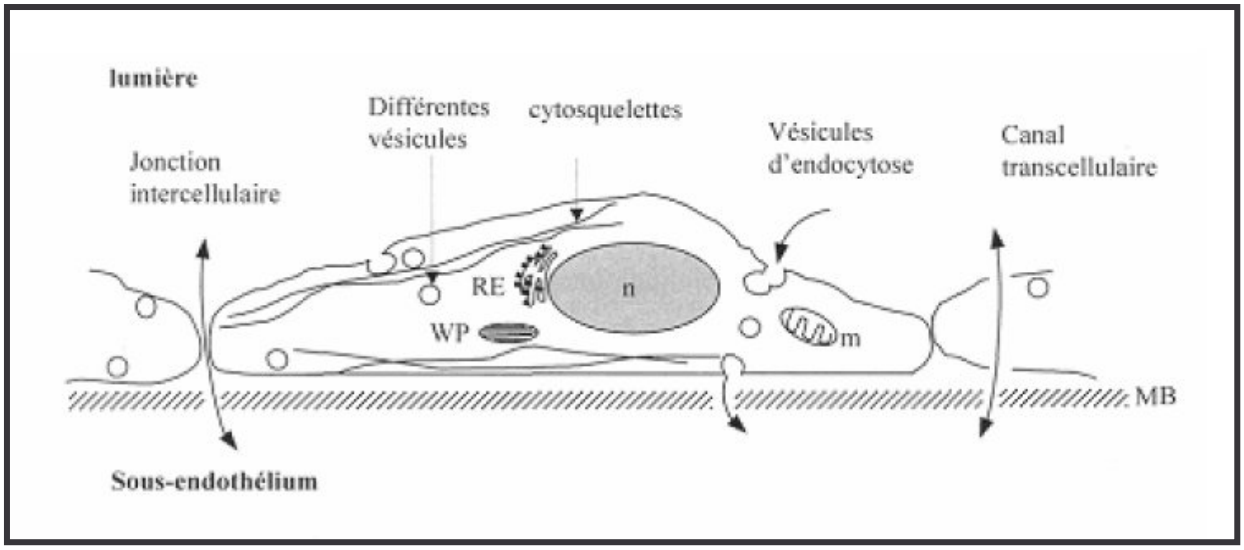


Figure 13 : ***Structure schématique d'une cellule endothéliale.***

m : mitochondrie, RE : reticulum endoplasmique, MB : membrane basale, n : noyau, WP : corps de Weibel-palade [79].

Ces corps se présentent sous la forme de bâtonnets de 3 µm de long et 0,1 µm de large. Les corps de Weibel Palade sont des lieux de stockage du facteur de von Willebrand (vWF) [80], impliqué dans les phénomènes d'hémostase.

Les cellules endothéliales *in vivo* s'attachent par leur **côté basal** à la surface du vaisseau sanguin par interaction avec le sous endothélium. Celui-ci forme une matrice de molécules procoagulantes parfaitement organisées comprenant collagène, élastine, fibronectine, laminine, vWF…etc. Le sous-endothélium est responsable de l'intégrité structurale, de la tension mécanique et de l'élasticité des vaisseaux. Le **côté apical** de la CE est en contact avec le sang circulant et représente la surface non thrombogène du fait de son organisation et de sa production de substances anticoagulantes et antiagrégantes.

La fonctionnalité de l'endothélium vasculaire peut être appréhendée de plusieurs façons :

- Il se comporte comme une barrière de perméabilité sélective qui autorise et régule les échanges de molécules de tailles variables, eau, sels, protéines, entre le sang et les tissus. Les modes et mécanismes de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire.

- Il peut synthétiser et secréter de nombreuses substances vasoactives qui diffusent vers le muscle sous-jacent et provoquent sa contraction ou sa relaxation [81-84].

- Un endothélium normal est non thrombogène. Le tableau 5 résume les phénomènes activateurs et inhibiteurs de la thrombogénèse.

Tableau 5 : ***Facteurs intervenant dans la balance des propriétés thrombogéniques des cellules endothéliales (d'après les données extraites de Mc Guigan et al.*** [85]).

Thromborésistance	**Thromboformation**
Charge négative élevée (Glycocalyx)	Collagène
Prostacycline (PGI2)	Fibronectine
Thrombomoduline	Facteur von Willebrand (vWF)
Héparane sulfate	Facteur tissulaire
Pro urkinase	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
Activateur tissulaire du plasminogène	
ADPase	

☞ **Sources des cellules endothéliales autologues utilisées en ingénierie vasculaire**

Les cellules allogéniques ou xénogéniques ne présentent que peu d'intérêt en ingénierie vasculaire car elles nécessitent une protection vis-à-vis du système immunitaire. L'utilisation de cellules autologues permet d'éviter toute réaction immunologique. En raison des difficultés d'obtention, la source des cellules autologues constitue un facteur limitant pour leur utilisation en ingénierie vasculaire. Mc Guigan *et al.* [85] ont énuméré les différentes possibilités d'approvisionnement en CE (Figure 14). On distingue deux catégories de cellules endothéliales : les cellules matures et les cellules souches.

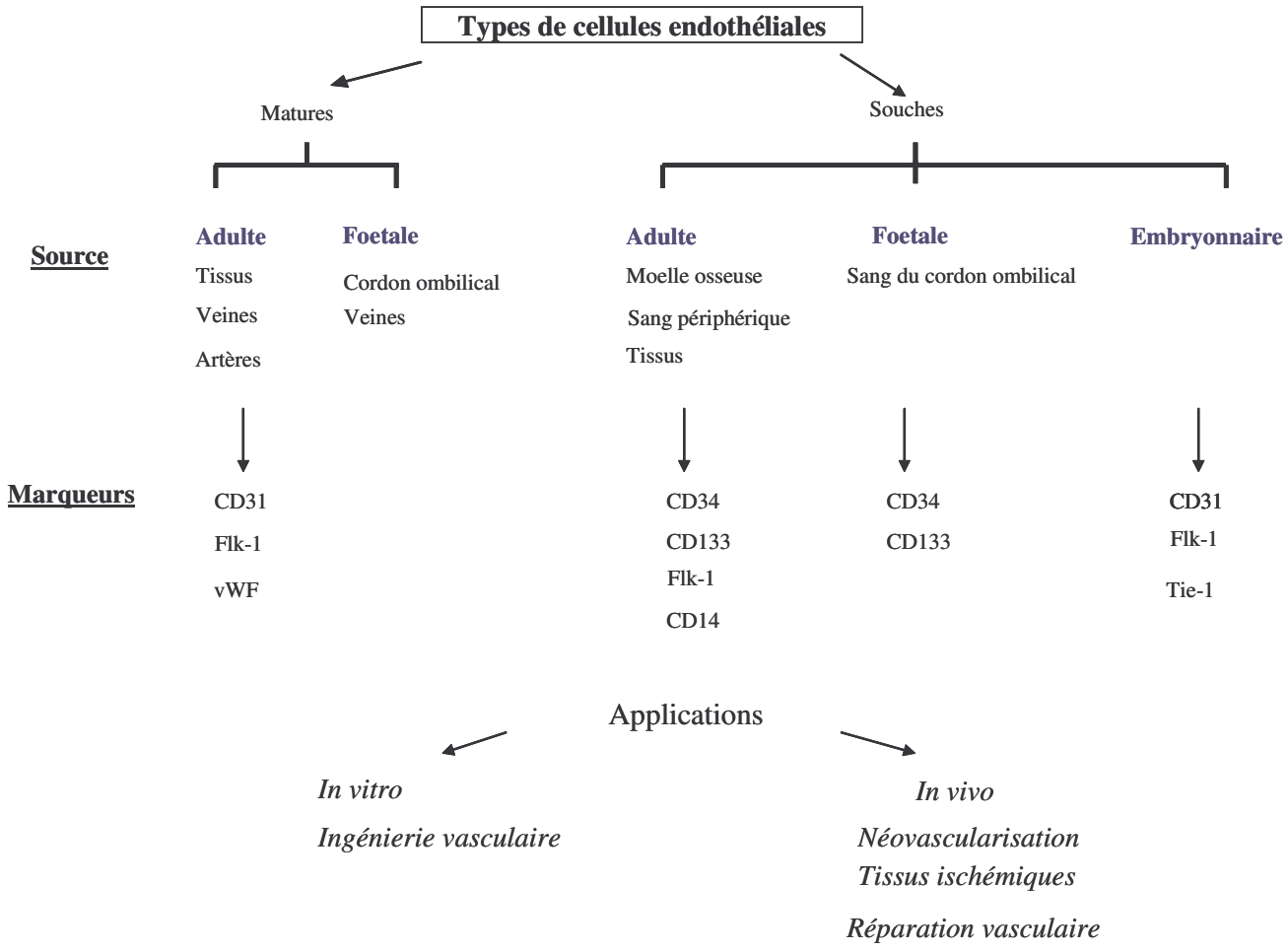


Figure 14 : ***Différentes sources d'approvisionnement en cellules endothéliales*** [85].

❖ Cellules autologues matures

Deux sources de cellules endothéliales primaires ont été décrites dans la littérature.

La première se propose de recueillir des cellules autologues issues de la veine prélevée directement chez le patient [86]. Dans ce cas, les CE sont récoltées, cultivées et amplifiées *in vitro* avant d'être ensemencées dans la matrice vasculaire. L'inconvénient de cette procédure est l'obtention d'un nombre insuffisant de cellules nécessaires à une endothélialisation totale

du substitut vasculaire. De plus, elle nécessite une première intervention chirurgicale permettant d'obtenir une veine autologue [42, 87].

La seconde source utilise les cellules microvasculaires provenant de tissus adipeux (*omentum* ou graisses sous-cutanées) [88-90]. Elle présente l'avantage de faire appel à une liposuccion qui n'implique pas l'isolement des cellules provenant de veines. Depuis 1989, on pratique leur ensemencement à haute densité (à travers les interstices de la prothèse), mieux connu sous le nom de « *asoddings* » et qui permet de réaliser l'extraction et l'ensemencement des cellules au cours de la même intervention [91].

En définitive, l'utilisation de cellules issues de la culture primaire présente des inconvénients majeurs telles que leur faible disponibilité, la difficulté de recueil et la mauvaise qualité fonctionnelle des cellules après expansion *in vitro.* En effet, l'amplification des cellules endothéliales matures se traduit par une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux, signe d'une dédifférenciation cellulaire.

❖ **Cellules souches**

Le terme de " **cellule souche** " est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de proliférer et produire des cellules spécialisées, avec la morphologie et les fonctions spécifiques du tissu. Ce processus dit de différenciation, est irréversible. Une cellule souche n'exprime, quant à elle, aucune spécialisation, on la dit " indifférenciée ". Il existe 3 types de cellules souches :

* **Cellules souches embryonnaires**

Elles sont issues de la masse interne du blastocyste, structure de 16 - 40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. S'il est implanté dans l'utérus progestatif, le blastocyste entier peut se développer en un foetus viable.

Au ce stade de développement, chacune des cellules est pluripotente, voire totipotente puisqu'elle peut produire tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme), les tissus qui en dérivent ainsi que les cellules germinales. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules souches embryonnaires ne présentent plus la possibilité de se développer en un embryon ; cependant, elles peuvent être cultivées au laboratoire « à l'infini » tout en conservant leur caractère de pluripotence. Placées dans des conditions de culture précises

(stimulations biochimiques et/ou mécanqiues), ces cellules ont également la capacité de se différencier en cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (coeur, sang, neurones,.....).

Obtenir des cellules souches embryonnaires implique soit la production d'embryons humains, soit l'utilisation d'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*. L'utilisation des cellules souches embryonnaires pose un double problèmes éthiques : leur prélèvement signifie la destruction précoce de l'embryon et elles peuvent aussi être utilisées à des fins de clonage.

*** Cellules souches fœtales**

Les organes et les tissus prélevés lors des interruptions volontaires de grossesse (IVG) comportent un important contingent de cellules souches. Ces cellules multipotentes ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire bien défini. Le recueil de ce type de tissus présente un défi éthique et technique (lourdeur de la procédure, matériel nécessaire à l'intervention).

*** Cellules souches des tissus adultes**

Ce sont des cellules indifférenciées que l'on trouve au sein de certains tissus (sang, peau, intestin…). Généralement multipotentes, ces cellules sont capables de donner naissance à différentes lignées cellulaires pour un tissu donné. Elles sont la base du renouvellement naturel d'un tissu et de sa réparation à la suite d'une lésion. Ces cellules sont déjà utilisées dans des traitements de plus d'une centaine de maladies. Elles sont qualifiées de somatiques, et peuvent être trouvées non seulement chez les adultes, mais aussi chez les enfants et même dans le cordon ombilical. Parmi ces cellules on peut distinguer :

Les cellules souches mésenchymateuses : elles proviennent d'une partie de l'embryon appelée : mésenchyme. Placées dans des conditions favorables, elles peuvent se différencier en tissus tels que le muscle, le cartilage, le tendon, le tissu conjonctif…

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse ont été utilisées récemment comme sources de cellules vasculaires autologues [92-94]. Ces cellules ont été différenciées *in vitro* en cellules musculaires lisses et en cellules endothéliales. Des matrices

artérielles décellularisées ensemencées avec ces cellules ont montré chez le chien une régénération des trois tuniques vasculaires après 2 mois d'implantation.

Les cellules souches hématopoïétiques : elles sont capables de se différencier en globules blancs, en globules rouges et en plaquettes. Ce type de cellules partage une origine embryonnaire commune avec les précurseurs des cellules endothéliales. De telles cellules souches, dites hémangioblastes, peuvent se différencier en cellules endothéliales comme en cellules sanguines. Elles semblent persister non seulement dans la moelle osseuse mais aussi dans le foie, en particulier chez le jeune enfant, voire chez l'adulte.

Les cellules précurseurs : Ces cellules, issues des divisions de cellules souches, ont déjà acquis lors de leur développement, un certain degré de spécialisation et sont physiologiquement fonctionnelles. Les progénitreurs endothéliaux ont été isolés et identifiés à partir du sang adulte périphérique par Asahara *et al*. en 1997 [95]. Depuis, leur potentiel de différenciation en cellules endothéliales a été démontré *ex vivo* et *in vivo*, ce qui en fait des candidats pour diverses applications thérapeutiques [96, 97].

L'injection de cellules progénitrices endothéliales (EPC) humaines directement dans le muscle permet l'amélioration de la circulation sanguine des membres ischémiés de souris [98]. De plus, Condorelli *et al*. [99] dans un travail encore controversé [100], ont constaté la capacité des EPC à se « trans-différencier » en cardiomyocytes. Zammaretti et Jaconi [101] quant à eux, estiment que l'injection de progéniteurs dans les greffons est inefficace, et plus de 90% des cellules injectées ne parviennent pas à s'intégrer et sont perdues.

Les progrès réalisés ces dernières années dans le domaine de l'expansion et la différenciation de cellules dérivées des cellules souches ont permis d'envisager l'utilisation des EPC dans l'ingénierie vasculaire. En effet, des études récentes ont montré qu'il était possible de reconstituer *in vitro* un néo-endothélium sur des substituts vasculaires synthétiques et biologiques [102-105]. Kaushal et ses collaborateurs [105] ont ensemencé des cellules endothéliales issues de la différenciation *in vitro* de progéniteurs circulants sur des matrices décellularisées d'artères iliaques de porc. Ces matrices endothélialisées ont été implantées en remplacement d'artères carotides. Ces auteurs ont observé une perméabilité totale à 130 jours après implantation et une contractilité identique à celle d'un vaisseau natif.

L'application thérapeutique des EPC est malheureusement limitée du fait de leur très faible nombre dans la circulation sanguine. Le pourcentage de ces cellules ainsi que celui des

cellules endothéliales circulantes varie de 0,01 à 0,0001% des cellules mononuclées périphériques [106]. De plus, la culture et l'expansion des EPC *in vitro* nécessitent à la fois une bonne adhésion cellulaire, et une supplémentation en facteurs de croissance comme le VEGF.

☞ **Croissance et rétention des cellules endothéliales**

La capacité qu'ont les cellules à croître et à se multiplier est un élément fondamental pour assurer le succès de l'endothélialisation des substituts vasculaires [42]. Le détachement des cellules fraîchement ensemencées se produit lorsque les substituts endothélialisés sont exposés au cisaillement induit par la circulation sanguine. Dans ce contexte, la croissance et la rétention cellulaire sur les substituts doivent être suffisantes pour assurer un recouvrement rapide et complet de la surface luminale car les espaces non recouverts représenteraient un risque accru de thrombose.

D'ailleurs le succès clinique d'une prothèse vasculaire endothélialisée est fortement tributaire de la qualité de l'adhérence des cellules à la surface du matériau, processus de base influençant directement la croissance, la différenciation et la migration des cellules.

Différents types de traitement permettant d'en améliorer l'adhésion ont été décrits dans la littérature [107, 108]. La plupart ont pour but d'augmenter les interactions entre la surface du substitut et les cellules endothéliales et par conséquent d'améliorer la rétention des cellules soumises aux contraintes mécaniques de l'écoulement sanguin. Trois types de traitement peuvent être effectués :

☞ **Le recouvrement chimique**.

Il consiste à recouvrir la surface luminale des substituts à l'aide des composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine, gélatine…).

- Le **collagène** (de type I, III ou IV) permet une augmentation trois fois plus importante de l'attachement cellulaire initial comparé à des surfaces non traitées (TCPS) [109, 110]. De plus, des travaux réalisés *in vitro* ont montré que le collagène IV stimule la croissance des CE [111-113], alors que le collagène V l'inhiberait [114].

- La **fibronectine** est la protéine la plus utilisée pour favoriser l'attachement et la rétention cellulaire [115-117]. Pour obtenir un attachement cellulaire optimum, la concentration de

fibronectine doit être comprise entre 20 - 50 µg/mL du milieu de reconstitution. Des études comparatives montrent que la présence de fibronectine sur du TCPS augmente davantage l'attachement cellulaire en comparaison à la présence de collagène, de gélatine ou de laminine [110].

La fibronectine est la seule protéine à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché pour des essais cliniques. Les investigations menées à la suite de ces essais ont cependant montré une forte hydrolyse de la fibronectine [118].

- La **laminine** est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire. Sank *et al.* [112] ont montré une augmentation trois fois plus importante de l'adhésion et la rétention cellulaire sur le PTFEe. Par contre l'attachement cellulaire sur des surfaces de TCPS recouvertes de laminine diminue significativement en comparaison à la fibronectine ou à la gélatine.

- La **gélatine :** ce traitement favorise l'attachement cellulaire. L'adhésion des CE sur du PTFEe recouvert de gélatine (10 mg/mL) est similaire à celle obtenue avec de la fibronectine (10 µg/mL) et est supérieure à celle obtenue avec de la laminine (10 µg/mL) [110].

- Le traitement à la **poly-lysine** n'a montré aucune amélioration de la rétention des CE. Par contre le traitement du PTFEe avec la poly-lysine améliore l'adhésion et l'étalement des CE issues du cordon ombilical humain. Cependant ces résultats restent inférieurs à ceux obtenus avec la gélatine ou la fibronectine [110, 119].

- Enfin le recouvrement chimique peut être réalisé avec la combinaison de plusieurs molécules de la **matrice extracellulaire :** glycoprotéines (collagène, laminine, fibronectine), des protéoglycanes (Héparane sulfate), l'élastine et des facteurs de croissance augmentent l'adhésion et la rétention des CE ensemencées sur du PTFEe en comparaison aux autres traitements (collagène seul, fibronectine seule, gélatine seule) [113, 120].

☞ **Pré- coagulation**

La pré-coagulation fait appel à un traitement avec du sang ou l'un de ses composants (plasma, sérum ou de la fibrine).

- La présence du **sang** favorise fortement l'adhésion des CE dans la lumière des substituts vasculaires [64, 116, 117].

Le traitement des substituts avec du sang permet un recouvrement complet, par les cellules endothéliales, de la surface luminale des prothèses avec cependant une dispersion de la fibrine à travers la surface. Thomson *et al.* [121] ont comparé l'effet du recouvrement du PTFEe avec du sang aux recouvrements chimiques (fibronectine, collagène IV et laminine). Les résultats montrent que l'effet de la précoagulation avec du sang, est semblable à la laminine, est légèrement inférieur à celui de la fibronectine et au collagène IV. Par ailleurs, ce traitement est difficile à maîtriser chez un patient sous héparinothérapie générale. Enfin, les manipulations réalisées au cours de la précoagulation augmentent l'incidence d'une contamination bactérienne [122].

- La plupart des études ont montré que le prétraitement avec **le plasma** peut augmenter l'adhésion des CE. Pu *et al.* [123] ont rapporté qu'après 7 jours d'incubation, le traitement du PTFEe avec le plasma améliore cinq fois l'attachement des cellules endothéliales.

- Le **sérum** est également utilisé pour favoriser l'attachement des CE sur des greffons vasculaires. Le taux d'adhésion reste cependant inférieur à la fibronectine ou au plasma [124-126].

- La **fibrine glue,** mélange de fibrinogène, thrombine exogène et chlorure de calcium, a été utilisée sur des prothèses en PTFEe [42]. L'adhésion et l'étalement des CE sont favorisés après un tel traitement [127, 128].

☞ **Greffage chimique**

Il consiste à greffer des séquences peptidiques (RGD) ou des facteurs de croissance sur la surface luminale des substituts vasculaires.

- La plupart des protéines de la matrice extracellulaire contiennent, parmi leurs séquences oligopeptidiques actives, une séquence tripeptidique « **Arg-Gly-Asp** » à laquelle sont attribuées des propriétés d'adhérence cellulaire. Ce tripeptide possède une forte affinité pour les récepteurs cellulaires de la superfamille des integrines, qui font partie des molécules d'adhésion cellulaire situées à la surface des cellules. L'utilisation des peptides adhésifs spécifiques, notamment le **YIGSR** (séquence adhésive de la laminine) et le **RGD** (séquence adhésive de la fibronectine), a permis d'augmenter l'adhésion des CE. Ils peuvent aussi influencer la migration cellulaire [129-131]. Une autre séquence peptidique **WQPPRARI,**

dérivée de la chaîne carboxy-terminale de la molécule de fibronectine et correspondant aux domaines de liaison de l'héparine, augmente également l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales [132].

Les **facteurs de croissance** peuvent également être utilisés pour augmenter la croissance et la prolifération des CE. Par exemple, le greffage du bFGF à une matrice de collagène assure une augmentation de la prolifération des CE. Cette augmentation dépend de la quantité de bFGF fixée [133]. Takahashi [134] a montré la possibilité d'adsorber directement le bFGF sur un substitut synthétique tel que le Dacron®. Cependant, l'adsorption de protéines ou de peptides est un phénomène difficile à contrôler notamment du point de vue de la quantité de matière adsorbée. Le contact cellulaire initial avec les surfaces protéiques est un phénomène très rapide : la plupart des cellules adhèrent 15 à 30 minutes après ensemencement. L'étalement et la prolifération cellulaire, quant à eux, est un processus plus long [135, 136].

III. 2. 3. CONDITIONNEMENT DES PROTHESES VASCULAIRES ISSUES DE L'INGENIERIE CELLULAIRE

Le pré-conditionnement des prothèses vasculaires est nécessaire pour la différenciation, la fonctionnalité et la rétention des cellules vasculaires (CE et/ou CML). L'ingénierie vasculaire a pour but de soumettre les substituts vasculaires à des contraintes mécaniques nécessaires à l'orientation des cellules vasculaires. Avant d'étudier ces contraintes, il apparaît utile de faire quelques rappels sur les propriétés hémodynamiques de la paroi artérielle.

Le flux pulsatile du sang dans les vaisseaux génère des forces biomécaniques qui modulent leur activité et leurs fonctions [58, 137]. Ces forces appelées forces hémodynamiques, sont représentées par l'étirement cyclique (T), la pression hydrostatique (P) et les contraintes de cisaillement (τ) (Figure 15) [138].

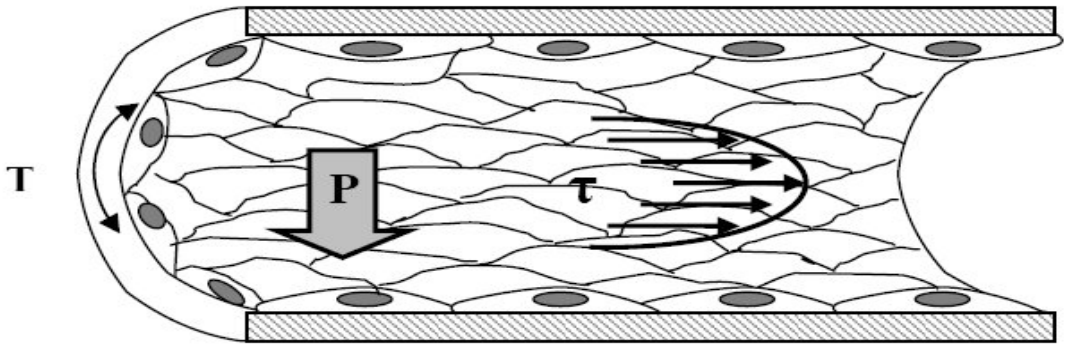


Figure 15 : ***Représentation des forces hémodynamiques exercées par le flux sanguin sur la paroi vasculaire.***

P : pression exercée par le sang, T : étirement cyclique, τ : contrainte de cisaillement due à l'écoulement sanguin.

L'étirement cyclique correspond à une distension de la paroi induite par un gradient de pression transmurale. La distensibilité du vaisseau dépend de son épaisseur, de sa composition et de son degré de contraction (engendré par les cellules musculaires lisses). Dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, ce type de contraintes est exercé pour obtenir la maturation de la média. En effet, l'étirement cyclique de cette dernière entraîne la différentiation des CML en augmentant le pouvoir contractile, la production de la matrice extracellulaire (essentiellement le collagène et l'élastine), ainsi que la densité des CML. D'après certains auteurs, ces contraintes engendrent une meilleure organisation des CML, notamment leur orientation et leur alignement circonférentiel et assure une meilleure résistance mécanique des substituts [44, 51, 52, 139].

Les contraintes de cisaillement correspondent aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elles sont déterminées par la relation :

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

Où, Q représente le flux sanguin, μ la viscosité dynamique du sang et r le rayon du vaisseau.

La valeur moyenne des contraintes de cisaillement dans une portion droite d'artère est comprise entre 1 et 2 Pa, mais il existe de fortes variations dans les régions avec embranchement [140].

Les contraintes de cisaillement peuvent être séparées en deux grandes familles (les fortes et les faibles) conduisant à des réponses biochimiques généralement différenciées.

- **Réorganisation cellulaire :** L'application de contraintes de même nature et réparties de façon homogène à la surface conduit systématiquement à une réorganisation des CE dans le sens de l'écoulement (*cf.* Figure 11). En effet, ces cellules perdent peu à peu leur morphologie polygonale pour acquérir une architecture alignée dans le sens de l'écoulement et finalement adopter une forme allongée, qui annonce le début de l'élongation. L'élongation est alors dépendante de la valeur de cisaillement imposée.

Selon Levesque *et al.* [141], la réorientation cellulaires a pour conséquence, une baisse locale de la résistance au fluide et par conséquent, un fléchissement des contraintes mécaniques excercées sur les CE.

- **Migration des cellules endothéliales :** Les CE ne sont que partiellement ancrées dans le lit vasculaire. L'effet de forces mécaniques sur ces cellules peut conduire à une légère migration qui est parfois nécessaire à la réparation tissulaire. Des travaux réalisés au laboratoire [142] ont décrit les effets du cisaillement sur des CE ensemencées sur des lames de verre recouvertes de gélatine. Ces travaux ont montré que, soumises à un cisaillement laminaire de 1 Pa, les cellules migrent lentement dans le sens de l'écoulement (7,3 µm/heures). Ces contraintes ont tendance à faciliter leur migration, en particulier dans le sens du flux. Les faibles contraintes (< 0,3 Pa) abaissent nettement les vitesses de migration tandis que les cisaillements d'environ 2 Pa conduisent à un allongement cellulaire couplé à une vitesse de migration plus importante.

- **La prolifération cellulaire :** Les mécanismes qui contrôlent la régulation de la prolifération des cellules endothéliales dépendent des contraintes de frottement du sang sur la paroi vasculaire. L'influence d'un cisaillement laminaire sur la prolifération de cellules endothéliales de bovins a été décrite par Levesque *et al.* [143]. Ces auteurs ont observé une

réduction de la prolifération CE matures pour des contraintes supérieures à 0,5 Pa et une inhibition de la prolifération pour des contraintes supérieures à 1,3 Pa.

Des travaux récents effectués sur les progéniteurs endothéliaux ont montré que des contraintes de cisaillement :

* < 0,25 Pa permettent la différenciation et la prolifération des EPC [144].

* > 0,5 Pa inhibent la prolifération des EPC et sous régulent l'expression des gènes associés à la prolifération cellulaire [145].

L'agrégation plaquettaire : L'agrégation des éléments constitutifs (plaquettes) du sang peut engendrer des amas de macromolécules (fibrine, thrombine, …) qui vont pouvoir, par la suite, adhérer à la paroi vasculaire et provoquer l'occlusion de la lumière du vaisseaux. Brown et Leverett en 1975 ont constaté que pour une contrainte de cisaillement de 0,5 Pa, les plaquettes contenues dans le sang libèrent de petites quantités d'adénosine di et triphosphates (ADP et ATP) responsables d'une agrégation macroscopique des plaquettes [146]. Pour des cisaillements très élevés, les plaquettes sont fractionnées et détruites.

L'adhésion leucocytaire : Les leucocytes peuvent adhérer aux CE grâce à des molécules spécifiques présentes à la surface des deux types de cellules. Les cellules endothéliales secrètent différents types de protéines dont le rôle est de permettre cette fixation. Il s'agit principalement de deux composés : *l'intercellular adhesion molecule-I* (ICAM-1) et les *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Ces molécules sont présentes en permanence à la surface du lit vasculaire mais en faible proportion sauf en cas d'agrégation préalable. Nagel *et al*. [147] ont montré que la présence de contraintes de cisaillement accélère la synthèse d'agents de fixation. Cependant, aucune valeur de la contrainte n'a été avancée.

Activité vasomotrice : Les activités vasomotrices des CE sont représentées par une activité dilatatrice grâce à la sécrétion d'agents dilatateurs (monoxyde d'azote) ou par une activité constrictrice grâce à la sécrétion d'agents constricteurs (endothéline-1 (ET-1)). Les études de Malek et Izumo ont permis de corréler les quantités de l'ET-1 avec le taux de contrainte appliquée [148]. Leurs travaux réalisés sur des cellules endothéliales de bovins ont permis d'observer une présence marquée de ET-1 pour de faibles cisaillements (0 à 0,5 Pa). La concentration de l'ET-1 décroit lorsque le taux du cisaillement augmente pour arriver au final à une saturation au delà de 1,5 Pa. Noris *et al.* [149] ont appliqué différents types de contraintes de cisaillement à des CE humaines provenant de la veine ombilicale en faisant

varier leurs des valeurs (0,2, 0,8, 1,2 Pa en cisaillement constant). Les résultats démontrent que la production du NO est totalement dépendante de la valeur de cisaillements à laquelle les cellules sont assujetties. En résumé, l'augmentation de contraintes de cisaillement conduit donc à une augmentation de la synthèse de NO, à une diminution de la synthèse d'ET-1, et inversement pour les faibles contraintes.

En conclusion, l'exposition de lumière des substituts vasculaires endothélialisées, à de fortes contraintes de cisaillement (préconditionnement de la prothèse), dans le but d'améliorer l'attachement et la rétention n'a pas permis d'atteindre les résultats escomptés. L'attachement et la rétention des cellules ne différent pas sensiblement de ceux cultivés de manière statique. De même qu'elle ne permet pas toujours l'obtention de monocouche confluente homogène [53, 150]. Pour améliorer l'adhésion et la rétention cellulaire, une nouvelle voie de recherche a été entreprise. Il s'agit de la formation de films multicouche de polyélectrolytes.

IV. FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES

Au début des années 1990, Decher *et al.* [151] ont développé une technique nouvelle de construction de films minces de polyélectrolytes hydrophiles, par dépôt de couches successives de chaînes de polyélectrolytes sur une surface chargée. Ces films résultent d'une adsorption alternée de polycations et de polyanions. Ces auto-assemblages sont appelés **films multicouches de polyélectrolytes**. La figure 16 représente les différentes étapes de la construction de telles multicouches, sur une lame de verre préalablement traitée pour présenter des charges négatives superficielles permettant l'initiation du processus. Les chaînes de polycations sont ensuite adsorbées à la surface de la lame de verre, puis on procède à l'adsorption du polyanion. La lame subit un lavage entre chaque dépôt.

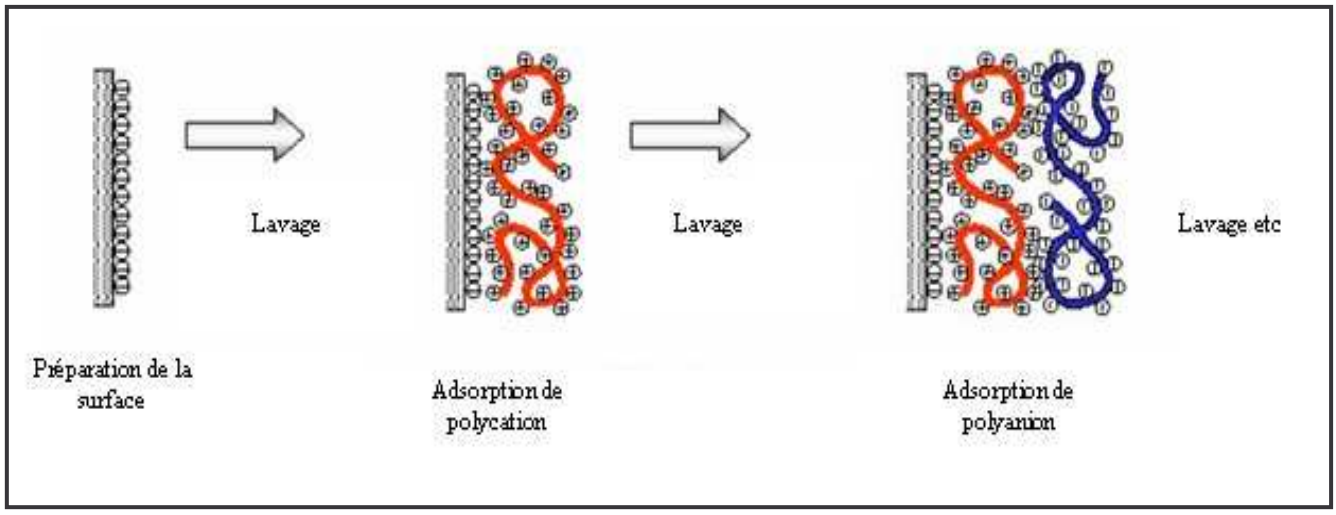


Figure 16 : ***Principe de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes*** [152].

De nombreux travaux décrivent en détail les différentes procédures de construction utilisées ainsi que les mécanismes de construction de tels films [153-157]. La force motrice de la construction résulte de l'excès de charges qui apparaît à la surface de la dernière couche lors de chaque étape d'adsorption entraînant l'inversion de la charge globale [156, 158]. La cohésion de l'ensemble de l'édifice est assurée par des attractions électrostatiques entre les polyélectrolytes de charges opposées mais d'autres forces telles que les interactions hydrophobes ou les liaisons hydrogènes peuvent intervenir dans les édifices et assurer également la cohésion [159].

Il est à noter que lors de la construction de films multicouches, l'épaisseur et par conséquent la masse augmente avec leur nombre de couches, mais cette croissance n'est pas toujours linéaire. La figure 17 présente deux cas de variation de l'épaisseur avec le nombre de

couches déposées. Ainsi avec la séquence PEI-(PSS-PAH)$_n$ la croissance est linéaire tandis qu'avec la séquence PEI-(PGA-PLL)$_n$ elle est exponentielle.

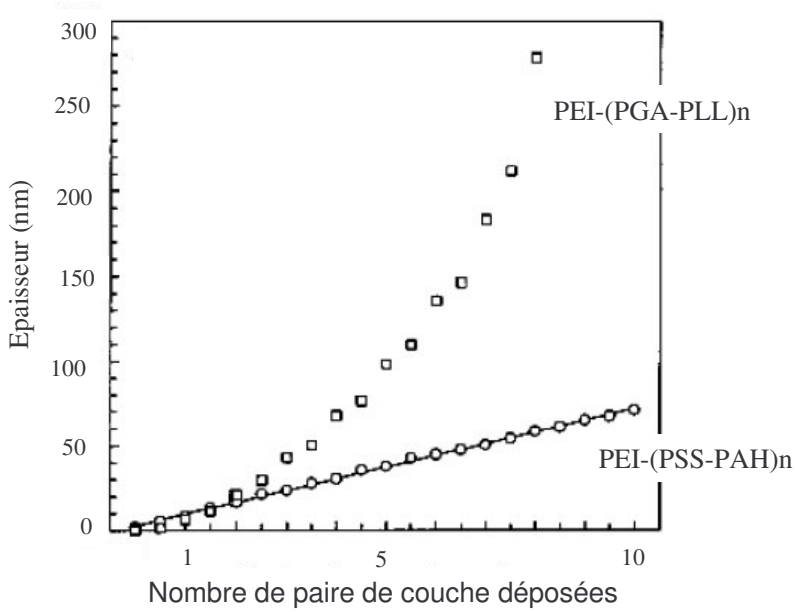


Figure 17 : ***Evolution de l'épaisseur des films PEI-(PSS-PAH)$_n$*** *(croissance linéaire)* ***et PEI-(PGA-PLL)$_n$*** *(croissance exponentielle)* ***en fonction du nombre de paires de couches déposées ;*** *PEI : polyélthylamine, PSS : poly (sodium-4-stryrène sulfonate), PAH : hydrochlorure de polyallyamine, PGA : acide-L- glutamique, PLL : poly (L-lysine)* [160].

IV. 1. FILMS A CROISSANCE LINEAIRE

Lors de chaque nouveau dépôt, le polyélectrolyte n'interagit essentiellement qu'avec le polyélectrolyte de charge opposée précédemment déposé au sommet de l'architecture du film en construction [152]. De telles conditions ne sont satisfaites que lorsque les polyélectrolytes ne pénètrent pas à l'intérieur du film, par exemple à faible teneur de sel lorsque les polyélectrolytes adoptent une structure étalée et/ou lorsque les interactions entre les chaînes sont fortes.

Les films à croissance linéaire présentent un degré de stratification assez important à cause de la faible interpénétration des différentes couches. Grâce aux multiples interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat et entre les couples de polyélectrolytes, les films possèdent une bonne homogénéité et stabilité ainsi qu'une forte adhésion au substrat. Le phénomène de surcompensation des charges lors de chaque étape du dépôt, a été démontré par des mesures de potentiels zêta (Figure 18) [158].

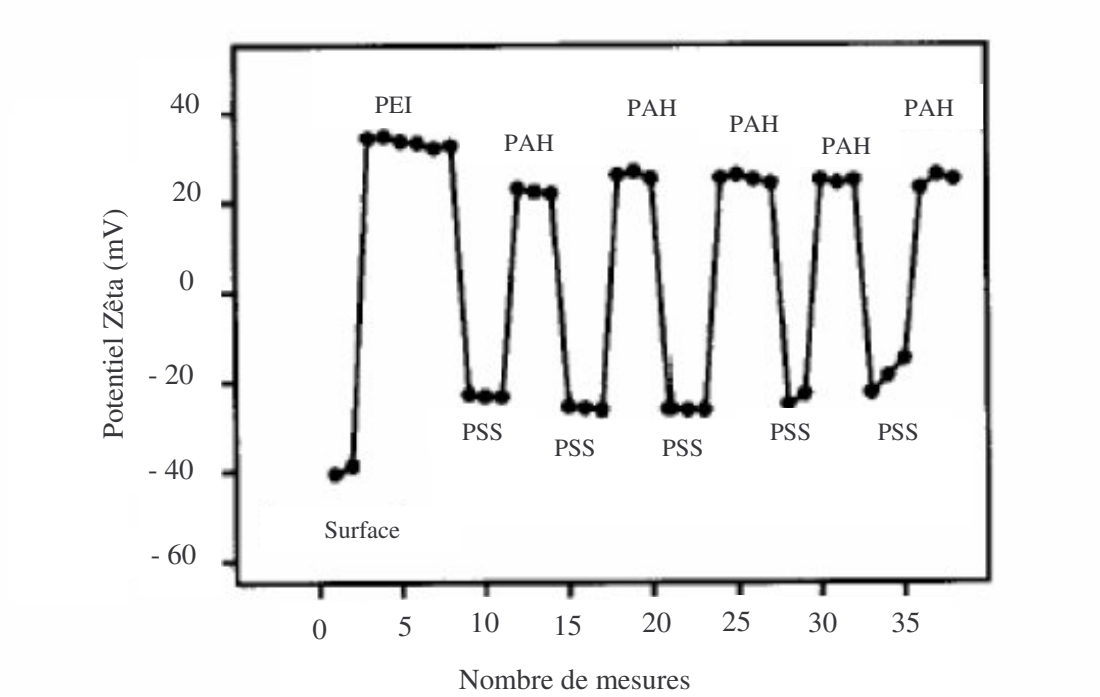


Figure 18 : ***Evolution du potentiel zêta obtenu en potentiel d'écoulement au cours de la construction d'un film multicouche PEI-(PSS-PAH)$_5$*** [158].

Les paramètres physicochimiques tels que le pH, la force ionique, la concentration, les ions présents…. influencent le dépôt. La variation de ces paramètres affecte aussi les propriétés des films (l'épaisseur, la densité, la rugosité, la structure).

L'épaisseur du dépôt peut varier de moins d'un nanomètre à quelques dizaines de nanomètres par une simple modification du pH de la solution de polyélectrolytes [161]. L'utilisation de polyélectrolytes faibles (polyacides ou polybases faibles) permet d'atteindre des films beaucoup plus épais après un nombre équivalent de cycles de dépôt. La formation d'une bicouche (dépôt consécutif d'un polyanion et d'un polycation faible) en présence d'une teneur élevée en sel peut alors conduire à une augmentation importante du dépôt par couche, notamment à cause de la structure globulaire adoptée par les polyélectrolytes. Ces films sont aussi généralement très hydratés [158].

La modification des conditions de salinité et de pH lors de la construction du film permet de faire varier sa rugosité (une forte variation de pH après la construction du film induit une morphologie microporeuse du film) [162].

IV. 2. FILMS A CROISSANCE EXPONENTIELLE

Comme le montre la figure 17, les films à croissance exponentielle atteignent des épaisseurs très importantes après le dépôt de quelques paires de couches seulement (supérieures à 1 μm pour une dizaine de paires de couches). La croissance du film par cycle dépend du pH et de la force ionique de la solution. Ces films s'obtiennent notamment en utilisant des polypeptides ou des polysaccharides.

Lors de la construction de tels films, deux phénomènes se produisent :

- l'adsorption du polyélectrolyte à la surface du matériau.
- la diffusion du polyélectrolyte dans le film.

Divers auteurs [160, 163] ont montré que le régime de croissance exponentielle est lié à la diffusion vers l'intérieur et vers l'extérieur du film, de l'un au moins des deux polyélectrolytes constituant la multicouche. Le mécanisme mis en jeu dans ce type de croissance est le suivant : lorsqu'une multicouche est mise au contact avec une solution de polyélectrolytes, ces derniers vont à la fois interagir avec l'excès de charge du polyélectrolyte déposé lors de l'étape précédente et s'adsorber mais vont également pouvoir diffuser à l'intérieur du film formant un réservoir de polyions libres. A la fin de la phase d'adsorption - diffusion dans le film, il se crée une barrière de potentiel à la surface du film. Lors de la phase de rinçage, seule une partie des polyions libres peut diffuser hors du film. Lorsque ce film est à nouveau mis en contact avec une solution contenant le polyélectrolyte chargé de signe opposé, celui-ci va interagir avec l'excès de charge en surface en faisant disparaître la barrière de potentiel. Les polyions libres restant dans le film peuvent alors diffuser vers l'interface film - solution où ils forment un complexe avec les polyélectrolytes de la solution et se fixer au sommet du film.

IV. 3. APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DES BIOMATERIAUX

L'étude des propriétés physicochimiques et la compréhension du comportement des films multicouches de polyélectrolytes sont susceptibles d'ouvrir de nombreuses perspectives d'application, notamment dans le domaine des biomatériaux. En effet, la grande variété de choix des polyélectrolytes permet l'élaboration de films dont les propriétés physicochimiques et les possibilités de fonctionnalisation sont multiples et modulables. Fonctionnaliser consiste à conférer au film une ou des propriété(s) spécifique(s) en le modifiant chimiquement ou

physiquement, par réticulation ou insertion de drogues, protéines, facteurs de croissance et d'acide nucléiques [164, 165].

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés par adsorption de protéines à la surface d'un film ou par insertion d'une ou plusieurs protéines (identiques ou différentes) à plusieurs niveaux de la construction. Ces protéines doivent cependant conserver une structure et une activité proches de celle de leur forme native afin de préserver leurs fonctionnalités biologiques. Une fois les protéines enfouies, les cellules déposées sur le film doivent pouvoir interagir avec elles. Des études d'adsorption de différentes protéines sur des films de type (PAH/PSS) ont montré que les quantités adsorbées sont plus importantes quand la charge globale de la protéine est opposée à celle de la multicouche [166].

Dans la perspective d'application biomédicale des films multicouches de polyélectrolytes, de nombreuses études ont porté ces dernières années sur le comportement de cellules adhérentes sur les films multicouches.

IV. 3. 1. ELABORATION DE SURFACES NON ADHERENTES

De nombreuses recherches ont été consacrées à l'utilisation du concept des multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des applications biomédicales. Une revue exhaustive sur ce point a été fait récemment par Tang *et al*. [167]. Pour ce qui concerne plus spécifiquement le domaine vasculaire, la mise au point d'une surface ou interface qui résiste à l'adhérence cellulaire présente souvent un objectif majeur dans l'élaboration de matériaux au contact du milieu sanguin. L'une des voies pour atteindre un tel objectif consiste à recouvrir la surface interne des vaisseaux endommagés par un film basée sur l'alternance par exemple Chitosan/ acide hyaluronique (CHI/HA). Ainsi, Thierry *et al.* [168, 169], *in vitro*, ont montré pour ce système et pour un film multicouche se terminant par une couche négative (HA) l'adhésion des plaquettes et des leucocytes (principaux responsables du thrombus) était stoppée.

IV. 3. 2. ELABORATION DE SURFACES ADHERENTES

A côté de la stratégie qui consiste à préparer des surfaces non adhérentes aux cellules comparable à celles utilisées par Thierry *et al*. [168, 169] une voie alternative pourrait consister à préparer une surface facilitant l'adhérence de cellules d'intérêt pour le vaisseau : les cellules endothéliales et de recouvrir le vaisseau par ces cellules avant implantation.

Basées sur une telle stratégie, des expériences réalisées antérieurement dans notre laboratoire, avaient permis de comparer l'adhésion et la rétention de cellules endothéliales sur deux types de films : l'hydrochlorure de polyallylamine / le poly (sodium-4-styrène sulfonate) et l'acide poly L-glutamique / la poly D-Lysine.

Par ailleurs ces deux types de films multicouches de polyélectrolytes avaient déjà été évalués avec d'autres types cellulaires (cellules de chondrosarcomes, d'ostéosarcomes, de ligament) et avaient notamment montré une amélioration de l'adhésion initiale [170, 171].

Les résultats obtenus par Boura *et al*. [172] ont montré que le film ~PSS-PAH favorisait l'adhésion et le développement des cellules endothéliales probablement grâce à des interactions non spécifiques fortes (Figure 19).

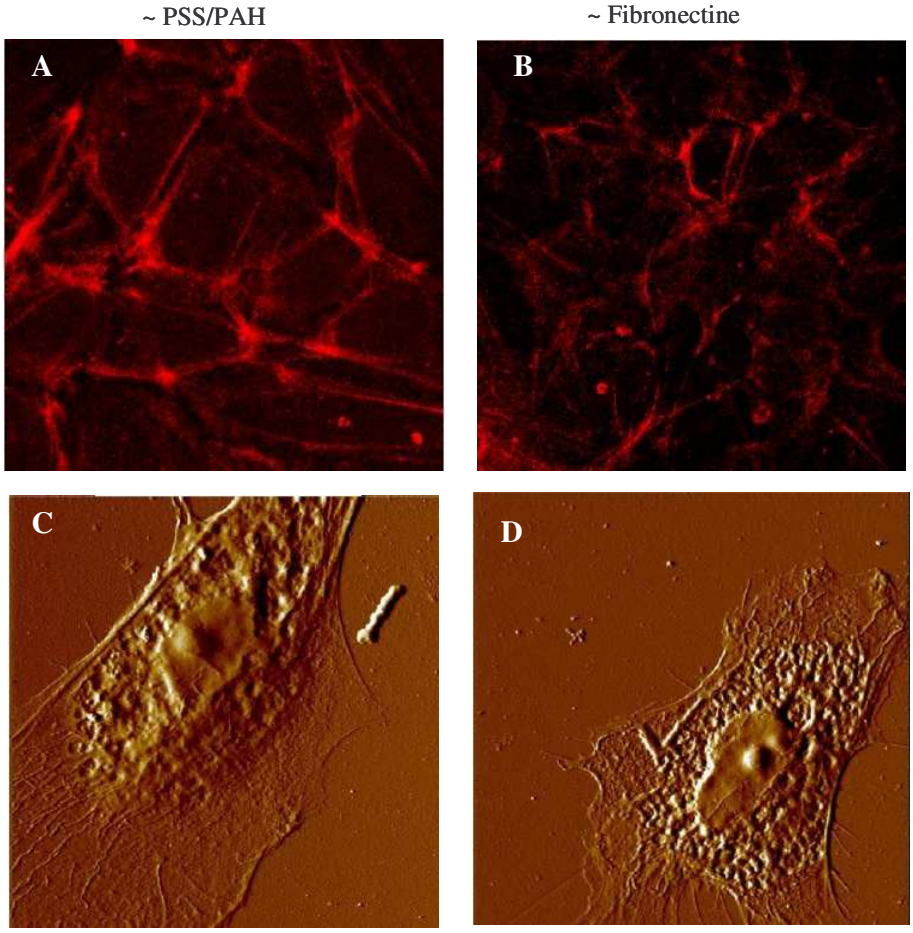


Figure 19 : ***Observation de l'étalement des cellules endothéliales par microscopie de fluorescence confocale*** *(A et B, cytosquelette en rouge)* ***et microscopie à force atomique en mode contact*** *(C, D). Les images montrent un meilleur étalement des cellules endothéliales sur le film multicouche de polyélectrolytes (A, C) que sur la fibronectine (B, D)* [173].

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'objectif de ce travail de thèse est d'élaborer une nouvelle matrice vasculaire dont la lumière est recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes et possédant des propriétés non thrombogéniques.

Dans un premier temps nous avons développé un protocole visant à valoriser une matrice à partir d'artères issues du cordon ombilical humain. Ces artères sont cryoconservées et désendothélialisées. L'évaluation de l'intégrité matricielle après ces traitements a été vérifiée par histologie et microscopie électronique à balayage.

Dans un second temps, nous avons construit un film multicouche dans la lumière de ces artères dont le recouvrement convenable a été vérifié par microscopie confocale à balayage laser et l'état de la matrice par histologie et microscopie électronique à balayage.

L'étude du comportement biomécanique et de l'élasticité de la paroi artérielle après traitement ont été abordés dans un troisième temps. Cette étude a été effectuée grâce à un banc d'essai développé au laboratoire.

Dans un quatrième temps, nous avons étudié l'adhésion et la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans les artères traitées respectivement avant et après cisaillement.

Enfin nous avons soumis les artères traitées par le film et non endothélialisées à une évaluation *in vivo.* Le suivi au cours du temps de nos greffons implanté sur le lapin a été effectué par une technique non invasive l'Echo-Doppler.

PARTIE II

MATERIEL ET METHODES

I. METHODES DE CULTURE CELLULAIRE ET DE PREPARATION DE LA MATRICE ARTERIELLE

La démarche adoptée consiste à récupérer les cellules endothéliales issues de la veine ombilicale ainsi que les artères du cordon. La lumière de ces artères est ensuite traitée, endothélialisée et soumise à une contrainte cisaillement.

I. 1. CULTURE CELLULAIRE

I. 1. 1. REACTIFS ET MILIEU DE CULTURE

- **Tampons sans Calcium ni Magnésium**

Deux types de tampons isotoniques sont utilisés dans la plupart des étapes de culture cellulaires (lavages, dilutions….). Leur composition est donnée dans le tableau 6.

Tableau 6: ***Composition des tampons sans Calcium ni magnésium***.

Tampon	Constituants	fournisseur
Hank's balanced salt solution **(HBSS)**	KCl 0,4 g/L, NaCl 8 g/L, KH_2PO_4 0,06 g/L, Na_2HPO_4 0,047 g/L, D-glucose 1 g/L, rouge de phénol 0,011 g/L, pH 7,2-7,4.	Poudre (Sigma, France)
Phosphate Buffer Saline **(PBS)**	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,4 mM., pH 7,2-7,4	Préparé au laboratoire

Remarques :

1. La poudre d'HBSS est dissoute dans un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,2 en ajoutant 0,35 g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$, Sigma, France).
2. Les tampons HBSS et PBS sont filtrés sur un filtre 0,22 µm (Millipore, France) puis conservés à 4°C.

➢ **Milieu de culture des cellules endothéliales**

Le milieu de culture pour cellules endothéliales issues de la veine ombilicale humaine (HUVEC) est préparé à partir d'un mélange de deux milieux : M199 et RPMI 1640 (v/v) supplémenté de 20% de sérum AB humain (provenant de l'Etablissement Français du Sang, Nancy) et décomplémenté à 56°C pendant 30 min, de 2 mM de glutamine, de 100 U/mL de pénicilline, de 100 µg/mL de streptomycine et de 2,5 µg/mL de Fungizone® (Gibco, France). Le pH du milieu est tamponné à pH 7,4 avec 20 mM d'HEPES (Sigma, France).

Lorsque le mélange RPMI 1640/M199 est supplémenté de ces additifs, il forme le milieu dit « complet ». La durée de conservation du milieu complet ne doit pas excéder 2 semaines.

➢ **Solutions de digestion**

- La solution (Solution 1) utilisée pour le détachement des cellules endothéliales des vaisseaux du cordon ombilical (artères ou veines) est un mélange trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, France), soit 2,5 g de trypsine porcine et 0,2 g de EDTA·tétrasodique dans 100 mL de tampon HBSS.

- La solution (Solution 2) utilisée pour le détachement des HUVEC des supports de culture est préparée en diluant la solution 1 (dilution au ½ dans du tampon HBSS).

Remarque : Les solutions digestives sont préparées et conservées à -20°C. Elles sont décongelées extemporanément.

I. 1. 2. DESCRIPTION ANATOMIQUE DES CORDONS OMBILICAUX HUMAINS

Le cordon ombilical présente deux artères et une veine, qui sont entourées d'une fine membrane et d'une masse gélatineuse dite gelée de Wharton (Figure 20).

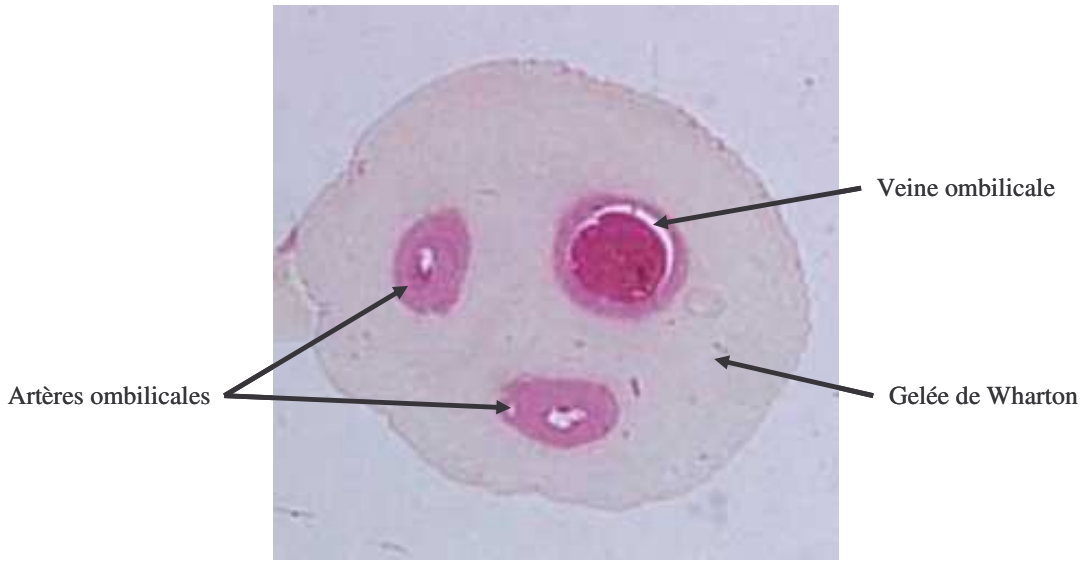


Figure 20 : ***Observation d'une coupe histologique d'un cordon ombilical humain.***

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doscel/decouv/ximg/cellSpe/circu/8094.htm.

- La « veine ombilicale » est une veine véhiculant du sang oxygéné du placenta vers le fœtus.
- Les « artères ombilicales » sont des artères véhiculant du sang appauvri en oxygène et chargé en gaz carbonique.
- La gelée de Wharton est un tissu conjonctif lâche qui possède deux caractéristiques essentielles :

1)- une faible activité cellulaire ; il s'agit d'un tissu n'ayant aucune vocation différenciatrice,

2)- une sécrétion intensive d'acide hyaluronique, rendant la matrice turgescente ce qui évite le collapsus du cordon ombilical.

Dans notre étude, les artères ombilicales servent de matrices vasculaires et les veines ombilicales fournissent les cellules pour endothélialiser ces matrices.

Les cordons ombilicaux utilisés, proviennent de la maternité régionale de Nancy. Ils sont prélevés chez des donneurs sains et recueillis dés l'expulsion placentaire après consentement maternel. Le cordon est alors coupé à une dimension de 20 à 25 cm et immédiatement mis dans un flacon de culture de 75 cm^2 contenant 150 mL du tampon HBSS stérile et placé rapidement à 4°C. Sa durée de conservation à cette température ne peut pas excéder 6heures.

I. 1. 3. CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES ISSUES DU CORDON OMBILICAL HUMAIN

La mise en culture des HUVEC est effectuée selon la méthode de Jaffe *et al*. [174] modifiée qui comporte trois étapes.

Pour recueillir les cordons, récolter les cellules endothéliales et isoler les artères ombilicales, tout le matériel utilisé doit être stérilisé à l'autoclave (130°C pendant 30 min).

- **Lavage de la veine ombilicale**

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

- **Détachement et mise en culture des cellules endothéliales**

La veine est remplie avec 15-20 mL de la solution de digestion (Solution 1) préchauffée à 37°C. Le cordon est immergé dans le tampon puis placé au bain-marie pendant 12 min à 37°C. Il est ensuite posé dans une boîte de pétri et massé doucement quelques secondes. La pince est alors retirée et la solution de digestion est recueillie dans un tube plastique de 50 mL contenant 1 mL de sérum humain (nécessaire pour arrêter l'action de la trypsine). La veine est lavée trois fois avec 10 mL de tampon HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 *g* pendant 10 min, à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot contenant les cellules est lavé dans 10 mL de tampon HBSS.

Après une deuxième centrifugation (300 *g* pendant 10 min), les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet. Le nombre de cellules varie selon la longueur du cordon. Les cellules sont ensemencées dans une boîte de culture de 25 cm^2 (Nunc®, Deutcher, France), puis placées dans un incubateur à 37°C (5% de CO_2).

Dès le lendemain, l'observation des cellules au microscope inversé à contraste de phase (Olympus, Japon) montre que la plupart des cellules ont adhéré au fond de la boîte.

Elles forment de nombreux îlots de cellules endothéliales. Le milieu contenant des érythrocytes est éliminé, et les cellules sont lavées deux fois dans la boîte avec du tampon HBSS. Elles sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu complet.

- **Passage en subculture**

Après une semaine, les cellules arrivent à confluence. Elles forment une mosaïque homogène « en pavé de chaussée » caractéristique des cellules endothéliales (Figure 21). Les cellules sont jointives, leur noyau est ovale et contient 2 ou 3 nucléoles. Leur croissance s'arrête par inhibition de contact.

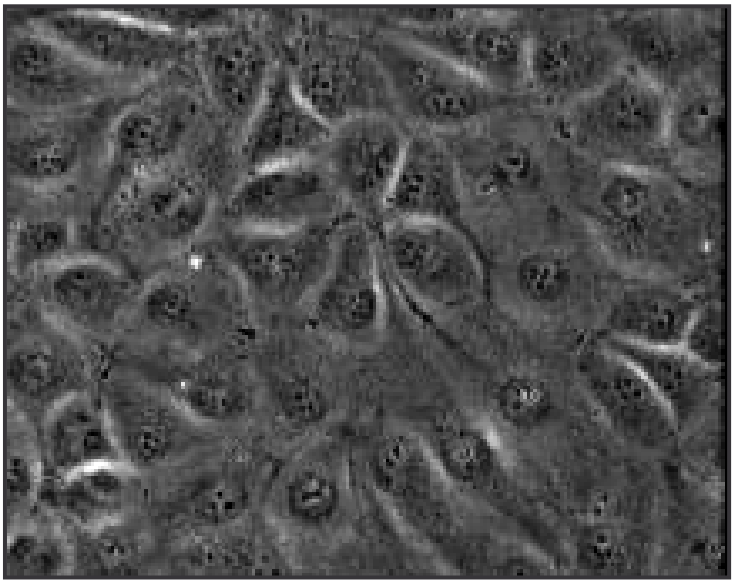


Figure 21 : ***Aspect des cellules endothéliales issues de la veine ombilicale à confluence.***

Images obtenues par microscope inversé à contraste de phase (Objectif × 20).

Une fois à confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec 5 mL de tampon HBSS. Ce lavage permet d'une part d'éliminer le sérum (qui inhiberait l'activité enzymatique de la trypsine) et d'autre part de libérer des ions Ca^{2+} qui faciliteront le détachement des cellules. Les cellules sont détachées à l'aide de 5 mL de solution de digestion (Solution 2). Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé à contraste de phase. L'action de la trypsine est stoppée par effet de protéines sériques en ajoutant 5 mL de milieu complet. La suspension cellulaire est recueillie dans un tube de 50 mL, puis centrifugée à 300 *g*. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 mL milieu complet. Cette suspension cellulaire

servira à ensemencer les boîtes de culture (environ 1×10^5 cellules par boîte) pour l'entretien de la culture (premier passage).

I. 2. PREPARATION DE LA MATRICE ARTERIELLE

I. 2. 1. MILIEUX DE CONSERVATION

- **Milieu de cryoconservation**

Les artères sont congelées à basse température (-180°C) dans un milieu de cryoconservation est constitué de 70% de milieu complet supplémenté de 20% de sérum AB humain décomplémenté et de 10% de Diméthylsulfoxide (DMSO) (Sigma, France).

- **Solution de décontamination**

Après chaque traitement, les artères sont conservées à 4°C dans une solution de décontamination. Cette dernière est constituée de milieu RPMI 1640 supplémenté de 100 UI/mL pénicilline, de 100 µg/mL streptomycine et de 2,5 µg/mL Fungizone®. Elle est filtrée et conservée à 4°C.

I. 2. 2. ISOLEMENT ET CONGELATION DES ARTERES OMBILICALES HUMAINES

Après récupération des HUVEC, le cordon ombilical humain est placé dans une boîte de pétri stérile. A l'aide de ciseaux introduit dans la veine, le cordon ombilical est coupé longitudinalement afin d'éliminer la gelée de Wharton et d'isoler les deux artères. Ces artères d'au moins 7 cm de longueur (Figure 22), sont immédiatement plongées dans du tampon HBSS pour y être rincée. Chaque artère ombilicale est ensuite placée dans un cryotube stérile (Nalgene®, France) contenant 1 mL de milieu de cryocongélation. Les cryotubes sont conservés une nuit à - 80°C, puis plongés dans de l'azote liquide pendant au moins six mois, correspondant au temps nécessaire pour effectuer les tests sérologiques réglementaires avant l'utilisation des allogreffes.

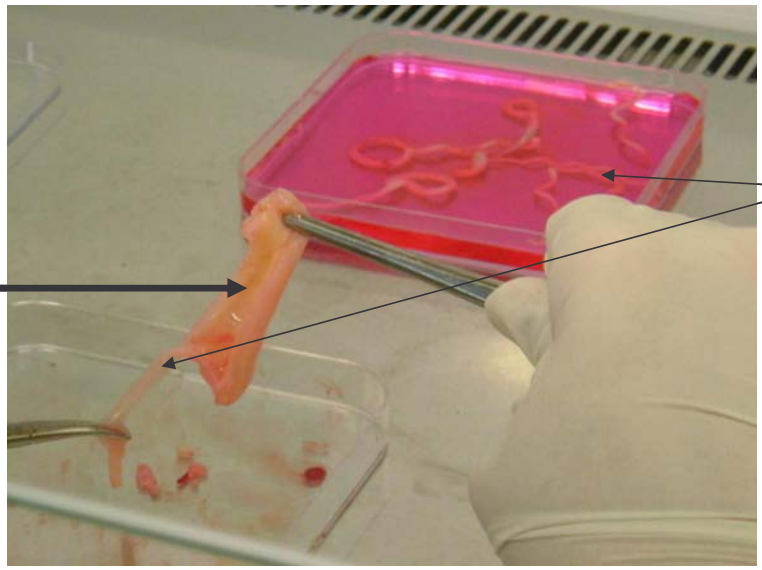


Figure 22 : ***Isolement des artères ombilicales humaines.***

I. 2. 3. DECONGELATION ET DEENDOTHELIALISATION DES ARTERES OMBILICALES HUMAINES

Les artères ombilicales sont décongelées au bain-marie à 37°C. Elles sont ensuite lavées deux fois avec la solution de décontamination. Cette étape est nécessaire pour éliminer toute trace de DMSO (car il devient toxique vis-à-vis des cellules à 37°C).

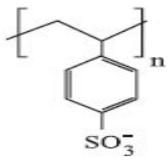
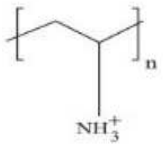
La lumière de l'artère est lavée trois fois avec 3 mL du tampon HBSS. Elle est ensuite désendothélialisée par une action enzymatique à la trypsine (Solution 1). Après 15 min d'incubation, l'action de la trypsine est inhibée avec de 2 mL de milieu complet. La désendothélialisation est complète après plusieurs injections de tampon HBSS. La lumière de l'artère est alors prête à être recouverte par un multicouche de polyélectrolytes.

I. 2. 4. MODIFICATION DE LA LUMIERE DE L'ARTERE PAR UN FILM MULTICOUCHE DE POLYELECTROLYTES

- **Solutions de polyélectrolytes**

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

Tableau 7 : ***caractéristiques des polyélectrolytes.***

Polyélectrolyte	Formule chimique	Poids (kDa)	Fournisseur
Poly (sodium-4-styrène sulfonate) : PSS		70	Sigma Aldrich, France
Hydrochlorure de Polyallylamine : PAH		70	Sigma Aldrich, France

Remarques : Avant leur utilisation, les solutions sont filtrées à travers un filtre 0,22 µm et sont conservées à 4°C.

- **Dépôt des films dans la lumière des artères**

Les films multicouche de polyélectrolytes (MPE) sont déposés à température ambiante dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées préalablement désendothélialisées. Après deux lavages au tampon Tris/NaCl à température ambiante, la solution de polycations (PAH) constituant la première couche, est injectée dans la lumière de l'artère et est mise à incuber pendant 15 min à température ambiante. Cette étape est suivie par trois lavages de trois minutes chacun, au tampon Tris/NaCl et à température ambiante. Les solutions de PSS et de PAH constitutives des deuxième et troisièmes couches, sont alternativement injectées et adsorbées pendant 15 min. On obtient ainsi les trois premières couches. Entre chaque dépôt, trois lavages de trois minutes chacun, au tampon Tris/NaCl sont effectués. L'opération est répétée jusqu'à obtention du nombre de couche désiré.

Les films finissants par une couche de PSS, portant une charge superficielle négative seront utilisés pour des études *in vivo*, tandis que ceux finissants par une couche de PAH, portant une charge positive seront utilisés pour des tests *in vitro*. Les film que nous avons construit comportent trois bicouches PAH/PSS ($(PAH\text{-}PSS)_3$) ou trois bicouches PAH/PSS et une couche de PAH ($(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH).

Les artères cryoconservées, désendothélialisées, et soumises uniquement aux opérations de lavages sont considérées comme témoins.

Les artères traitées par les films multicouches de polyélectrolytes et les artères témoins sont conservées et décontaminées toute une nuit à 4°C dans la solution de décontamination avant utilisation.

Remarques : La même procédure a été utilisée dans le cas des artères carotides de lapins pour les expérimentations *in vivo*.

I. 3. ENSEMENCEMENT DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS LA LUMIERE DES MATRICES ARTERIELLES

Les cellules sont récupérées au second passage (comme précédemment décrit : Passage en subculture) et sont comptées sur une cellule de Thoma. La viabilité des cellules est estimée selon le test d'exclusion au bleu Trypan. Le nombre de cellules récoltées est d'environ 1×10^6 cellules par boîte de 25 cm^2. La viabilité est supérieure à 90%.

La densité cellulaire est ajustée à 1×10^5 cellules/cm^2. Elle est ensuite injectée dans les différentes matrices (artères recouvertes par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH et les artères témoins). Afin de permettre une meilleure répartition des cellules, les substituts endothélialisés sont placés dans des tubes de 50 mL stériles sous légère agitation à l'aide d'un agitateur à balancement générant des mouvements de bascule lents (APELEX, France) pendant 4 heures.

Chaque artère réendothélialisée est plongée dans un flacon de culture puis placée dans un incubateur à 37°C (5% de CO_2 et 95% d'air) et cultivées pendant une semaine.

I. 4. STIMULATION MECANIQUE : CONTRAINTES DE CISAILLEMENT

Afin d'évaluer la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères (traitées et contrôles), nous les avons exposées à un flux laminaire, permettant de générer des contraintes de cisaillement de 1 Pa (10 dynes/cm^2). Ces contraintes correspondent à celles appliquées par le sang à proximité des sites d'anastomose lors des pontages fémoropoplité [175].

La simulation est réalisée dans une chambre d'écoulement développée au laboratoire, représentée sur la figure 23. La durée d'exposition est d'une heure.

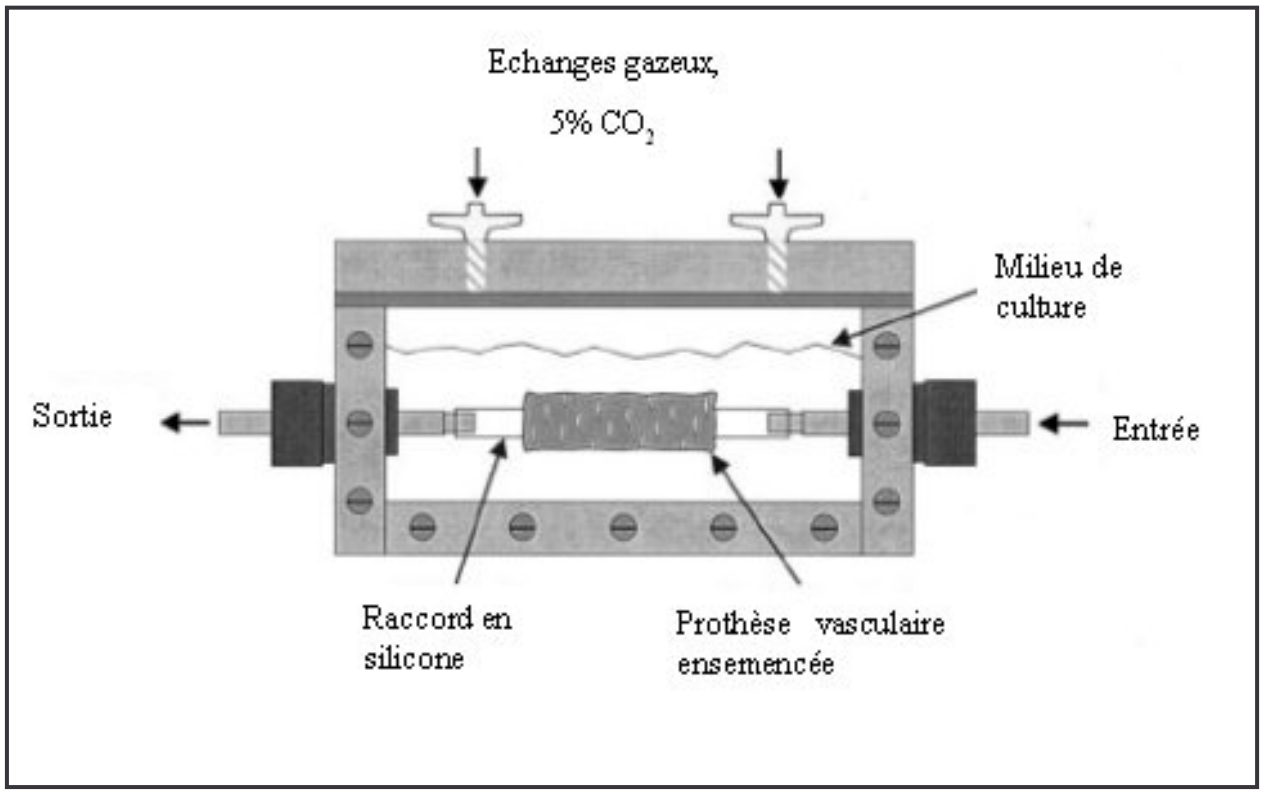


Figure 23 : ***Chambre de cisaillement utilisée au cours de notre étude***.

Cette chambre, en acier inox fabriquée au laboratoire, est incorporée dans un circuit fermé comportant :

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

L'ensemble est placé dans une enceinte thermostatée régulée à 37°C.

Les contraintes de cisaillement sont calculées par l'équation citée précédemment (paragraphe contrainte de cisaillement page 39) :

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

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

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

II. METHODES DE CARACTERISATION ET D'INVESTIGATION

II. 1. EVALUATION MECANIQUE DE LA MATRICE ARTERIELLE

Elle concerne la déformation et l'élasticité de la paroi artérielle. Elle est effectuée à la suite des tests mécaniques sont effectués à l'aide d'un banc d'essai développé au laboratoire [18] (Figure 24).

Ce banc est composé de différents éléments:

- une chambre en pléxiglace dans laquelle est fixé le substitut à étudier
- un capteur de pression (XTC-190M-0.35 BARVG, Kulite, Inc) : ce dernier fournit la valeur de la pression exercée sur les parois internes de l'artère.
- Une pompe (EX303C-50, Prodera, France).
- Une caméra CCD (FZS 1024, Sensopart, UK) : composée d'une ligne de 1024 pixels permettant de mesurer la déformation de l'artère.
- Une source de lumière (néon) : sert de source de lumière étalon.
- Une carte électronique (Adlink. USBDAQ-9100MS, TW) : ce boitier éléctronique permet de piloter la maquette et de relever les tensions provenant des différents capteurs. Il permet de faire l'interface entre le banc d'essai et l'ordinateur.
- Un capteur de force présent sur la potence (Doerler Mesures, France) :c'est une simple jauge de contrainte.
- Un capteur de température (PT-1000).

Chaque extrémité de l'artère (traitée et témoin) est montée sur des embouts en plastique (Bioblock, France). L'artère est fixée dans la chambre en plexiglas remplie d'eau physiologique préchauffée à 37°C (Figure 25). L'artère doit absolument être maintenue bien tendue. Elle est remplie d'eau physiologique par sa partie inférieure à l'aide d'une seringue et en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air. L'extrémité supérieure est obturée. Des injections d'eau physiologique par l'extrémité inférieure sont assurées par la pompe permettent de mettre l'artère sous pression. Les déformations sont enregistrées et analysées par le biais de la caméra CCD et de l'ordinateur pilotant l'ensemble.

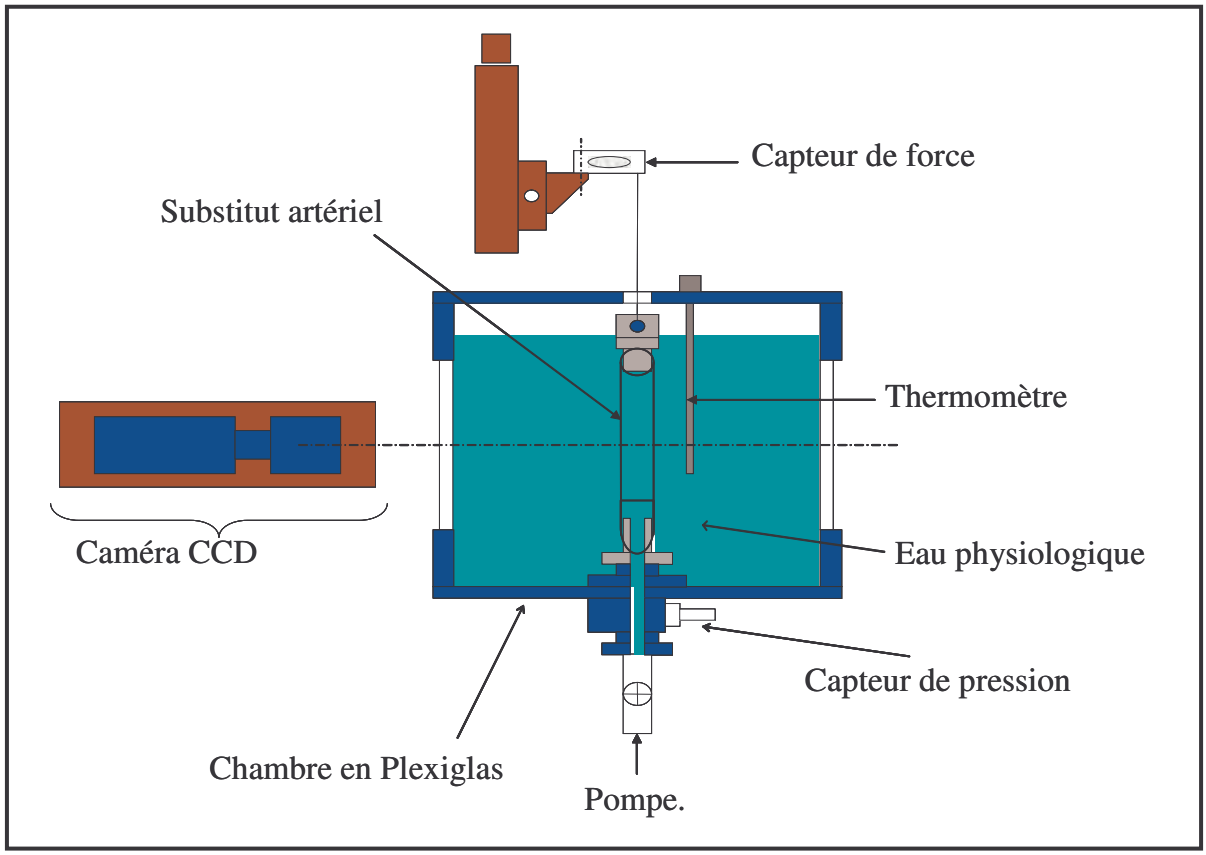


Figure 24 : ***Représentation schématique du banc d'essai mécanique*** [18].

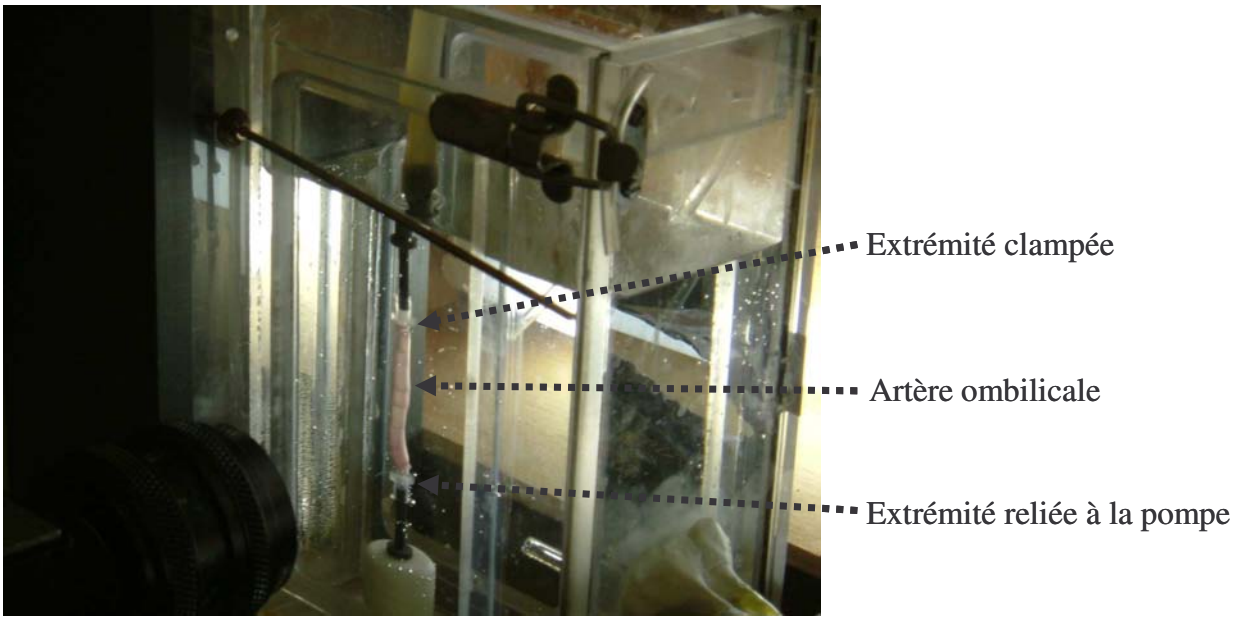


Figure 25 *: Artère montée dans la cuve en plexiglas.*

L'augmentation de la pression dans l'artère est effectuée par paliers constants toutes les 15 secondes jusqu'à la pression de 230 mmHg, avec un incrément de 30 mmHg.

Le pourcentage de déformation est calculé selon l'équation :

$$\Delta D=100 \times (D_p - D_0)/D_0$$

Où D_p représente le diamètre externe correspondant à la pression P et D_0 le diamètre externe au repos.

La partie linéaire de la courbe représentant la pression en fonction du pourcentage de déformation, correspondant à la gamme de pressions physiologiques (80-150 mmHg) est une droite dont la pente représente la compliance de la paroi artérielle.

II. 2. CARACTERISATION HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE

II. 2. 1. HISTOLOGIE

Réactifs

- Fixateur : Formol 10% (v/v, dans du tampon phosphate pH 7,4) (LaboNord, France).
- Alcools : Ethanol 95°, 100° (Prolabo, France).
- Toluène (Prolabo, France).
- Paraffine (Sherwood medical, USA).
- Lames poly-lysine (LaboNord, France).
- Milieu aqueux de montage : Solution aqueuse glycérinée à 2% (p/v dans l'eau distillée).

➢ **Fixation**

Des anneaux d'artères (1 cm de longueur) sont rincés dans du RPMI 1640 sans rouge de phénol ou dans une solution de NaCl 0,9% (lors des prélèvements chez l'animal). Ils sont ensuite placés 48 heures dans du formol à 10%.

➢ **Déshydratation et inclusion en paraffine**

Après fixation, les artères sont placées dans des cassettes d'inclusion (LaboNord, France), puis dans un automate (Tissue Tek® VIP 2000 Bayer). Les échantillons subissent différents bains d'alcools de concentration croissante, de manière à les déshydrater progressivement.

- Trois bains d'éthanol 95%, pendant au minimum deux heures.
- Trois bains d'éthanol 100%, pendant 30, puis 45 minutes et enfin une heure et trente secondes.
- Trois bains dans du Toluène pendant 45 min, puis trois heures et enfin une nuit en vue d'éliminer l'excès d'alcool et de préparer le tissu à une inclusion dans la paraffine.

Les pièces déshydratées sont plongées dans trois bains de paraffine liquide à 56°C : deux bains de quatre heures et un de 24 heures. Elles sont incluses en blocs avec de la paraffine à l'aide des barres de Leuckart sur une station d'enrobage. Ces blocs sont conservés à 4°C jusqu'à leur coupe.

➢ **Coupes et étalement**

Des coupes de 5 µm d'épaisseurs sont réalisées à l'aide d'un microtome à rasoir (LEICA RM 2145, France). Elles sont étalées et collées sur une lame au moyen d'une solution aqueuse glycérinée à 2%. Cette étape doit ce faire sur une plaque chauffée à 40°C.

➢ **Colorations histologiques**

o Les coupes sont colorées selon la méthode à l'hématoxyline de Harris, éosine et safran. Cette coloration permet de visualiser les noyaux en bleu-violet, le cytoplasme en rouge-rose, les fibres de collagène et les fibres conjonctives en jaune safran.

o Les fibres élastiques sont colorées selon la méthode de Weigert : solution de résorcine et de fuschine précipitée par le perchlorure de fer. Après coloration les fibres élastiques apparaissent bleu noir, les noyaux brun et le collagène rouge.

o La coloration de la calcification de la paroi vasculaire est mise en évidence avec réaction de von Kossa. Cette réaction transforme des sels de calcium en sels d'argent par coloration en noire des phosphates et carbonates de Calcium présents dans les tissus.

Réactifs

- Alcool éthylique ammoniacal à 0,1%, préparé avec de l'alcool éthylique 96% et de Ammoniaque 20% minimum (Prolabo, France).
- Hématoxyline de Harris (Réactifs RAL, France).
- Eosine (Fisher Scientific, France).
- Eosine (Fisher Scientific, France).
- Safran du Gâtinais à 1,5% (Réactifs RAL, France).
- Fuschine basique (Réactifs RAL, France).
- Perchlorure de fer (Prolabo, France).
- Résorcine (Prolabo, France).
- Acide picrique (Sigma, France).
- Acide Chloridrique (Prolabo, France).
- Nitrate d'argent (Prolabo, France).
- Hyposulfite de sodium (Prolabo, France).
- Révélateur photo (Sigma, France).
- Résine de montage : d'Eukit (Poly Labo, France).

➢ **Déparaffinage**

L'élimination de la paraffine est nécessaire avant toute coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains (de 6 minutes) d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100% (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70% (compatible avec l'eau), avant un bain d'eau osmosée assurant la réhydratation finale.

➢ **Coloration à l'Hématoxyline-éosine-safran**

Les coupes sont immergées une minute dans l'Hématoxyline de Harris, puis lavées deux à trois minutes à l'eau courante. Dans le but de bleuir les noyaux, les coupes sont plongées cinq à six fois dans un bain d'alcool éthylique ammoniacal à 0,1%, puis rincées trois minutes à l'eau courante. Elles sont ensuite immergées dans de l'Eosine une à deux minutes, puis lavées à l'eau courante 1 minute. Avant de colorer les coupes avec du safran (colorant

dissous dans de l'alcool absolu), il est nécessaire de déshydrater totalement les coupes par immersion d'une minute dans l'éthanol à 96%, puis dans l'alcool absolu ; les tissus sont ensuite colorés en les immergeant durant une minute dans le safran du Gâtinais à 1,5%. L'excès est éliminé par de nouvelles immersions dans l'alcool absolu.

- **Coloration selon la méthode de Weighert**

La solution de Weighert est préparée à partir de fuschine basique (10g) et de résorcine (20g) dans 1 L d'eau distillée bouillante. Le colorant est ensuite précipité avec 150 mL d'une solution de perchlorure de fer à 30% à 100°C sous agitation. Après filtration, le filtrat est éliminé et le contenu du filtre (boue noirâtre) est redissous dans 1 L d'éthanol 95° et 20 mL d'acide chlorhydrique puis re-filtrer à nouveau.

Les coupes sont immergées pendant 1h dans la solution de Weigert. Elles sont ensuite lavées trois minutes à l'eau courante, incubées quelques secondes avec de l'acide chlorhydrique, lavées avec de l'eau distillée puis déshydratées (alcool 70°, 95°, 100° et toluène).

- **Réaction de von Kossa**

Les coupes sont mises à incuber avec du nitrate d'argent à 5% pendant 30 min à l'abri de la lumière puis lavées soigneusement avec de l'eau distillée. Elles sont ensuite mises au contact avec le révélateur photo pendant 5 min, lavées avec de l'eau distillée puis mises au contact de l'hyposulfite de sodium pendant 5 min. Après un rinçage avec de l'eau distillée les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol à 96%, puis d'alcool absolu.

- **Montage et observation des lames**

Une goutte de résine de montage (Eukit) est déposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. La résine polymérise en une vingtaine de minutes à température ambiante. Les lames colorées sont observées au microscope inversé (Olympus IX 50, Japon). La capture des images se fait par une caméra (Color Video Camera Sony Corporation, Japon) reliée à un ordinateur et à un logiciel d'acquisition (Kappa Image Base Control, Bio-Teck Instruments, USA).

II. 2. 2. IMMUNOHISTOCHIMIE

Réactif

- PBS-Tween (Tris-HCl 0,05 M pH 7,6, NaCl 0,15 M) (Sigma, France).
- Tampon citrate 10 mM pH 6,0 (Sigma, France).
- Tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8,2 (Sigma, France).
- Solution d'Eukitt (Poly Labo, France).
- DakoPen® (Dakocytomation, France).

Anticorps

Les techniques immunohistochimiques permettent de localiser des antigènes dans des tissus, cellules etc. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer ; des traceurs (enzymes) fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de voir la réaction.

Les anticorps dirigés contre les antigènes recherchés (PECAM-1, α actine et collagène IV), sont dilués dans un tampon phosphate (PBS; pH 7,4 à 7,6 additionné de N-éthyl-maléimide (0,4 mM), d'albumine bovine (1% p/v), azide de sodium (1,4 mM), glycérol (244,3 mM) ;

Un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-souris conjugué à la biotine (Dakocytomation, France) a été utilisé pour la révélation. La biotine, vitamine hydrosoluble, se lie à streptavidine (protéine bactérienne) par une liaison de haute affinité et de grande spécificité et le système biotine-avidine est à son tour marqué et révélé par une enzyme : Peroxydase NovaRed™ (Vector Laboratories, USA).

- **Déparaffinage et démasquage des sites antigéniques**

Les coupes sont déparaffinées dans le toluène, l'éthanol de titre décroissant puis réhydratées dans l'eau osmosée. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé par une hydrolyse à la vapeur sous pression (Proteogenix, Retriver, France) de 5 min à 120°C dans du tampon citrate 10 mM, pH 6,0. Après refroidissement, les lames sont lavées pendant 5 min avec de l'eau osmosée, puis plongées 10 min dans du PBS-Tween.

- **Marquage et révélation**

La solution d'anticorps primaire (dilué au 1/500e) est déposée sur les coupes et incubée une nuit à 4°C. Après rinçage dans du PBS-Tween, la solution d'anticorps secondaire biotinylés (dilué au 1/200e) est déposée sur les coupes puis incubée une heure à température ambiante. Après rinçage dans du PBS-Tween, les peroxydases endogènes sont inhibées en déposant sur les lames de l'eau oxygénée à 6% (20 volumes) pendant 15 min. Après rinçage dans du PBS-Tween, la streptavidine marquée à la peroxydase diluée extemporanément au 1/200e dans du PBS-Tween est déposée sur les coupes qui sont incubés 50 min à température ambiante. L'activité peroxydasique est révélée par le NovaRED™ par incubation 5 min à l'abri de la lumière à température ambiante.

Les lames sont montées avec de la résine (Eukit) puis observées au microscope optique.

Remarque : Concernant le marquage du collagène IV, avant l'incubation avec l'anticorps primaire (anti-collagène IV), les coupes sont mises au contact avec de la collagènase pendant 15 min.

II. 3. CARACTERISATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Dans notre étude, la microscopie électronique à balayage est utilisée afin de visualiser la topologie de la surface interne des substituts vasculaires.

II. 3. 1. DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE

La microscopie électronique à balayage (MEB) produit une image d'apparence tridimensionnelle provenant de l'action d'un faisceau d'électrons balayant par lignes successives la surface de l'échantillon. Sous l'impact du faisceau des électrons incidents, les électrons secondaires de faible énergie, émis par la surface de l'échantillon sont recueillis sélectivement par un détecteur qui transmet le signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage du faisceau incident. Ces informations sont reproduites dans les mêmes positions relatives sur l'écran vidéo pour reconstruire la topographie de la surface de l'échantillon, point par point, avec une résolution de l'ordre de 3 à 5 nm (Figure 26).

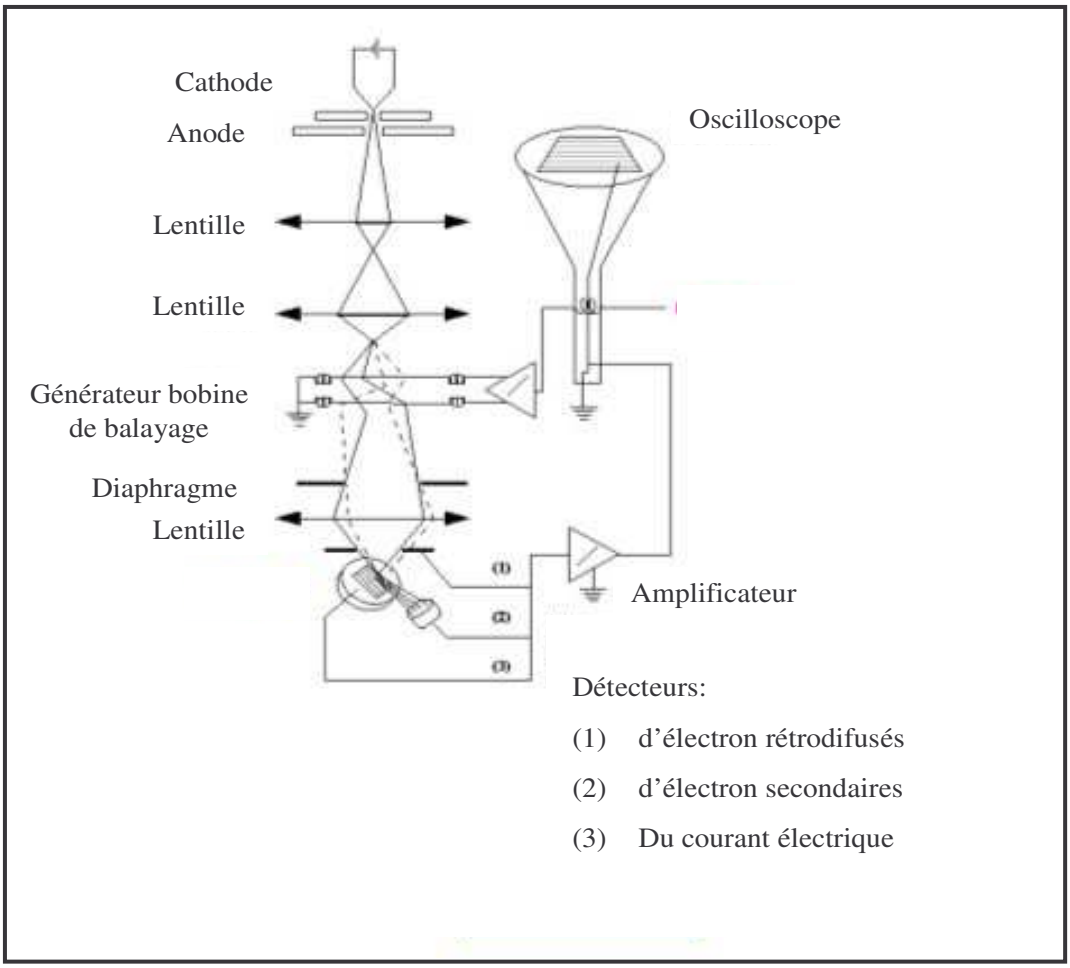


Figure 26 : ***Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage.***

www.linternaute.com/.../2.jpg.

II. 3. 2. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Réactifs

- Tampon cacodylate de sodium 0,1 M (Sigma, France).
- Fixateur (Sigma, France) : Glutaraldéhyde 2,5% (v/v dans tampon cacodylate de sodium 0,1 M) pH 7,2.
- Ethanol (Sigma, France) : 30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 100°.
- Héxaméthyldisilazane $(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3$ (HMDS, Electron Microscopy Sciences. USA).
- Métallisation : Or Palladium (Spotter Coater SC7640, USA).

Protocole

Les anneaux d'artères endothélialisées (1 cm) sont lavés deux fois avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol pendant 2 min. Les anneaux sont ensuite fixés à 4°C avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5% toute une nuit. Après deux rinçages avec le tampon de cacodylate de sodium 0,1 M, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs de 5 min dans une série de concentration croissante d'éthanol (30° à 100°). Les anneaux d'artères sont ensuite traités 10 min dans un bain de HMDS et séchés sous hotte aspirante. Ils sont enfin fixés sur un support aluminium avec une colle au carbone et métallisées à l'or/palladium.

Les échantillons sont observés au Microscope Electronique à Balayage (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 80 kV.

II. 4. CARACTERISATION PAR MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER

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

II. 4. 1. DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE

Un microscope SP2 Leica dépourvu de filtres dichroïques, d'excitation et d'émission est utilisé afin d'améliorer le taux de transmission du signal d'émission de fluorescence. Cette amélioration passe d'une part par l'utilisation d'un cristal (AOBS) au niveau de l'excitation du laser et d'autres part, par l'utilisation d'un prisme permettant de décomposer et de sélectionner la longueur d'onde d'émission. Pour constituer l'image, un balayage point par point à l'aide d'une irradiation de type laser, est assuré par 2 galvanomètres dans les 2 directions (X et Y, Figure 27). La fréquence de balayage doit permettre d'acquérir le signal de fluorescence le plus rapidement possible. Un déplacement selon l'axe optique (Z) permet l'acquisition de coupes sériées. Des diaphragmes, situés dans plans confocaux, ont pour but d'exclure physiquement le signal lumineux provenant des plans adjacents au plan focal. Ainsi, la lumière émise hors du plan de mise au point n'atteint pas le détecteur et seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du

photomultiplicateur (PMT) pour constituer l'image. L'ouverture du diaphragme conditionnera en grande partie la qualité optique de l'image (élimination de la lumière parasite).

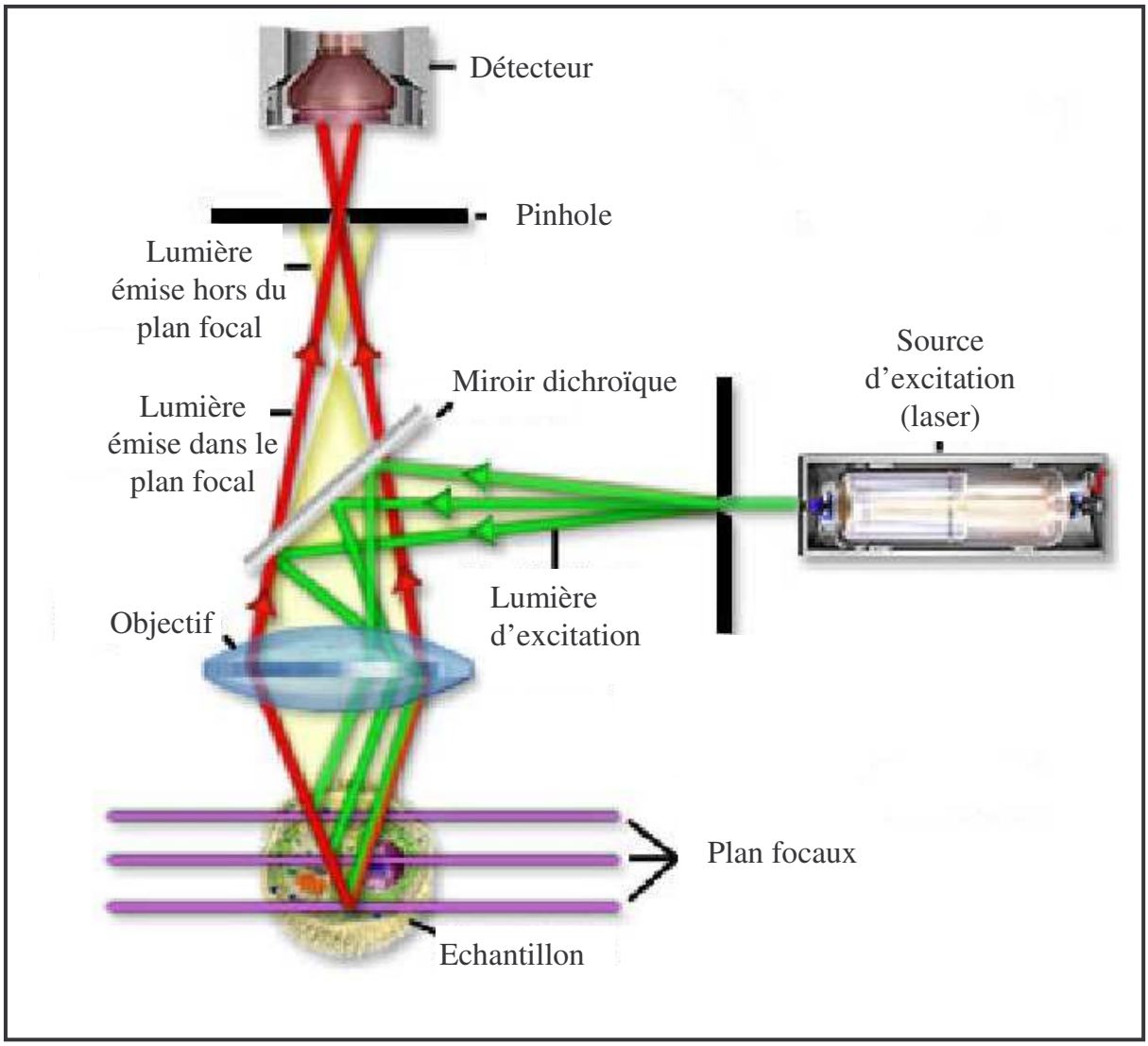


Figure 27 : ***Principe de la microscopie confocale à balayage laser.***

staff.science.uva.nl/~zoon/sms/pictures/setup.jpg.

II. 4. 2. VISUALISATION DU FILM MULTICOUCHE DE POLYELECTROLYTES

Le polycation (PAH) est couplé à un fluorochrome (la rhodamine). Il est utilisé lors de la construction des deux dernières couches du film multicouche de polyélectrolytes dans la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée.

Réactifs

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

Protocole

La construction du film est réalisée sur trois artères selon le traitement :
Echantillon 1 : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée traitée par le film PAH-$PSS)_2$-PAH-rhodamine-PSS- PAH-rhodamine.
Echantillon 2 : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée traitée par une couche de PAH-rhodamine.
Echantillon 3 : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée sans traitement.

Les échantillons sont rincés avec le milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol (Sigma, France), puis soumis à une congélation progressive. La congélation est réalisée après une incubation pendant 1 min dans le l'isopentane (Sigma, France) puis dans de l'azote liquide (Air Liquide, France). Les artères congelées sont ensuite incluses dans de la colle pour tissus (*Optimal Cutting Temperature,* Tissue-Tek® Sakura, USA) dans le but d'effectuer des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur -20°C (Leica CM 3050S, Allemagne). Montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt (Poly Labo, France), les coupes sont maintenues à 4°C jusqu'à observation microscopique. La longueur d'onde d'excitation de la rhodamine est de 594 nm.

II. 4. 3. VISUALISATION DU PHENOTYPE ENDOTHELIAL

La visualisation des marqueurs endothéliaux est effectuée par une réaction d'immunofluorescence. Cette réaction associe la spécificité des anticorps monoclonaux ou polyclonaux et les propriétés des fluorochromes et constitue une méthode de choix pour la révélation d'antigènes cellulaires. Elle nécessite d'utilisation d'un anticorps fluorescent qui se fixe spécifiquement à une molécule intracellulaire ou membranaire. Les techniques de marquage utilisées sont de deux types :

- **Immunofluorescence directe** où l'anticorps est directement conjugué à un fluorochrome.
- **Immunofluorescence indirecte** qui nécessite l'emploi de deux anticorps successifs : l'un reconnaissant l'antigène que l'on désire révéler, l'autre dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué au fluorochrome.

Réactifs

- Albumine sérum bovin (BSA, Sigma, France) utilisée à 0,5% (p/v dans RPMI 1640 sans rouge de phénol).
- Fixation : Paraformaldéhyde (PAF, Sigma, France) : 4% (p/v dans de l'eau physiologique).
- Perméabilisation : Triton-X100 (Sigma, France) : 0,5% et 0,1% (p/v dans de l'eau distillée).

Les anticorps

Nous avons utilisé des anticorps qui permettent de visualiser des récepteurs membranaires (PECAM-1) et des constituants intracellulaire (vWF) par immunomarquages indirects. Le tableau 8 résume les caractéristiques des ces anticorps.

Tableau 8 : ***Caractéristiques des anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence indirecte.***

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Origine commerciale
Platelet endothelial cell adhesion molecule -1	Humain	Souris IgG1	JC 70 A	Dako, France
Facteur de von Willbrand	Humain	Souris IgG1	F8/86	Dako, France
IgG - Alexa® 488 (λex: 488 nm, λem: 519 nm)	Souris	Chèvre	-	Invitrogen, France

➢ **Immuno-marquage des récepteurs membranaires (PECAM-1)**

Les anneaux d'artères endothélialisées (1 cm) sont lavés avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol. 200 µL d'anticorps primaire (dilution 1/50 dans RPMI 1640 sans rouge de phénol supplémenté avec 0,5% BSA) sont ajoutés aux artères pendant 45 min à 37°C. Les artères sont ensuite lavées 3 fois avec 500 µL avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol, puis incubées avec 200 µL d'anticorps secondaire (dilution 1/100 dans RPMI 1640 sans rouge de phénol avec 0,5% BSA) pendant 30 min à 37°C et à l'abri de la lumière. Après 3 lavages avec 500 µL RPMI 1640 sans rouge de phénol, les artères sont fixées avec 500 µL du PAF 4%, puis sont conservées à 4°C et à l'obscurité jusqu'à observation microscopique.

➢ **Immuno-marquage intracellulaire du facteur von Willebrand**

Pour un marquage intracellulaire, les artères sont fixées avec du PAF 4% pendant 10 min à température ambiante, puis lavées avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol. Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de la solution de Triton 0,5% pendant 15 min à température ambiante. L'anticorps primaire est dilué (dilution 1/50) dans du Triton 0,1% supplémenté avec 0,5% BSA. Le protocole de marquage est identique à ce qui a été décrit précédemment.

III. EVALUATION *IN VIVO* DES SUBSTITUTS ARTERIELS

La troisième partie de notre travail est consacrée à l'évaluation chez l'animal (le lapin) des substituts vasculaires (artères ombilicales ou carotide) traités avec un film $(PAH\text{-}PSS)_3$. Les artères cryoconservées et désendothélialisées sont utilisées comme contrôle.

III. 1. ANIMAUX

Toutes les expérimentations effectuées sur le lapin ont été réalisées en respectant les règles de bioéthique en vigueur en Europe (Décret n° 2001-131 du 6 février 2001, lié à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). Ainsi les animaux (lapins blancs Néo-Zélandais mâles, pesant 3 ± 0,25 kg) ont une origine contrôlée (CEGAV, France), ont été hébergés dans une animalerie (Faculté de médecine, UHP-Nancy I) agrée par le ministère de l'agriculture et de la pêche ou la direction départementale des services vétérinaires. Toutes les précautions nécessaires ont été prises pour éviter la souffrance de l'animal lors des expérimentations.

Matériels et réactifs

- *Anesthésiques :* deux types d'anesthésiques sont utilisés :
  Anesthésie générale : Pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, France).
  Anesthésie locale : Xylocaïne (Astra Zenaca, France).
- *Anticoagulant :* héparine de sodium (Sanofi Synthelabo, France).
- Sérum physiologique (NaCl 0,9% Cooper, Rhône-Poulenc, France).
- *Désinfectant :* polyvidone iodée (Bétadine dermique 10%™ Laboratoire Sarget, France)
- Fils chirurgicaux vasculaires 8/0 en polybutester (Surgalloy®, Tyco Healthcare, France).
- Fils chirurgicaux 2/0 en polyglactine (Ethicon, France).
- Des micropinces chirurgicales, un porte aiguille, des microclamps vasculaires, microciseaux (Landanger Chirurgie, France).

III. 2. ANESTHESIE

L'induction de l'anesthésie est réalisée, *via* la veine marginale externe de l'oreille, au moyen d'un cathéter intraveineux (Nécessaire épicrânien, Salva, COOPER, France), par l'injection lente d'une dose de 40 mg/kg de pentobarbital sodique, dilué au quart dans du sérum physiologique. Contrairement aux anesthésiques volatils, le pentobarbital sodique ne semble pas modifier le comportement et les fonctions des polynucléaires neutrophiles ni des plaquettes, ce qui influencerait les résultats de notre étude.

L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée avant le début de tout acte chirurgical par pincement interdigital de la patte arrière du lapin. L'anesthésie est entretenue par injection intra-veineuse de pentobarbital dilué eu ¼ dans du sérum physiologique de façon itérative.

III. 3. MISE EN PLACE DU SUBSTITUT VASCULAIRE

L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal sur une table chauffante permettant de maintenir la température corporelle constante à 37°C. Les zones d'intervention chirurgicales sont rasées puis désinfectées à la polyvidone iodée.

Après application d'un anesthésique locale (Xylocaïne), une incision d'environ 4 cm est pratiquée au niveau du cou, le long de la trachée afin de dégager la carotide droite. Une

administration intra-veineuse de 300 U/mL d'Héparine de sodium est effectuée par la veine marginale juste avant la mise en place des clamps vasculaires (niveau proximal et distal).

Après avoir clampé la carotide, une artériotomie proximale (0,5 cm) est pratiquée à une distance d'environ 1 cm du clamp. Le greffon vasculaire (atères ombilicales humaines ou carotides de lapins) est mis en place par pontage termino - latérale (Figure 28). L'anastomose est réalisée à l'aide de fils vasculaire 8/0. Une fois le greffon mis en place, l'artère carotide est ligaturée et la circulation sanguine dans le greffon est vérifiée. L'anastomose distale est réalisée de la même façon que l'anastomose proximale. La plaie est ensuite désinfectée avec Bétadine dermique 10%™ puis la peau est suturée avec du fil chirurgical en polyglactine (2/0). Après réveil, l'animal est remis à l'animalerie et suivi pendant trois mois.

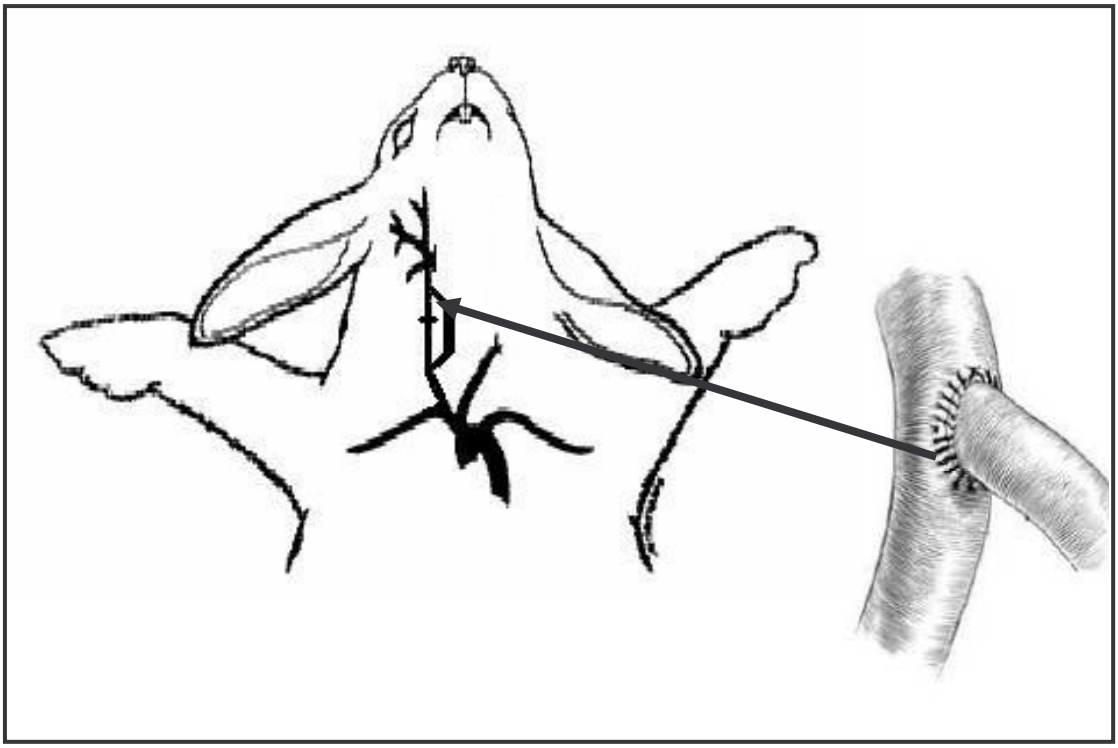


Figure 28 : ***Anastomose termino - latérale en surjet.***

III. 4. SUIVI DU SUBSTITUT AU COURS DU TEMPS

La fonctionnalité des substituts artériels est suivie sur animaux par une technique non invasive « Echo-doppler » (Sonos 7500 Philips).

Principe

L'échographe doppler est constitué d'un échographe classique couplé à une sonde Doppler. Lorsqu'un faisceau d'ultrasons traverse les cavités cardiaques ou les vaisseaux, l'écho renvoyé par les éléments figurés du sang (qui deviennent des émetteurs) aura une longueur plus longue (son plus grave) s'ils s'éloignent du capteur ; et une longueur d'onde plus courte (son plus aigu) s'ils se dirigent vers le capteur. La sonde Doppler recueillera donc un écho dont la fréquence (longueur d'onde) sera différente de la fréquence d'émission.

La sonde émet des ultrasons en permanence et les fréquences réfléchies par les globules rouges sont analysées continuellement. On recueille ainsi un spectre de vitesses correspondant à toutes les zones traversées par le faisceau. Il permet d'enregistrer des flux de très haute vélocité, sans limitation de vitesse mesurable, il permet ainsi d'analyser la vitesse maximale avec une grande précision. Son inconvénient est une moins bonne localisation du flux analysé.

Les échographes Doppler actuels permettent un codage couleur des flux sanguins. Par convention, les flux positifs qui s'approchent de la sonde sont codés en rouge, les flux qui s'en éloignent sont codés en bleu. Il permet ainsi une visualisation directe des flux sanguins qui se superposent à l'image en échographie bidimensionnelle en échelle de gris (Figure 29). L'Echo-Doppler artériel permet de visualiser l'épaississement des parois artérielles et leur évolution, et leur réduction de calibre, ainsi que le débit sanguin au niveau de l'artère.

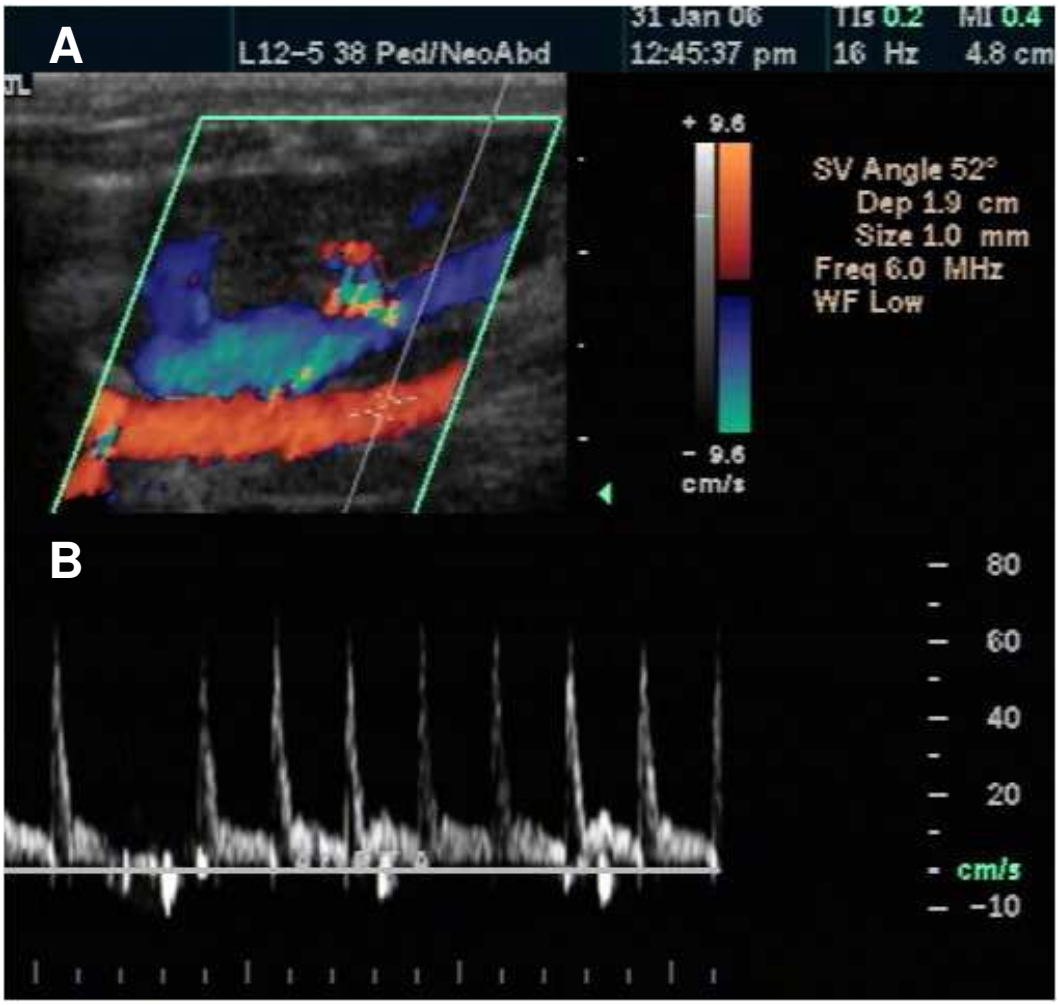


Figure 29 : ***Image obtenue par Echo-Doppler.***

A : les code couleur représentant l'artère en bleu et la veine en rouge ; B : représentele tracé du flux sanguin.
www.utmem.edu/bme/labs/mi/images/ultrasound-1.jpg.

Dans notre étude l'Echo-Doppler a été effectuée chaque semaine. Les lapins opérés sont maintenus éveillés tout au long des mesures. Après rasage de leur cou, un gel pour ultrasons (Nicomgel, France) est appliqué sur la peau. A l'aide d'une sonde (3,5 Hz, Philips, France) nous avons vérifié la perméabilité de nos substituts. Nous avons également mesuré la vitesse du sang et suivi que l'évolution du diamètre du substitut au cours du temps (120 semaines). La carotide native a été considérée comme contrôle.

III. 5. EUTHANASIE ET PRELEVEMENT DES SUBSTITUTS VASCULAIRES

Après 1 et 12 semaines de mise en place du substitut, les greffons ainsi que les carotides témoins (gauches) sont prélevés sur l'animal anesthésié, puis rincés avec de l'eau physiologique héparinée, puis soumis à des examens macroscopique et microscopique.

Les animaux sont ensuite euthanasiés par injection d'une dose létale de pentobarbital sodique, conformément aux recommandations publiées par la Commission européenne (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, lié à la Directive européenne 86-609-CEE de 1986). La mort de l'animal est constatée après arrêts respiratoire et cardiaque. Le cadavre est conservé à 4°C jusqu'à incinération.

IV. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart moyen pour chaque artère étudiée (n = 12). Un test statistique non paramétrique (Kolmogorov-Smirnov) a été réalisé avec comparaison des échantillons (artères traitées, non traitées et fraîches) entre eux (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05% ont été considérées significatives (* $p< 0,05$, ** $p< 0,01$, *** $p< 0,005$).

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Le développement d'une nouvelle matrice vasculaire, qui constitue l'objectif de ce travail, a été mené selon une méthodologie bien particulière et des moyens modernes d'investigation. Cette procédure comporte quatre étapes :

1. Isoler et évaluer histologiquement les artères issues du cordon ombilical humain.
2. Modifier la surface luminale par dépôt d'un film multicouche de polyélectrolytes.
3. Evaluer le comportement biomécanique de la paroi artérielle.
4. Ensemencer dans la lumière des artères de cellules endothéliales.

Nous avons par ailleurs, procédé à l'évaluation *in vivo* des artères traitées par un film multicouche de polyélectrolytes.

La présentation des résultats expérimentaux et leur interprétation suivent la même démarche. Ainsi :

Dans un premier chapitre, nous avons évalué l'intégrité d'artères issues de cordons ombilicaux humains isolées et conservées à basses températures.

Le second chapitre sera consacré à la construction d'un film multicouche dans la lumière de ces artères et à son observation microscopique.

Le comportement biomécanique et de l'elasticité de la paroi seront évalués dans le troisième chapitre.

Dans le quatrième chapitre, nous étudierons l'adhésion, l'étalement et la rétention des cellules endothéliales ensemencées dans les artères traitées avant et après cisaillement.

Les artères traitées non endothélialisées ont fait l'objet d'une évaluation *in vivo* dont les résultats seront discutés dans le cinquième chapitre.

I. DEVELOPPEMENT D'UNE MATRICE ARTERIELLE

Les artères sont isolées à partir du cordon ombilical humain, puis des segments de 6 cm sont découpés et conservés dans de l'azote liquide (-180°C) pendant une durée minimale égale à six mois (pour respecter la procédure en vigueur imposée par l'AFSSAPS). Nous procèdons ensuite a la désendothélialisation de leur surface luminale afin de les rendre apte au dépôt d'un film de polyélectrolytes.

I. 1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

☞ **Examen histologique de l'artère après cryoconservation**

Cet examen permet de vérifier l'intégrité structurelle de l'artère après cryocongélation et décongélation, c'est-à-dire la présence de cellules vasculaires notamment les cellules endothéliales ainsi que d'élastine et de collagène de type IV. Il permet aussi de vérifier l'absence de fractures au niveau de la paroi artérielle. Pour cela, nous avons effectuée des coupes histologiques colorées :

- à l'hématoxyline-éosine-safran (H&S), qui permet d'observer l'aspect général de l'artère,
- au mélange de fuschine basique et de résorcine (coloration de Weighert), qui permet d'observer le contenu en élastine de la paroi artérielle.

Les fibres de collagène ont été observées après marquage et révélation immunohistochimique.

Nous avons ensuite procédé à la comparaison des coupes effectuées sur des artères ombilicales cryoconservées (AOC) et d'artères ombilicales fraîchement isolées (AOF) considérées comme témoin.

Les figures 30A à 30D représentent des coupes histologiques d'AOF. Ces figures nous ont permis de distinguer les trois couches de la paroi vasculaire :

- Dans l'intima apparaissent des noyaux de cellules organisées en une monocouche régulière (Figure 30A),

- La média renferme de l'élastine (Figure 30C), quelques fibres de collagène IV (Figure 30D) et des noyaux organisés circonférentiellement (Figure 30B),
- Dans l'adventice, nous observons la présence prédominante du collagène de type IV (Figure 30D). Cette couche est également entourée de la gelée de Wharton (Figure 30A).

Les figures 30E à 30H, représentent des coupes histologiques analogues effectuées sur des AOC. Nous remarquons :

- La disparition de la monocouche de cellules « continue » au niveau de l'intima (Figure 30E, flèche rouge),
- La diminution de la densité de noyaux au niveau de la média ; ces noyaux conservent cependant leur organisation circonférentielle (Figure 30F). Nous observons également la présence de quelques cavités provoquées par des cristaux de glace qui apparaissent lors de la décongélation (Figure 30F, flèche noire) ainsi qu'une diminution de la densité d'élastine (Figure 30 G),
- La présence de collagène de type IV ainsi que la gelée de Wharton au niveau de l'adventice.

La comparaison entre la figure 30A et 30E nous montre une légère augmentation du diamètre interne de l'artère après congélation. Cependant aucune fracture au niveau de la paroi artèrielle n'est observée.

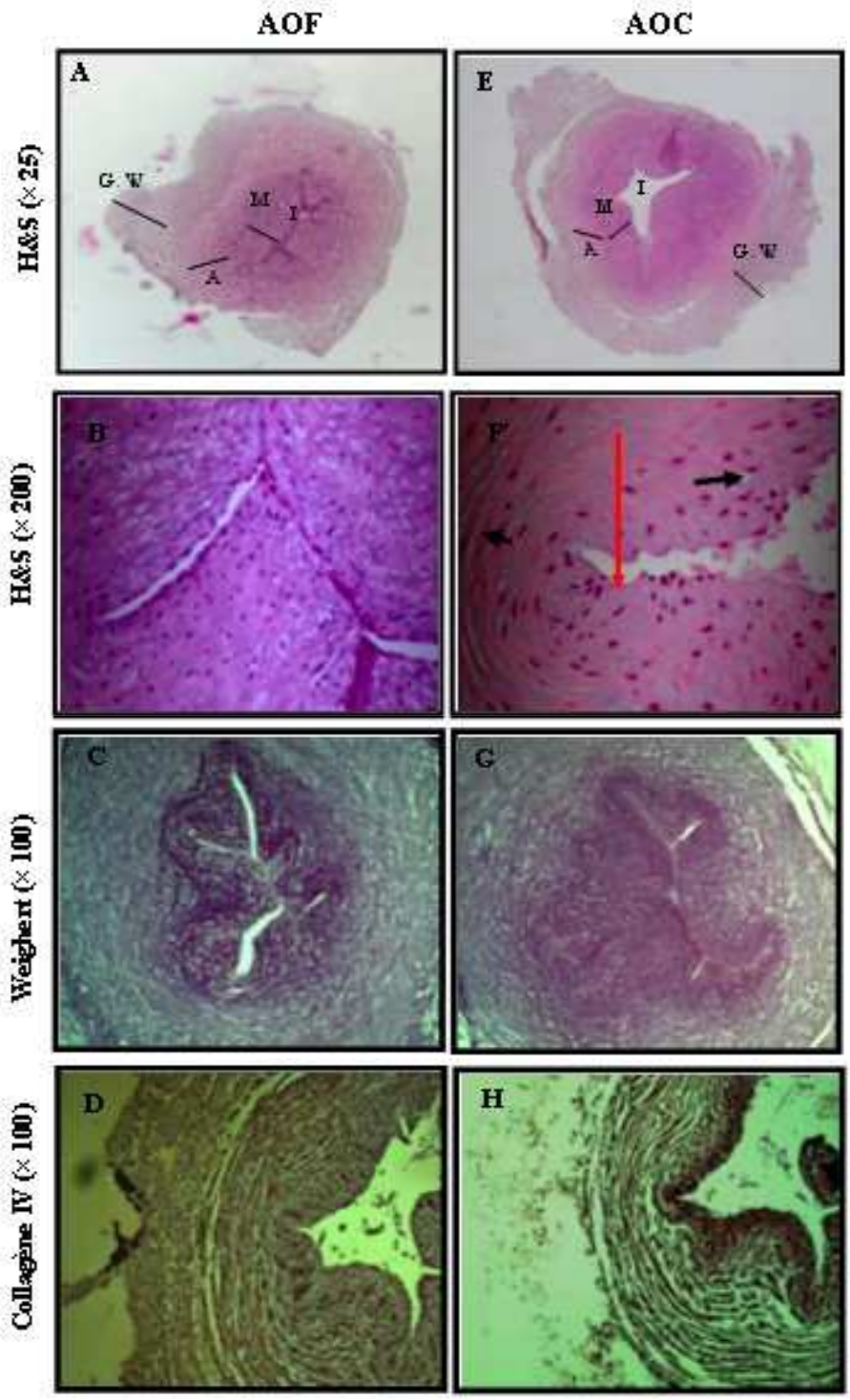


Figure 30 : ***Coupes histologiques d'artères ombilicales fraîches et cryoconservées;*** *la congélation/décongélation entraîne l'absence de cellules au niveau de l'intima (F, flèche rouge), la présence de quelques cavités au niveau de la média (F, petites flèches) et la diminution de l'élastine au niveau de la média. H&S : Hématoxyline-éosine-Safran, I : intima, M : média, A : adventice et GW : gelée de Wharton, AOF : artères fraîches, AOC : artères cryoconservées. Objectifs × 200 (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombre d'échantillons= 3 artères.*

☞ **Identification des cellules vasculaires par immunohistochimie.**

L'identification des cellules présentes dans les différentes couches de l'artère a été réalisée sur des coupes histologiques d'artères incubées avec des anticorps spécifiques : soit aux cellules endothéliales (PECAM-1), soit aux cellules musculaires lisses (αSMA). Une contre coloration des coupes à l'hématoxyline a permis de visualiser les noyaux en bleu.

Les images obtenues (Figure 31A et 31B) montrent la présence de cellules positives aux PECAM-1 au niveau de l'intima. Ceci indique que ce sont essentiellement les cellules endothéliales qui sont endommagées lors de la décongélation. Les cellules présentes au niveau de la média sont positives aux αSMA (Figure 31C et 31D).

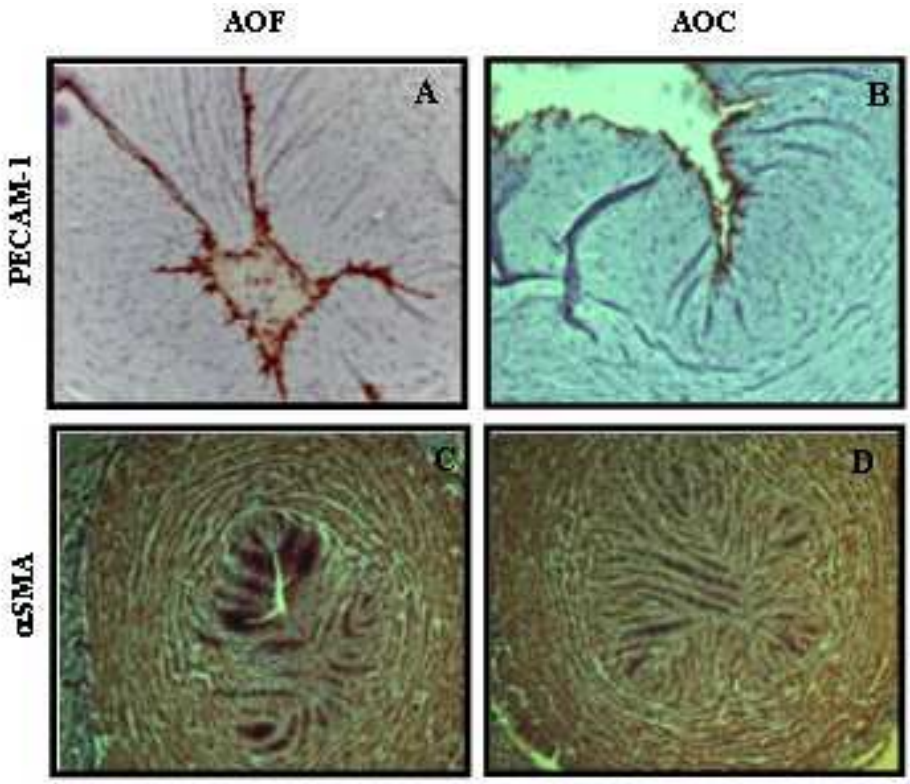


Figure 31 : ***Expression du PECAM-1 et de l'αSMA par les cellules vasculaires d'artères ombilicales fraîches et cryoconservées :*** *les cellules de l'intima expriment le PECAM-1 (A et B) ; les cellules de la média et de l'adventice l'αSMA (C et D). Immunohistochimie révélation par une peroxydase et contre coloration des noyaux par l'hématoxyline. PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecules-1, αSMA : α smooth muscle actin, AOF : artères fraîches, AOC : artères cryoconservées. Objectifs × 200 (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombre d'échantillons= 3 artères.*

L'ensemble de ces observations montre la préservation des phénotypes vasculaires après cryocongélation.

☞ **Evolution de la morphologie de la lumière de l'artère**

La microscopie électronique à balayage (MEB) a permis d'observer les modifications apportées à la morphologie et à la topologie de la lumière des artères, issues du cordon ombilical humain, par la cryoconservation. En effet, la lumière de l'artère ombilicale fraîchement isolée présente une monocouche de cellules régulières, pavimenteuses et bien étalées, caractéristiques des cellules endothéliales (Figure 32 A). Par contre, l'observation de la lumière des artères décongelées montre la disparition de la monocouche cellulaire, mais révèle la présence de débris de CE (Figure 32 B).

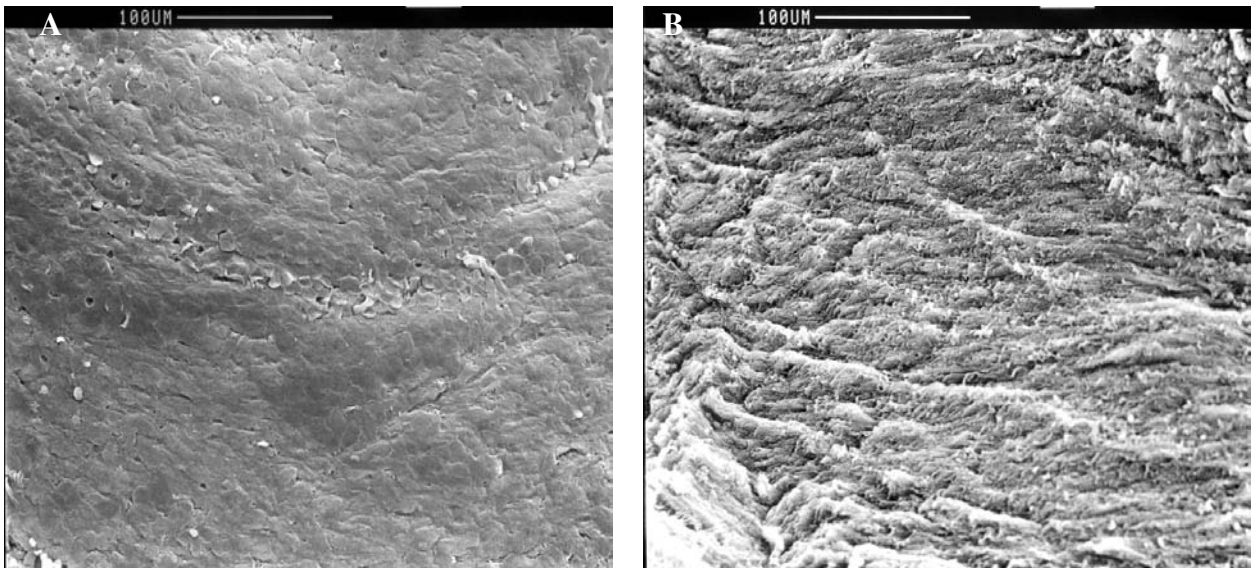


Figure 32 : ***Topologie de la lumière de l'artère ombilicale fraîche*** *(A)* ***et cryoconservée*** *(B). L'aspect de la lumière de l'artère après cryoconservation (B) est différent de l'artère fraîche (A) ; Ce qui suggère la présence de débris de cellules endothéliales dans la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre d'échantillons= 6 artères.*

☞ **Désendothélialisation de la lumière des artères cryoconservées.**

Les cellules endothéliales ainsi que les débris de cellules mortes présentes dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées sont détachés par traitement enzymatique à la trypsine.

Nous avons vérifié l'absence totale de CE et de leur débris par microscopie confocale à balayage laser (CLMS) après un co-marquage des marqueurs endothéliaux (PECAM-1 et facteur vWF) et du noyau (iodure de propidium : IP). La figure 33 montre l'absence de toute trace de CE sur toute la surface interne de l'artère du fait de l'absence d'immunomarquage du récepteur PECAM-1 et du facteur de vWF. Les noyaux présents au niveau du sous endothélium, possèdent les caractéristiques des cellules musculaires lisses (forme allongée).

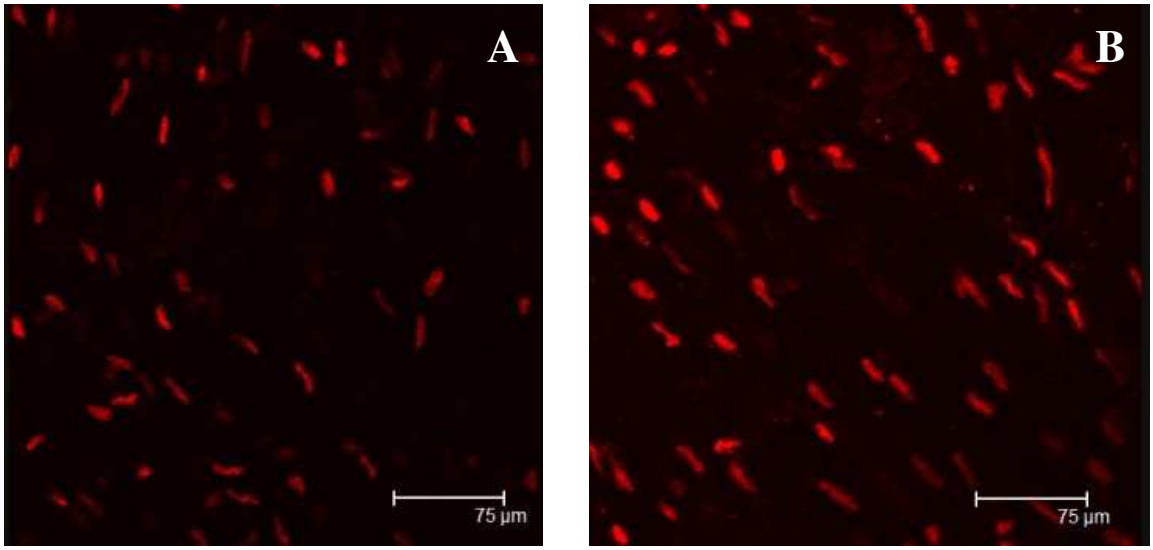


Figure 33 : ***Immunomarquage des marqueurs spécifiques à l'endothélium vasculaire*** *(A : PECAM-1 et B : vWF) ; montre que la lumière des artères désendothélialisées est négative pour le PECAM-1 et le vWF suggérant l'absence complète des cellules endothéliales. Les noyaux des cellules vasculaires (marqués à IP : rouge), ont une forme allongée, caractéristique des cellules musculaires lisses. IP : Iodure de propodium, PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecules-1, vWF : von willebrand factor. Microscopie confocale objectif × 40, ON 0,8, (Leica, Germany) ; nombre d'échantillons= 2 artères.*

La figure 34 représente des coupes histologiques d'artères ombilicales cryoconservées et désendothélialisées (AOCD) après coloration à l'H&S. Nous remarquons l'absence totale de noyaux au niveau de l'intima, ce qui confirme le détachement des toutes les CE de la lumière des artères.

La désendothélialisation s'accompagne d'une augmentation du diamètre interne de l'artère correspondant à une diminution de l'épaisseur de la paroi artérielle due à une diminution de la quantité d'élastine au niveau de la média (Figure 34D).

Le traitement enzymatique à la trypsine ne s'accompagne pas de fracture et ne manifeste pas d'incidences sur l'organisation circonférentielle des CML, ni sur leur phénotype au niveau de la média (Figure 34B flèche et Figure 34C), De même, le traitement ne semble pas modifier l'organisation des fibres de collagène IV (Figure 34E).

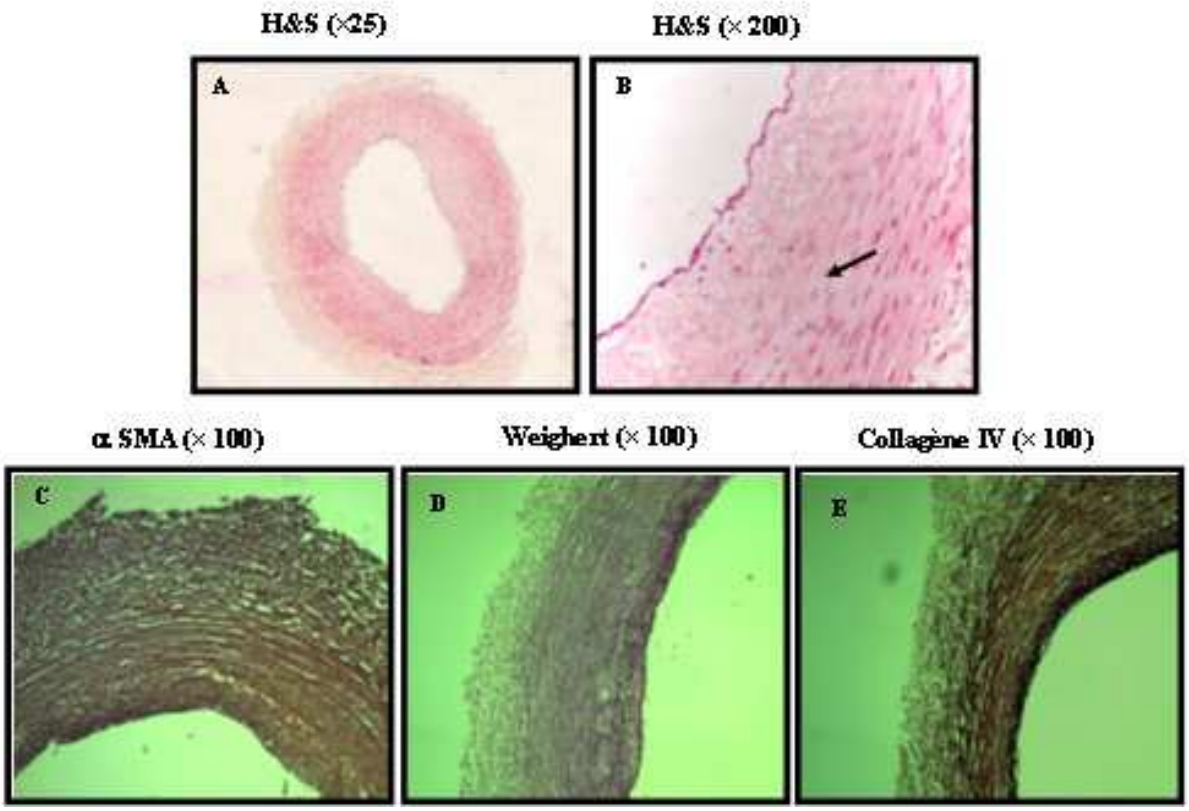


Figure 34 : ***Observation de coupes histologiques d'artères ombilicales cryocongelées, désendothélialisée****. En comparaison avec la figure 30E, la figure 34A montre une augmentation du diamètre interne de l'artère après désendothélialisation enzymatique. H&S : hématoxyline- éosine-Safran, αSMA : α smooth muscle actin. (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon), nombre d'échantillons= 3 artères.*

La figure 35 représente la topologie de la surface luminale d'une AOCD obtenue par MEB. Elle montre l'absence de cellules endothéliales sur l'intégralité de la lumière de l'artère. Le sous endothélium révèle un aspect hétérogène non lisse, légèrement différent de celui observé pour l'AOC.

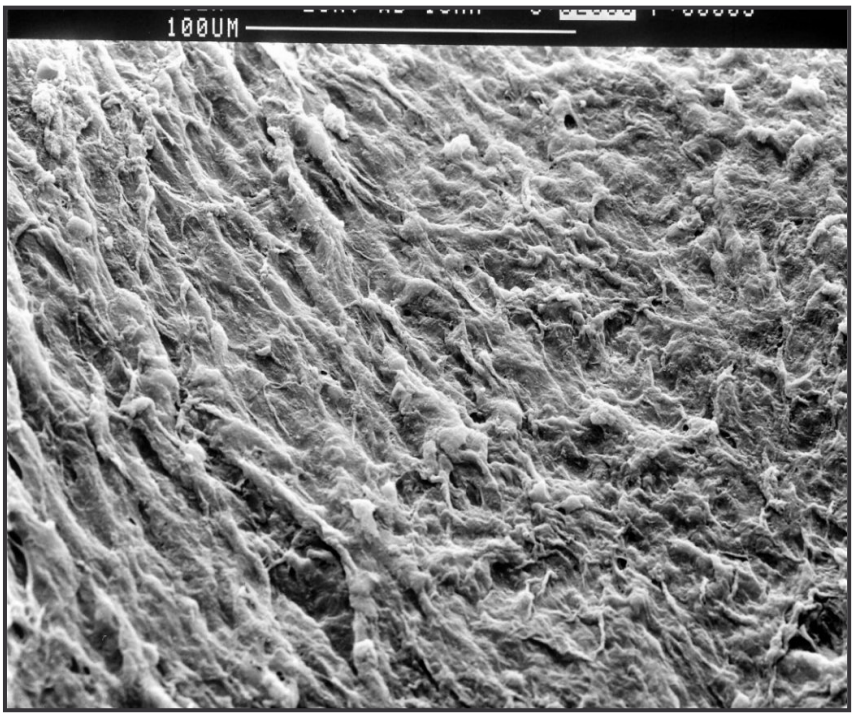


Figure 35 : ***Topologie de la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée ;*** *nous observons l'absence de la monocouche des cellules endothéliales dans la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée, le sous endothélium montre un aspect non homogène de la surface. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre d'échantillons= 6 artères.*

I. 2. DISCUSSION

Dans cette partie, nous avons examiné la possibilité de développer une nouvelle matrice vasculaire à partir d'artères issues du cordon ombilical humain. Ce type de matrice présente plusieurs caractéristiques et propriétés intéressantes qui pourraient en faire la matrice biologique idoine pour l'ingénierie des vaisseaux de petits calibres. En effet, la présence des trois tuniques, l'origine humaine, la biodisponibilité, la taille (diamètre interne variant entre 2,5 à 4 mm), la longueur (pouvant atteindre une trentaine de centimètre), la résistance à la contamination bactérienne et le faible risque d'infections secondaires répondent aux exigences de cette catégorie de matrice.

Pour préserver l'intégrité de la matrice artérielle et respecter les contraintes imposées par les services sanitaires (détection virale HIV, hépatite B et C, syphilis) et par les cliniciens (disponibilité), nous avons entrepris de conserver des artères ombilicales fraîchement isolées dans de l'azote liquide selon un protocole utilisé dans les unités tissulaires thérapeutiques [17, 176]. En plus d'une conservation convenable de la paroi artérielle, ce procédé permet une réduction du pouvoir antigénique des allogreffes [177, 178]. Ainsi, l'utilisation d'une artère cryoconservée permettrait de diminuer les risques de calcification et de rejet observés lors de l'implantation des allogreffes.

Cette procédure engendre cependant plusieurs complications lors de l'implantation de la greffe [19].

☞ La première résulte de l'apparition de fissures ou de fractures de la paroi vasculaire lors de la décongélation des allogreffes, entraînant une rupture du greffon [17, 179-181]. Plusieurs études ont été consacrées à l'amélioration du protocole de cryoconservation des tissus [176, 182, 183]. La plus récente [176] compare l'effet d'une décongélation rapide (à 37°C) à celui d'une décongélation progressive (à 20°C pendant 30 min, puis à 40°C). Cette étude a montré que la rapidité de la décongélation réduit les fractures au niveau de la paroi vasculaire. Dans notre cas, nous avons associé à la congélation progressive, une décongélation rapide des artères issues du cordon ombilical. Les examens histologiques réalisés sur ces coupes d'artères révèlent la présence de quelques cavités engendrées par la formation de cristaux, mais aucune fissure de la paroi artérielle n'est observée. Des travaux complémentaires

utilisant des techniques de biréfringence pourraient permettre la détection de microfissures au niveau des fibres de collagène et d'élastine [184, 185]. Ils feront parti des études ultérieures.

☞ La seconde complication est due à la perte de l'endothélium vasculaire. Ce dernier constitue un paramètre majeur pour assurer le bon fonctionnement d'une greffe vasculaire. En effet, la perte de l'endothélium (barrière anti-thrombogénique) rend le sous endothélium notamment le collagène accessible aux éléments thrombogènes du sang (plaquettes, leucocytes) engendrant une thrombose précoce.

L'endothélialisation des substituts vasculaires avec des cellules endothéliales si possible autologues (issues du patient) reste à nos jours le meilleur moyen pour améliorer la survie de la greffe vasculaire [61, 108, 186]. L'endothélialisation des substituts vasculaires naturels, à l'issus de la cryocongélation, ne peut être réalisée que sur des matrices totalement **désendothélialisées** au préalable. La désendothélialisation est une opération supplémentaire indispensable pour au moins deux raisons fondamentales : la première est d'ordre immunologique notamment lorsqu'il s'agit de substituts non autologues ; la seconde est d'ordre mécanique car des débris peuvent être arrachés et obstruer le vaisseau. Par ailleurs, un ensemencement de cellules endothéliales dans la lumière des artères cryoconservées non désendothélialisées entraînerait la formation d'une bicouche de cellules dont la résistance aux contraintes de cisaillement serait affaiblie [21].

Plusieurs techniques permettant d'obtenir une surface luminale désendothélialisée sont décrites dans la littérature. Certaines font appel à une action mécanique (par éversion et abrasion de la surface interne [64]) d'autres à une action chimique (Triton et sodium dodecyl sulfate, [63]), ou encore à un traitement enzymatique (collagènase, trypsine [187]).

Pour notre part, nous avons développé une technique de désendothélialisation basée sur l'action de la trypsine (pendant 20 min). Le choix de cette enzyme est motivé par sa capacité à conserver la structure des fibres de collagène et à maintenir la présence et l'organisation des cellules musculaires lisses (Figure 34). Cette technique permet aussi de réduire les perturbations biomécaniques et les risques de fractures de la paroi artérielle susceptibles d'être engendrées par la désendothélialisation mécanique. Enfin, la désendothélialisation enzymatique évite l'emploi de détergents chimiques qui entraînent une décellularisation complète de la paroi artérielle. Elle évite aussi des perturbations qui

pourraient survenir lors des étapes ultérieures de la préparation et qui seraient dues aux produits des réactions chimiques.

La désendothélialisation de l'artère s'accompagne d'une augmentation de son diamètre interne et de la diminution de l'épaisseur de la média (conséquence de la perte d'élastine). Ces résultats s'observent quelque soit la méthode utilisée [9].

Les examens histologiques et les observations microscopiques nous ont permis de préciser les conditions de conservation (congélation progressive à -80°C puis à -180°C et de décongélation rapide à 37°C) qui n'entraînent pas de dégradations majeures de la paroi.

I. 3. CONCLUSION

L'élimination totale de cellules endothéliales de la lumière des artères ombilicales par l'action de la trypsine, nous a permis d'obtenir une surface luminale apte à subir un traitement afin de la rendre non thrombogène. Ce traitement consiste à construire un film multicouche de polyélectrolytes chargé à la surface. Selon le signe de la charge surfacique, ce film pourra accueillir de nouvelles cellules endothéliales (lorsque la charge est positive) ou empêcher l'adhésion des éléments thrombogènes du sang (lorsque la charge est négative).

II. CONSTRUCTION D'UN FILM MULTICOUCHE DE POLYELECTROLYTES DANS LA LUMIERE DE L'ARTERE OMBILICALE CRYOCONSERVEE ET DESENDOTHELIALISEE

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont été consacrés au dépôt de film multicouche de polyélectrolytes (MPE) sur des lames de verre (Thèse C. Boura). Ainsi, plusieurs films ont été testés. Sur la base des résultats obtenus, nous avons entrepris de construire dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées et désendothélialisées un film multicouche en choisissant comme polyélectrolytes l'hydrochlorure de polyallylamine (PAH) et le poly (sodium - 4 - styrène sulfonate) (PSS).

II. 1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les films multicouche $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH et $(PAH\text{-}PSS)_3$ ont été déposés par des injections alternées de PAH et de PSS.

☞ Mise en évidence du dépôt

Nous avons d'abord entrepris de vérifier que le dépôt de la multicouche a été réalisé sur toute la surface interne de l'artère et de manière homogène et régulière. Pour cela, nous avons synthétisé et incorporé du PAH couplé à la rhodamine (PAH*), que nous avons substitué au PAH lors de la construction des deux dernières couche du film. Tandis qu'une seule couche de PAH* a été déposée dans la lumière de l'artère ayant servi de témoin.

La figure 36 représente les images obtenues au CLMS du recouvrement de la paroi (Figure 36A) et des cryosections (Figure 36B) des artères traitées par le film marqué à la rhodamine. Ces images montrent un recouvrement total et un dépôt homogène du film multicouche de polyélectrolytes sur toute la surface interne de l'artère. En revanche, l'observation des cryosections d'artères traitée par une monocouche de PAH* montre que le recouvrement de la lumière est partiel (Figure 36C).

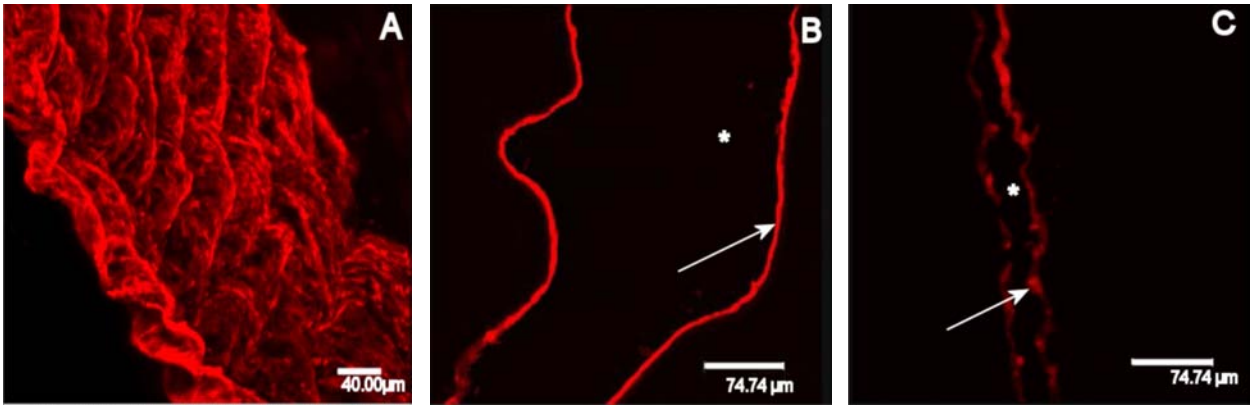


Figure 36 : ***Recouvrement de la lumière des artères par le film PAH-(PSS-PAH)$_3$ marqué par de la rhodamine :*** *la structure tridimensionnelle de la paroi artérielle (A) et des cryosections (B) montrent un recouvrement sensiblement parfait de la paroi par le film. Le dépôt d'une monocouche de PAH - rhodamine montre un recouvrement imparfait de la surface interne de l'artère (C). Microscopie confocale à balayage laser, Objectif × 40, ON 0,8 (Leica, Germany). La flèche montre la localisation du film, et l'astérisque la lumière de l'artère ; nombre d'échantillons= 3 artères.*

☞ **Morphologique de la lumière de l'artère fonctionnalisée**

L'observation au MEB de la topologie de la lumière de l'artère cryoconservée, désendothélialisée et recouverte par le film multicouche de polyélectrolytes (AOCD-PME) révèle une surface homogène, reproductible et présentant le même aspect pour toutes les microrégions de la surface (Figure 37). Cette topologie est totalement différente de celle présentée par l'artère ombilicale cryoconservée désendothélialisées et non traitée (Figure 35). Les sortes de plis (vallées) longitudinaux ne sont que les plicatures naturelles de la matrice. L'observation à fort grossissement (insert) montre que le film recouvre les fibres de collagène et d'élastine qui rentrent dans la constitution de la matrice artérielle.

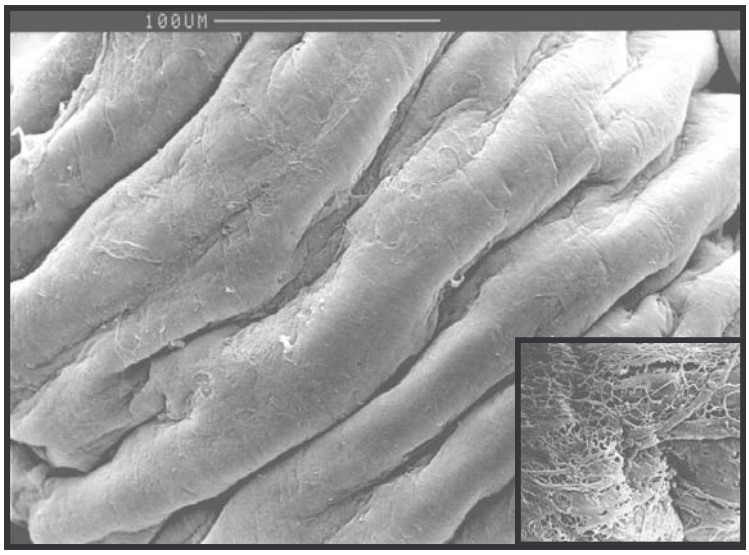


Figure 37 : ***Topologie de la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée et recouverte par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$.*** *La figure montre une surface homogène avec un aspect bien régulier. Insert montre les fibres de collagènes/élastine observées sous le film. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre d'échantillons= 3 artères.*

☞ **Examen histologique de l'artère fonctionnalisée**

Les coupes histologiques d'artères dont la lumière a été traitée par dépôt d'un film MPE et colorées à l'H&S, ont permis de visualiser le film MPE en rouge. Cette coloration rouge révélée pour la première fois est due à une interaction de l'éosine (de la coloration H&S) avec le polyanion (PSS) [188] (Figure 38A et 38B). Cette coloration inédite a été mise à profit pour mettre en évidence la pénétration du polyélectrolyte dans la paroi artérielle. Cette pénétration a cependant entraîné une modification des contrastes qui nous permettaient de repérer les trois couches de l'artère. (Figure 41B, Flèches).

La comparaison des figures 38A et 38C avec la figure 34A et 34C (de la page 90) montre que l'épaisseur de la paroi artérielle et l'organisation des cellules musculaires lisses dans l'ensemble de l'artère n'ont subi aucune modification. De la même façon, les figures 38D et 38E comparées aux figures 34D et 34E ne semblent pas montrer de changement de l'organisation des fibres d'élastine et de collagène de type IV.

L'ensemble des résultats suggère l'innocuité du protocole et des composants du film sur la structure de la paroi vasculaire.

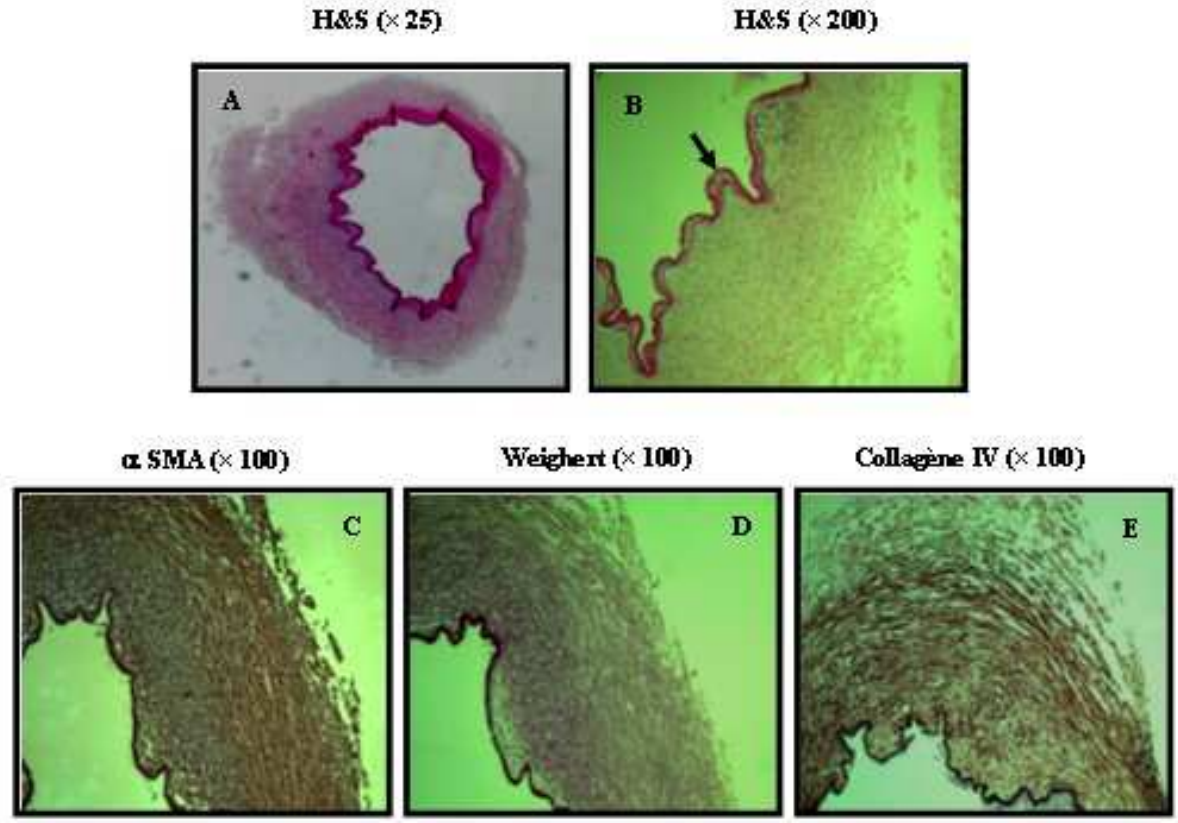


Figure 38 : ***Coupe histologique d'une artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée, après dépôt du film PAH-(PSS-PAH)$_3$;*** *L'interaction polyélectrolyte/colorant (éosine), montre une pénétration et une diffusion des polyélectrolytes dans la matrice artérielle (Flèche). Aucune fracture au niveau de la matrice ni augmentation du diamètre interne de l'artère n'est observée après construction du film multicouche de polyélectrolytes. Nous observons également la présence de collagène et d'élastine au niveau de la paroi H&S : hématoxyline- éosine-Safran, αSMA : α smooth muscle actin. (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombre d'échantillons= 3 artères.*

II. 2. DISCUSSION

La modification de la surface des matériaux par dépôt de film est largement utilisée pour améliorer les propriétés des matériaux utilisés dans le domaine de la biologie ou de la chimie [189, 190].

Nous avons montré dans ce second chapitre, que la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes par alternance de couches de l'hydrochlorure de polyallyamine et de couches de poly (sodium-4-styrène sulfonate) permettait de modifier la surface interne des artères. La construction de ces films présente des avantages certains : la simplicité de la procédure, l'homogénéité des dépôts, la reproductibilité et la possibilité de moduler les propriétés physico-chimiques par de simples modifications des conditions opératoires [162]. De plus, le choix du polyélectrolyte formant la dernière couche permet de fixer la charge surfacique du film. Ainsi pourrions nous réaliser des films pour empêcher (lorsque la charge de surface est négative) ou améliorer (lorsque la charge de surface est positive) l'adhésion des cellules.

Dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, les films multicouches de polyélectrolytes ont été utilisés pour modifier les propriétés physicochimiques d'endoprothèses vasculaires [169], de la lumière des artères endommagées [168] et des prothèses synthétiques [191]. Ces films à croissance exponentielle, de par leurs caractéristiques physiques (riches en eau) et leur charge surfacique (négative), ont la particularité de s'opposer à l'adhésion des éléments figurés du sang (tels que les leucocytes et les plaquettes) mais également celles des cellules endothéliales [168, 192]. Cependant à notre connaissance, aucune évaluation *in vivo* des films MPE n'a été publiée à ce jour.

L'autre alternative d'utilisation des films est la modification de surface des prothèses vasculaires dans le but de faire adhérer des cellules notamment les cellules endothéliales [172, 193]. Le succès d'une prothèse vasculaire dépend de la qualité de l'adhérance des cellules à la surface du matériau et par conséquent de la croissance, la migration, la différenciation et la rétention des cellules [108, 194].

A notre connaissance et à ce jour, le seul moyen pour rendre une surface vasculaire apte à favoriser l'adhésion et la rétention cellulaire est d'utiliser des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que le collagène, le fibrinogène… [61, 107, 108]. Cependant, les

résultats obtenus après implantation chez l'animal de substituts vasculaires prétraités avec des composants de la MEC et endothélialisés n'ont pas donné satisfaction. De plus, leur origine animale limite leur utilisation en clinique [118].

Les travaux réalisés par C. Boura, sur lame de verre, ont permis de sélectionner parmi une panoplie de films, celui qui permet la meilleure adhésion, le meilleur étalement et la bonne fonctionnalité des cellules endothéliales. Le recouvrement total de la lame de verre a été obtenu avec un film construit à partir de sept couches alternées de l'hydrochlorure de polyallyamine : PAH et de poly (styrene-4-sulfonate) : PSS [172]. Un tel recouvrement répond aux trois exigences citées précédemment. Nous avons entrepris au cours de cette étude de construire dans la lumière de l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée, un film identique.

Lors de la construction du film, le premier polyélectrolyte déposé est le polycation (PAH) en raison de la charge négative portée par la matrice artérielle [168]. Les images de microscopie confocale à balayage laser attestent que le recouvrement de la surface interne du vaisseau par le film est total (Figure 36A et 36B). Ceci a été confirmé par l'examen des coupes histologiques colorées à l'H&S. De plus, ces examens ont montré que le PSS pénètre et diffuse dans la matrice artérielle. Cette pénétration ne semble avoir aucune incidence sur l'organisation des fibres de collagène et d'élastine. Ce résultat doit cependant être confirmé par une étude fine de la structure des fibres. La présence de noyaux correspondant aux cellules musculaires lisses au niveau de la paroi artérielle suggère que la construction du film n'a aucune incidence sur la viabilité des cellules (résultats non montrés). La comparaison des topologies de la lumière de l'artère avant (Figure 35) et après dépôt du film multicouche (Figure 37) est nettement différente. La surface interne observée après construction du MPE présente un aspect semblable à celui observé par d'autres auteurs [195]. C'est une surface plutôt lisse, régulière présentant des plis.

II. 3. CONCLUSION

En résumé, nous avons montré dans ce deuxième chapitre la possibilité de construire un film multicouche de polylélectrolyes sur la paroi interne des artères ombilicales cryoconservées et désendothélialisées. Ce film nous a permis d'obtenir un recouvrement total de la surface luminale. Il reste à étudier le comportement biomécanique de cette matrice modifiée avant d'envisager une application *in vivo*.

III. EVALUATION DES PROPRIETES MECANIQUES DE LA MATRICE ARTERIELLE

Il est communément admis que la congélation et la décellularisation imposés aux artères conduisent à des modifications de leur comportement mécanique [9, 196]. A présent, nous nous proposons d'étudier l'influence des traitements effectués précédemment sur le comportement biomécanique de la paroi artérielle. Pour cela, nous avons utilisé le banc d'essai décrit dans la page 64. Les modifications sont représentées par le pourcentage de déformation ΔD sur :

- ☞ des artères fraîches ;
- ☞ des artères cryoconservées et désendothélialisées ;
- ☞ des artères cryoconservées, désendothélialisées et traitées par le film multicouche de polyélectrolytes.

III. 1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons porté sur la figure 39, la pression imposée à l'intérieur de l'artère et les pourcentages de déformation qui en résulte. Cette figure montre que, pour une pression inférieure à 80 mmHg, le pourcentage de déformation de l'AOCD est faible (< à 40%). Ce qui suggère une perte d'élasticité de l'artère. En revanche, après construction du film, les pourcentages de déformation reprennent leurs valeurs initiales. Le dépôt du film dans la lumière de l'artère permet de restaurer l'élasticité perdue après congélation et désendothélialisation. Les courbes obtenues présentent des variations linéaires pour des pressions supérieures à 80 mmHg.

Le tableau 9 résume les différentes données fournies par les tests mécaniques. Le diamètre externe des artères est mesuré à 0 et 230 mmHg. Nous avons montré que, quelque soit l'artère, aucune différence significative du diamètre externe n'est observée.

Nous avons également calculé la compliance des différentes artères à des pressions physiologiques (entre 80 et 150 mmHg) chez un sujet sain. Nous observons que le dépôt du film MPE dans la lumière de l'AOCD permet d'améliorer les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle. Les valeurs obtenues se rapprochent de celles d'une artère fraîche.

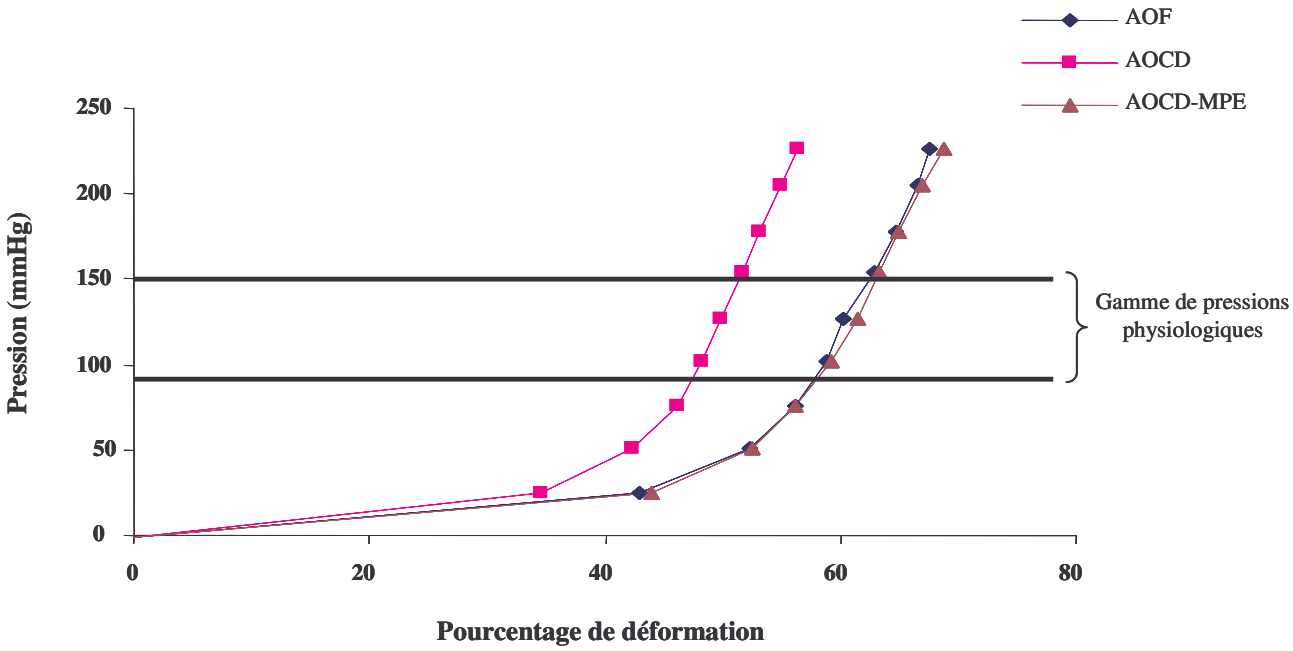


Figure 39 : ***Courbe représentant la pression exercée sur les artères soumises aux différents traitements en fonction du pourcentage de déformation.*** *AOF : artères ombilicales fraîches, AOCD : artères ombilicales, cryoconservées désendothélialisées, AOCD-PME : artères ombilicales, cryoconservées, désendothélialisées dont la lumière est traitée par un film multicouche de polyélectrolytes (n = 12). La déformation des AOCD à de faibles pressions est moins importante que celle des AOF et AOCD-MPE.*

Tableau 9 : ***Propriétés biomécaniques des artères ombilicales fraîches (AOF), des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées (AOCD) et des artères ombilicales cryoconservées, désendothélialisées dont la lumière est recouverte par un film multicouche de polyélectrolytes (AOCD-PME).***

	AOF	AOCD	AOCD-PME
Diamètre externe au repos à 0 mm Hg (mm)	2,65 ± 0,2	2,94 ± 0,51	2,97 ± 1,03
Diamètre externe au repos à 230 mm Hg (mm)	4,24 ± 0,21	4,61 ± 1,03	4,86 ± 1,34
% de déformation à 230 mm Hg	68 ± 20	56 ± 9 (**)	69 ± 17
Compliance (% de déformation/mmHg)	0,93 ± 0,24	0,63 ± 0,11(**)	0,96 ± 0,24

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne ± SD, (**) ($p < 0.01$) significativement différent (AOCD versus AOF).

III. 2. DISCUSSION

Cette troisième partie de ce travail est consacrée à l'évaluation des propriétés biomécaniques des artères ombilicales cryoconservées, désendothélialisées, avant et après dépôt du film multicouche de polyélectrolytes. La différence des propriétés biomécaniques (compliance, distensibilité, déformabilité...) entre le substitut et l'artère native, sur laquelle est implanté ce substitut entraîne, à long terme, une prolifération anormale de cellules musculaires lisses (hyperplasie intimale) au niveau des sites d'anastomose et ainsi une occlusion progressive de la lumière du substitut [8, 197-199]. D'ailleurs, les complications dues à l'hyperplasie intimale sont observées lors de l'implantation des allogreffes issues des banques vasculaires [19, 200]. En effet, lors de la cryocongélation, des dommages de la paroi vasculaire accompagnés d'une diminution des performances biomécaniques ont été démontrés [176, 201]. Néanmoins, ces résultats restent controversés [18, 182, 202] et l'influence de la cryoconservation sur les propriétés biomécaniques des artères n'est pas encore élucidée [202].

Au cours de cette étude, nous avons comparé les propriétés biomécaniques à travers l'élasticité de la matrice, des AOF, AOCD et AOCD-PME. Pour cela, nous avons soumis les artères à des pressions allant jusqu'à 230 mmHg. La réponse des artères aux variations de pression montre un comportement non linéaire des artères (Figure 39, page 102). Plusieurs études ont rapporté que les propriétés viscoélastiques (contenus en collagène / élastine) de la paroi artérielle sont responsables de ce comportement [17, 202, 201]. L'évaluation de l'élasticité de la paroi artérielle a montré que, pour une même pression, le pourcentage de déformation de l'AOCD est plus faible que celui des autres artères. De plus, pour la même pression, les artères (AOF et AOCD-PME) présentent un pourcentage de déformation proche (Figure 10). Le calcul de la compliance (selon la méthode de Conklin *et al.* [196]) des artères étudiées, à des pressions physiologiques (80 à 150 mmHg), montre une diminution significative de la compliance pour l'AOCD (Tableau 9) comparée au témoin. Ces différences (déformation et compliance) peuvent être dues à des dommages engendrés par la cryoconservation, et plus précisément au niveau des fibres d'élastine (mise en évidence par la coloration Weighert dans les chapitres précédents (*cf.* Figure 34). En effet, à de basses pressions (< 100 mmHg), la dilatation de la paroi artérielle est contrôlée par les fibres d'élastine alors qu'à de hautes pressions (> 100 mmHg), ce sont les fibres non élastiques de collagène et les cellules musculaires lisses qui contrôlent la déformation [204, 205].

Lors du dépôt du film MPE, les artères récupèrent leur élasticité. Cette restauration intéressante quoiqu'inattendue pourrait s'expliquer par la formation de liaisons de faibles énergies ou création de dipôles qui s'établissent entre la chaîne des polyélectrolytes utilisés lors de la construction du film et les composants de la matrice artérielle (collagène et élastine). En effet, dans le chapitre précédent, nous avions observé une pénétration des polyélectrolytes au niveau de la paroi artérielle (*cf.* Figure 38A). Ces polyélectrolytes, grâce à un excès de charges, pourraient créer des liaisons avec le collagène et/ou l'élastine. Ces liaisons renforceraient la cohésion des éléments constitutifs de la matrice et modifieraient ainsi les propriétés viscoélastiques de l'artère. Compte tenu de l'autofluorescence du film dans des longueurs d'onde proches de celles du réseau d'élastine, aucune mesure quantitative de la dégradation de l'élastine n'a pu être réalisée. Cependant une nette diminution de l'autofluorescence après cryoconservation des carotides de porc a été observée [206]. D'autres tests complémentaires (résistance à la pression de rupture, élasticité…) devront être effectués pour consolider ces résultats [9, 92, 195, 207].

III. 3. CONCLUSION

La construction du film multicouche de polyélectrolytes dans la lumière des artères cryoconservées et désendothélialisées a permis d'améliorer leurs propriétés biomécaniques. Ce phénomène est très favorable aux substituts que nous développons car une bonne compliance de la matrice vasculaire est un facteur majeur pour le succès de la greffe vasculaire. Cependant, il n'est pas le seul. Un autre facteur est la nécessité de rendre la lumière non thrombogénique qui évite l'occlusion précoce du substitut. Deux possibilités s'offrent à nous : une première consiste à ensemencer des cellules endothéliales sur des films finissant par une charge positive. Ainsi, des études portant sur l'adhésion et la rétention de ces cellules dans la lumière des artères traitées par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH doivent être effectuées. Une seconde propose de recouvrir la paroi interne uniquement par le film MPE terminé par une charge négative et d'en évaluer *in vivo* l'anti-thrombogénicité.

IV. EVALUATION DE L'ENDOTHELIALISATION DES ARTERES

Les cellules endothéliales issues du cordon ombilical humain (HUVEC) ont été amplifiées jusqu'au deuxième passage puis ensemencées dans les artères, à une densité de 1×10^5 cellules/cm^2. Nous avons d'abord mis en évidence l'adhésion des cellules, procédé à leur identification puis observé leur étalement et évalué leur résistance au cisaillement.

IV. 1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

☞ **Adhésion des cellules sur la surface interne des artères ombilicales**

L'adhésion des HUVEC et la formation d'un néo-endothélium à la surface interne des AOCD et AOCD-MPE sont évaluées par des techniques histologiques. Nous pouvons apercevoir la formation d'une monocouche de cellules dans la lumière des AOCD et AOCD-PME après une semaine de culture (Figure 40) sans qu'il y ait de différence entre la surface témoin et la surface étudiée.

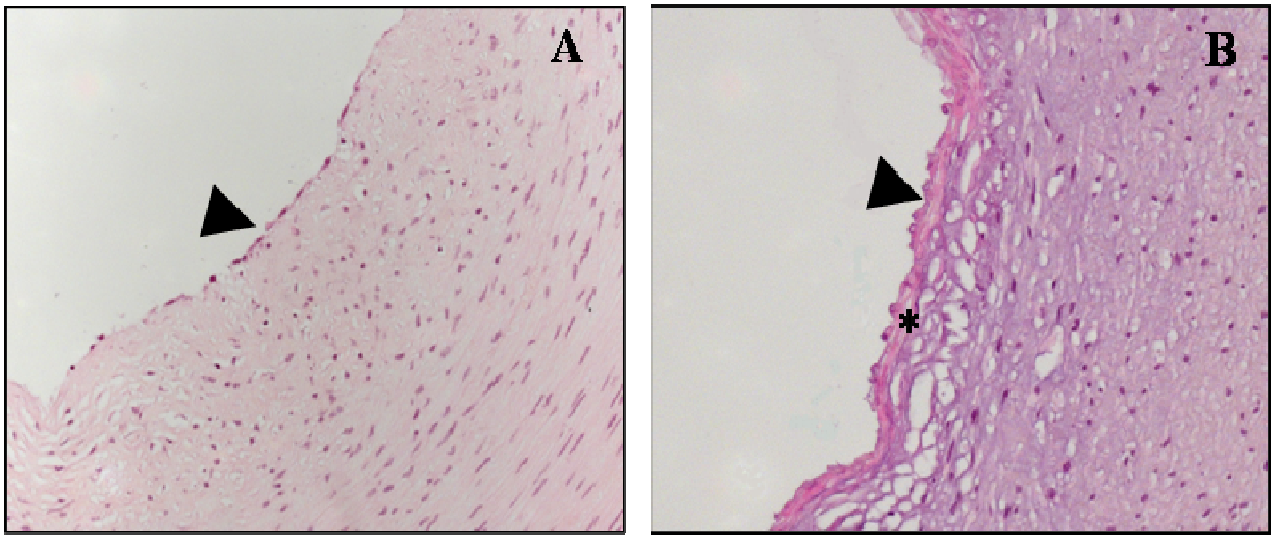


Figure 40 : ***Coupes histologiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées*** *(A)* ***ou traitées*** *(B)* ***par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$*** *; montrent la formation d'une monocouche de cellules dans la lumière des artères (Flèche noire). Coloration hématoxyline-éosine-safran, grossissement × 400 (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombre d'artères=6. Asterisque : Film multicouche de polyélectrolytes.*

☞ **Phénotype des cellules adhérentes**

Le maintien du phénotype endothélial des cellules ensemencées dans la lumière des artères recouvertes ou non par le film PAH-(PSS-PAH)$_3$ est évaluée à travers l'expression des marqueurs spécifiques (PECAM-1 et vWF) après une semaine de culture *in vitro*.

L'observation des coupes après révélation immunohistochimique des PECAM-1 montre que les cellules formant la monocouche dans la lumière des artères, AOCD et AOCD-PME sont des cellules endothéliales. De même, nous avons constaté que les HUVEC ne pénètrent pas au sein de la paroi artérielle (Figure 41).

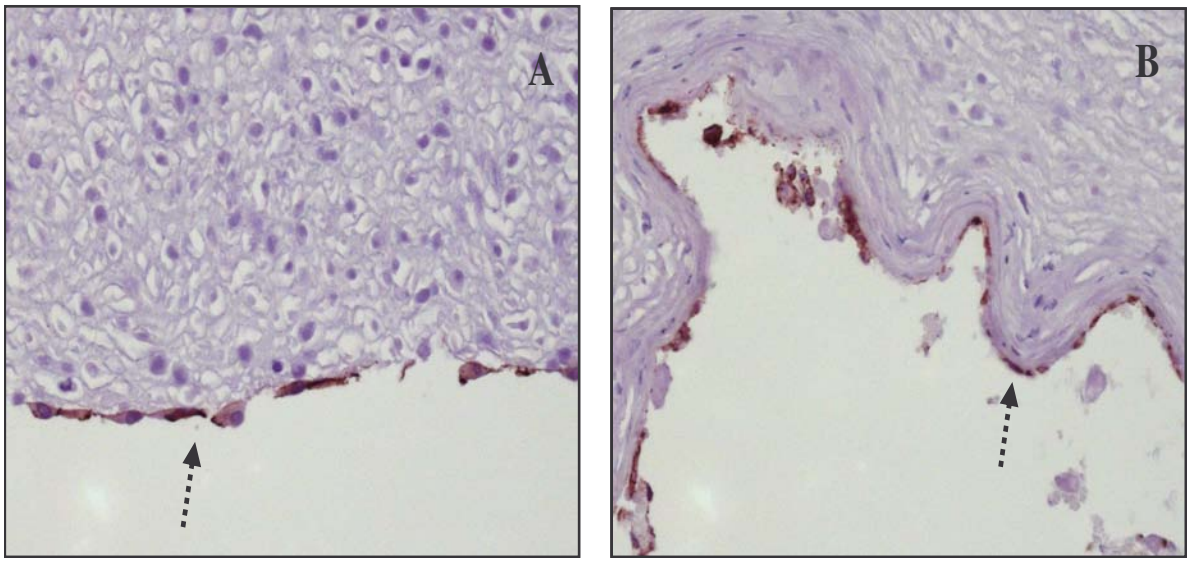


Figure 41 : ***Coupes immunohistochimiques d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées*** *(A)* ***ou traitées*** *(B)* ***par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$*** *; montrent la formation d'un néo-endothélium dans la lumière des artères (Flèche). Révélation enzymatique par une peroxydase et une contre coloration nucléaire à l'hématoxyline, grossissement× 400, (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombre d'artères=6.*

La figure 42 obtenue par CLMS montre l'expression du vWF par les HUVEC ensemencées dans la lumière des artères AOCD et AOCD-PME. Elle confirme l'endothélialisation de la lumière de ces artères.

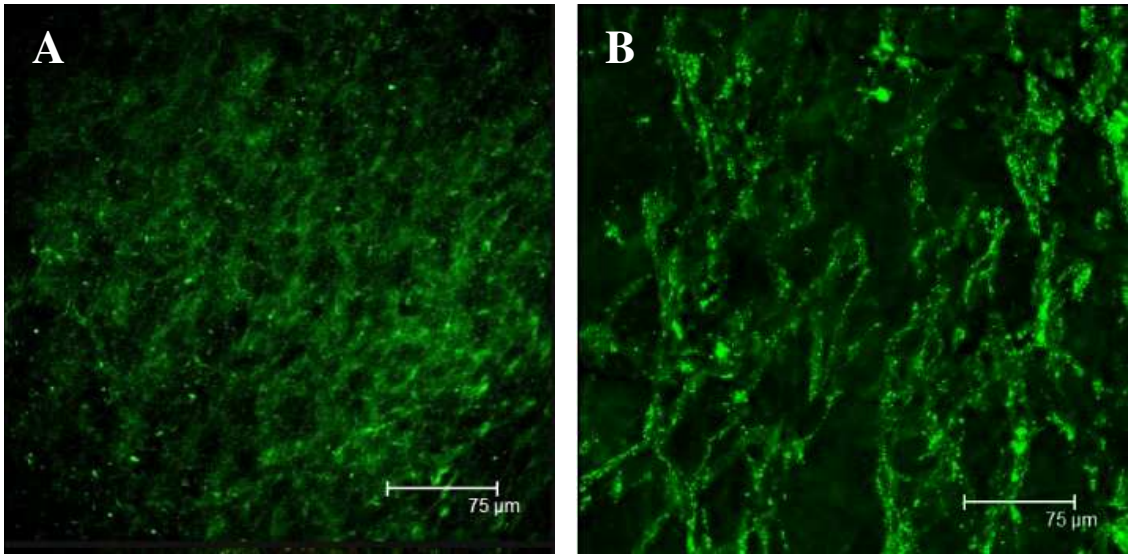


Figure 42 : ***Expression du facteur von Willebrand par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées*** *(A)* ***ou traitées*** *(B)* ***par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$.*** *Les cellules ensemencées dans la lumière des artères traitées ou non parle film expriment le facteur de vWF. Marquage du facteur vWF est indirect, la couleur verte correspond à la fluorescence de la molécule fluorescente (Alexa 488®). Microscopie confocale à balayage laser, Objectif × 40, ON 0,8 (Leica, Germany) ; nombre d'artères=3.*

☞ **Etalement des cellules endothéliales**

La vérification du bon étalement des cellules dans la lumière des artères endothélialisées a été effectuée par des observations au MEB. La figure 43 montre la forme arrondie et volumineuse des cellules endothéliales ensemencées sur la surface interne des AOCD (Figure 43A). Par contre, les cellules adhérentes sur la surface interne des AOCD-PME apparaissent bien étalées (Figure 43B, insert) et leur morphologie est semblable à celle observée pour les artères fraîches (*cf.* Figure 32A).

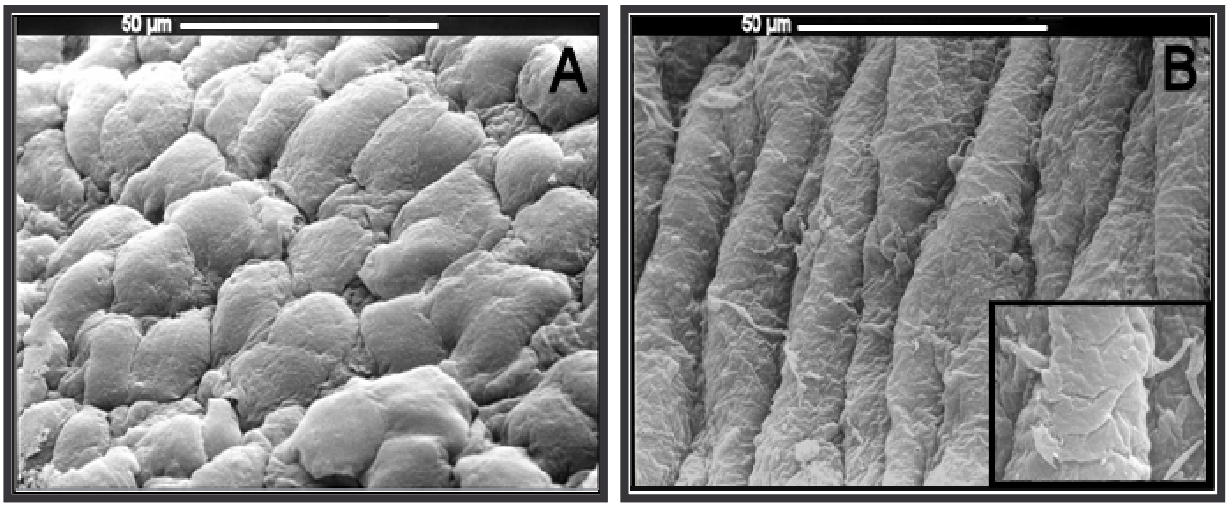


Figure 43 : ***Topologie de la lumière d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées*** *(A)* ***ou traitées*** *(B)* ***par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$*** *; montre des cellules bien étalées à la surface des artères recouvertes par le film, alors qu'en absence du film, elles apparaissent plus volumineuses et moins bien étalées. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre d'artères=6.*

☞ **Rétention des cellules endothéliales après cisaillement**

Après une semaine de culture, les HUVEC ensemencées dans la lumière des artères traitées ou non, sont soumises pendant une heure à une contrainte de cisaillement de 1 Pa. La rétention cellulaire est évaluée par MEB, et par microscopie confocale à travers l'expression du récepteur PECAM-1 et du facteur vWF.

L'observation au MEB de la lumière des artères ayant subi la contrainte de cisaillement a conduit aux remarques suivantes :

- Pour les artères AOCD, nous constatons que les cellules ensemencées se sont détachées de la surface, révélant une faible résistance au cisaillement (Figure 44A).
- Pour les artères AOCD-PME, nous remarquons l'absence des délimitations des contours cellulaires. Cette observation ne nous permet pas d'affirmer avec certitude le maintien des cellules après cisaillement (Figure 44B).

Nous avons suivi nos investigations en comparant les inserts des figures 37, 43B et 44B. Cette comparaison a montré des différences morphologiques importantes. En effet les fibres observées sur la figure 37 ne sont plus visualisées sur les figures 43B et 44B. La comparaison montre que les observations au MEB ne permettent pas de vérifier avec certitude la présence de cellules. Elles permettent cependant d'avancer l'hypothèse selon laquelle les cellules présentes sont tellement bien étalées qu'elles deviennent indiscernables.

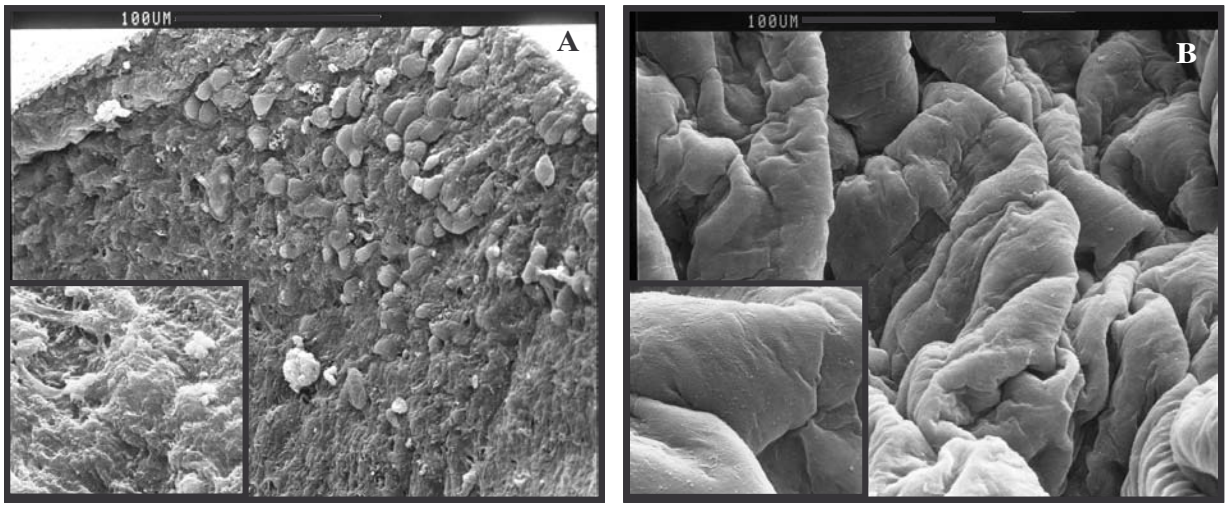


Figure 44 : ***Topologie de la lumière d'artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées*** *(A)* ***ou traitées*** *(B)* ***par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$ après cisaillement ;*** *montre qu'en absence de film, les cellules se détachent. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre d'artères=6.*

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons procédé à des marquages spécifiques à l'endothélium vasculaire (PECAM-1 et vWF) sur des artères maintenues dans des conditions statiques (sans cisaillement, témoin) et soumises à une contrainte de cisaillement. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 45 et 46.

Les images de la figure 45A et 45C ont été obtenues sur des coupes transversales d'artères AOCD et AOCD- PME endothélialisées, non soumises au flux. Elles révèlent une analogie dans l'expression du PECAM-1 montrant ainsi la présence de cellules endothéliales dans la lumière de ces artères. Par contre, l'effet du cisaillement se différencie entre les deux types d'artères. En effet, nous constatons une nette diminution de la fluorescence dans le cas des artères AOCD (Figure 45B), correspondant à un détachement des cellules. La faible fluorescence observée correspond à la présence de débris de cellules en cours de détachement.

Dans le cas des artères AOCD-PME endothélialisées, la fluorescence est observée sur toute la section de l'artère (Figure 45D), montrant ainsi la forte rétention des cellules endothéliales dans la lumière de ces artères.

La figure 46 représente l'expression du facteur vWF sur des coupes longitudinales, dans les mêmes conditions d'observation que dans le paragraphe précédent.

Les figures 46A et 46C représentent des artères AOCD et AOCD- PME endothélialisées, non soumises au flux. Elles révèlent une analogie dans l'expression du facteur vWF montrant ainsi la présence de cellules endothéliales dans la lumière de ces artères. Par contre, l'effet du cisaillement se différencie entre les deux types d'artères (figures 46B et 46D). En effet, nous constatons une nette diminution de la fluorescence du vWF dans la lumière des artères AOCD, correspondant à un détachement des cellules endothéliales. La faible fluorescence du vWF observée correspond à la présence de débris de cellules en cours de détachement. Dans le cas des artères AOCD-PME endothélialisées, la fluorescence est observée sur toute la lumière de l'artère, prouvant la forte rétention des cellules endothéliales.

Toutes ces observations (confocale et MEB) nous montrent qu'en absence de film, un cisaillement à 1 Pa entraîne un détachement de cellules, les « quelques » cellules positives au PECAM-1 et au vWF sont des cellules en cours de détachement ou alors des débris cellulaires. En présence de film, la détection de cellules endothéliales (PECAM-1 et vWF) et l'absence des contours de cellules montrent une bonne adhésion, une bonne rétention et un bon étalement des cellules endothéliales sur le film.

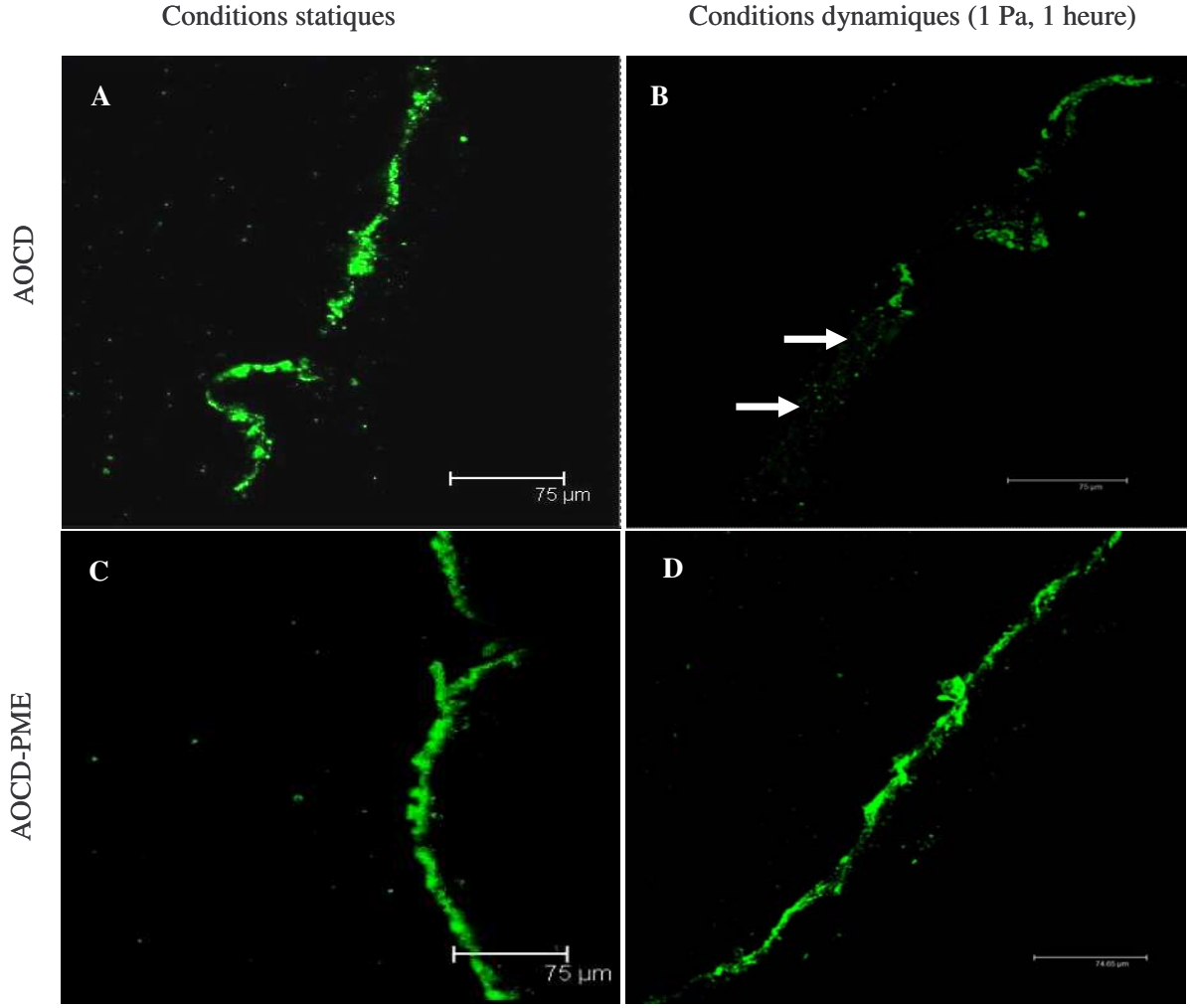


Figure 45 : ***Expression des récepteurs membranaires PECAM-1 par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$ avant et après cisaillement*** *. A : l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée maintenue en statique, B : l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée soumise au flux. Ces figures montrent un détachement (Flèche) de cellules dans la lumière des artères non recouverte par le film multicouche de polyélectrolytes. C : l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée traitée par un film multicouche de polyélectrolytes, maintenue en statique, D : l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée traitée par un film multicouche de polyélectrolytes, soumise au flux. PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecules, AOCD : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée, AOCD-MPE : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée et dont la lumière est traitée par un film multicouche de polyélectrolytes. Marquage du facteur PECAM-1 est indirect, la couleur verte correspond à la fluorescence de la molécule fluorescente (Alexa 488®). Microscopie confocale à balayage laser, Objectif × 40, ON 0,8 (Leica, Germany) ; nombre d'artères=6.*

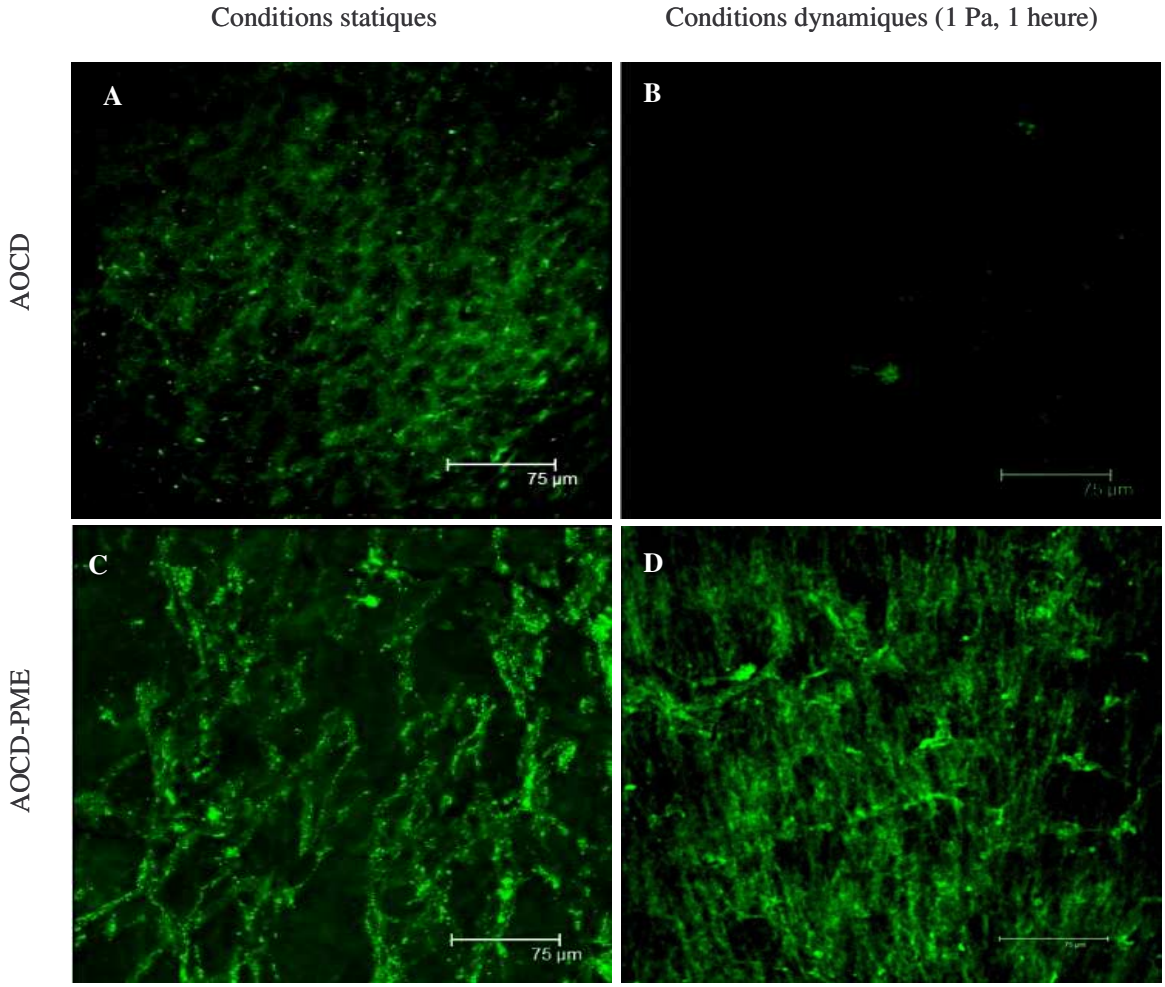


Figure 46 : ***Expression du facteur von Willebrand par les cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des artères ombilicales cryoconservées désendothélialisées non traitées ou traitées ou traitées par un film PAH-(PSS-PAH)$_3$ avant et après cisaillement***. *A : l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée maintenue en statique, B : l'artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée soumise au flux. Ces figures montrent une diminution de la fluorescence, signe d'un détachement de cellules dans la lumière des artères, non recouvertes par le film multicouche de polyélectrolytes. C : l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée traitée par un film multicouche de polyélectrolytes, maintenue en statique, D : l'artère ombilicale cryoconservée, désendothélialisée traitée par un film multicouche de polyélectrolytes, soumise au flux. vWF :von Willebrand factor, AOCD : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée, AOCD-MPE : artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée et dont la lumière est traitée par un film multicouche de polyélectrolytes. Marquage du facteur vWF est indirect, la couleur verte correspond à la fluorescence de la molécule fluorescente (Alexa 488®). Microscopie confocale à balayage laser, Objectif × 40, ON 0,8 (Leica, Germany) ; nombre d'artères=6.*

IV. 2. DISCUSSION

L'effet bénéfique du recouvrement de la surface luminale de l'AOCD par le film MPE sur les propriétés biomécaniques des artères ne permet pas à lui seul d'assurer le bon fonctionnement de la greffe vasculaire. D'autres paramètres doivent être pris en considération notamment l'endothélialisation des artères. En effet, l'absence totale ou même le recouvrement partiel par des CE de la surface luminale des prothèses peut conduire à une thrombose.

L'endothélium vasculaire participe à l'intégrité structurale des vaisseaux sanguins, en formant une barrière à perméabilité sélective et thromborésistante entre le sang et la paroi artérielle. Il contrôle l'activation, l'adhérence et l'agrégation des plaquettes [208], l'adhérence des leucocytes [209], la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses [210, 211].

L'ensemencement de cellules endothéliales dans la lumière des prothèses vasculaires de faible diamètre (< 6 mm) a été proposé pour produire un endothélium et améliorer ainsi l'hémocompatibilité de la surface luminale [73, 136, 212]. Des études faisant appel à des molécules protéiques comme le VEGF, qui stimulent la migration des cellules endothéliales, ont été récemment publiées [214, 215]. Ces études ont montré que l'application exclusive de cette approche sans faire appel à l'ensemencement préalable de la prothèse par des CE induit un risque de thrombose précose sur les surfaces luminales non recouvertes et donc thrombogènes. L'endothélialisation des prothèses *in vivo* est un processus lent. Aussi, serait il plus judicieux d'ensemencer au préalable la prothèse pour diminuer ce risque.

Les travaux réalisés dans ce domaine proposent différentes possibilités en particulier l'application de molécules angiogéniques ou de composants de la matrice extracellulaire pour améliorer l'adhésion, la croissance et la rétention cellulaire dans la lumière des substituts vasculaire [60, 61, 108]. Malgré toutes ces tentatives, un détachement des cellules après implantation est observé. Par ailleurs seule la fibrine (appelée également colle biologique) a pu être exploitée cliniquement, mais les résultats n'ont guère été satisfaisants. Nous observons une occlusion au bout de 2 ans, dûe à la dégradation de la fibrine.

Nous nous sommes donc proposés d'évaluer l'efficience de l'adhésion et de la rétention de cellules endothéliales dans la lumière des artères recouvertes par un film multicouche de polyélectrolytes afin d'obtenir obtenir des substituts non thrombogène. En

utilisant une densité cellulaire initiale de 1×10^5 cellules/cm^2 pendant une semaine de culture, nous avons observé, à l'aide des coupes histologiques, un important recouvrement de la surface luminale des artères par les cellules endothéliales. Cependant cette observation ne permet pas d'affirmer que le recouvrement est intégral. Nous avons tenté de le vérifier à l'aide d'une technique de fluorescence en réalisant un marquage des CE avant ensemencement avec une molécule fluorescente (Hoechst vital). Cette technique n'a pas permis de déterminer la quantité de cellules ayant effectivement adhéré et proliféré à la surface interne des artères car le marqueur a diffusé à l'intérieur de la paroi vasculaire. D'autres techniques faisant appel à une transfection avec plasmide GFP ou « *cell tracker probes* » ou à des marqueurs radioactifs pourraient être utilisées pour confirmer l'intégralité du recouvrement.

L'adhérence des cellules endothéliales peut conduire à leur différenciation et à la perte du phénotype cellulaire qui peuvent être influencées par la nature du substrat [216, 217]. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier qu'aucune différenciation ni perte du phénotype endothélial ne se produisaient dans la lumière des artères traitées ou non par le MPE. Nous avons effectué cette vérification par l'observation des marqueurs endothéliaux par immunohistochimie et microscopie confocale. Les HUVEC adhérentes dans la lumière de nos artères expriment les marqueurs phénotypiques (PECAM-1 et facteur vWF) montrant qu'il ne se produit pas de différenciation.

La morphologie cellulaire doit aussi être prise en considération. L'observation au MEB de la lumière des artères endothélialisées montre une différence de morphologie des CE selon le traitement appliqué aux deux artères (AOCD et AOCD-PME). En effet, les HUVEC ensemencées sur le film multicouche de polyélectrolytes apparaissent bien étalées (Figure 43B), alors que dans les artères non traitées, elles présentent une forme arrondie (Figure 43A). Cette morphologie ronde a aussi été observée pour des cellules endothéliales ensemencées dans la lumière des allogreffes décellularisées [218] et dans des matrices de la sous muqueuse intestinale [219]. Après cisaillement, nous avons observé un détachement de toutes les cellules présentant un aspect rond (Figure 44A). Cette observation suggère qu'une morphologie cellulaire ronde serait le signe d'une adhésion médiocre, alors qu'un bon étalement (analogue à celui des artères fraîches) assure une résistance au flux sanguin. En plus de la bonne adhésion des cellules, l'intégrité de la « colle » déposée sur la matrice pour favoriser l'adhésion ne doit subir aucune dégradation. En effet, le problème majeure de la colle biologique est sa dégradation *in vivo* [118]. Le film multicouche construit à partir de PAH et

de PSS présente l'avantage d'être très stable. L'ensemencement des CE sur du film marqué à la rhodamine a permis, après deux semaines de culture, de constater qu'aucune trace de rhodamine n'apparaît dans les cellules.

Le mécanisme permettant aux cellules d'adhérer sur les films multicouche de polyélectrolytes reste encore inconnu. Des interactions non spécifiques de type électrostatique pourraient intervenir dans l'adhésion des cellules sur le film PSS/PAH. En effet, ces interactions sont impliquées en grande partie dans la construction des films de polyélectrolytes [152] et assurent une nette amélioration de l'attachement des cellules endothéliales sur d'autres surfaces [172, 220]. Il semblerait aussi que l'élasticité du support joue un rôle très important dans l'adhésion [221]. En ce qui nous concerne, le traitement de la lumière des artères par le film multicouche de polyélectrolytes permet au vaisseau de retrouver une élasticité comparable à celle des artères natives ; cette élasticité pourrait influencer très fortement l'adhésion et l'étalement des cellules. D'ailleurs, des études portant sur les interactions CE/ Film et sur l'expression des intégrines de la famille β1, principaux récepteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire, ont permis de mieux saisir le rôle de PME dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Thèse de Cédric Boura). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence de l'expression des intérgrines β1 entre les divers supports étudiés (film PSS/PAH *versus* fibronectine) [172]. Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle des interactions autres que celles engendrées par les intégrines β1 interviendraient dans l'adhésion des cellules sur le film.

IV. 3. CONCLUSION

Les films multicouche de polyélectrolytes construits à partir de l'hydrocloride de polyallylamine et du poly (sodium-4-styrène sulfonate) sur la surface interne des artères favorisent la formation d'un néo-endothélium étalé et résistant aux contraintes de cisaillement. La modification de la surface interne des artères par dépôt d'un film polymère et son endothélialisation ouvre de larges perspectives pour l'élaboration de substituts vasculaires endothélialisés.

Afin de valider le dépôt et le comportement du film MPE sur la paroi des artères ombilicales, en particulier sous l'action du sang circulant et de la résistance aux contraintes vasculaires physiologiques il est nécessaire d'effectuer une évaluation *in vivo* sur plusieurs semaines.

V. EVALUATION *IN VIVO,* CHEZ LE LAPIN, DE L'ANTITHROMBOGENICITE DES ARTERES TRAITEES PAR UN FILM MULTICOUCHE DE POLYELECTROLYTE

La perméabilité, l'évolution du diamètre ainsi que du flux, réalisés avec des artères ombilicales humaines cryoconservées, désendothélialisées et des carotides de lapin cryoconservées, désendothélialisées, avec (CLCD-MPE) ou sans traitement (CLCD) par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$, ont fait objet d'un suivi régulier par une investigation non invasive par une technique d'Echo-Doppler. Les évaluations histologiques et en microscopie électronique à balayage sur des greffons prélevés ont été effectuées sur deux séries. La première après une semaine d'implantation et la seconde après douze semaines.

V. 1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

☞ **Suivi du substitut par écho- Doppler**

La figure 47 donnée à titre d'exemple, montre les tracés obtenus à l'Echo-Doppler après 3 et 12 semaines après implantation.

Après une semaine d'implantation, sur les artères non traitées aucun flux sanguin n'a été détecté ce qui laisse penser à une occlusion. Par contre sur les artères traitées par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$, les mesures de débits réalisés à des intervalles de temps réguliers ont montré qu'il n'y avait pas de variation notable de débits, suggérant l'absence d'occlusion vasculaire. La mesure du diamètre interne des artères ne montre aucun signe d'anévrisme ni de dilatation sur les fragments d'artères étudiées.

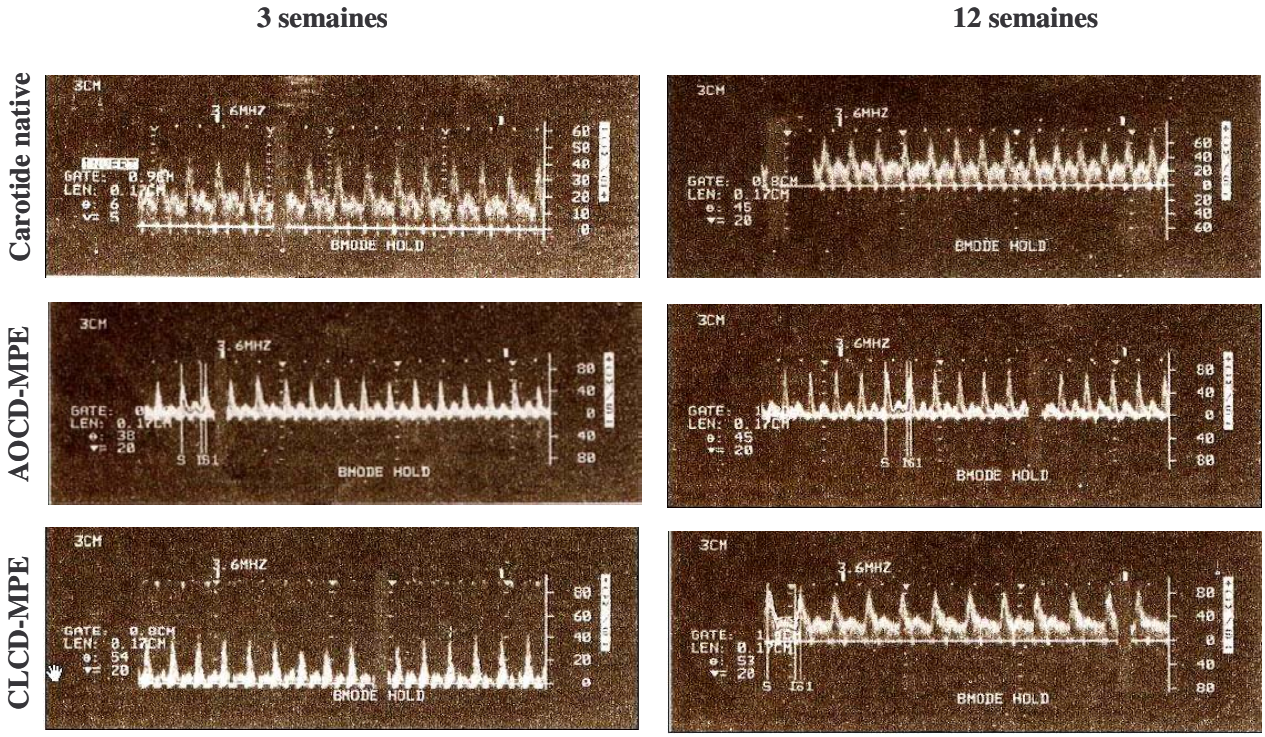


Figure 47 : ***Illustration des tracés obtenus par Echo-Doppler après trois et douze semaines d'implantation.*** *AOCD-MPE : artère ombilicale humaine cryoconservée, désendothélialisée traitée par le film* $(PAH\text{-}PSS)_3$*, CLCD-MPE : carotide de lapin cryoconservée, désendothélialisée traitée par le film* $(PAH\text{-}PSS)_3$ *;* nombre de lapins = 6.

☞ **Observation des artères par microscopie électronique à balayage**

Une puis douze semaines après implantation, les artères sont prélevées et observées au microscope électronique à balayage. Ces examens montrent, qu'en absence de film et après une semaine d'implantation, la formation de thrombus entraînant l'obstruction totale de la lumière des artères (AOCD et CLCD) alors que les artères traitées par le film restent perméables (Figure 48). Cette perméabilité subsiste douze semaines après implantation (Figure 48). Ces observations suggèrent que le film $(PAH\text{-}PSS)_3$ finissant par une charge négative possède des propriétés anti-thrombogèniques.

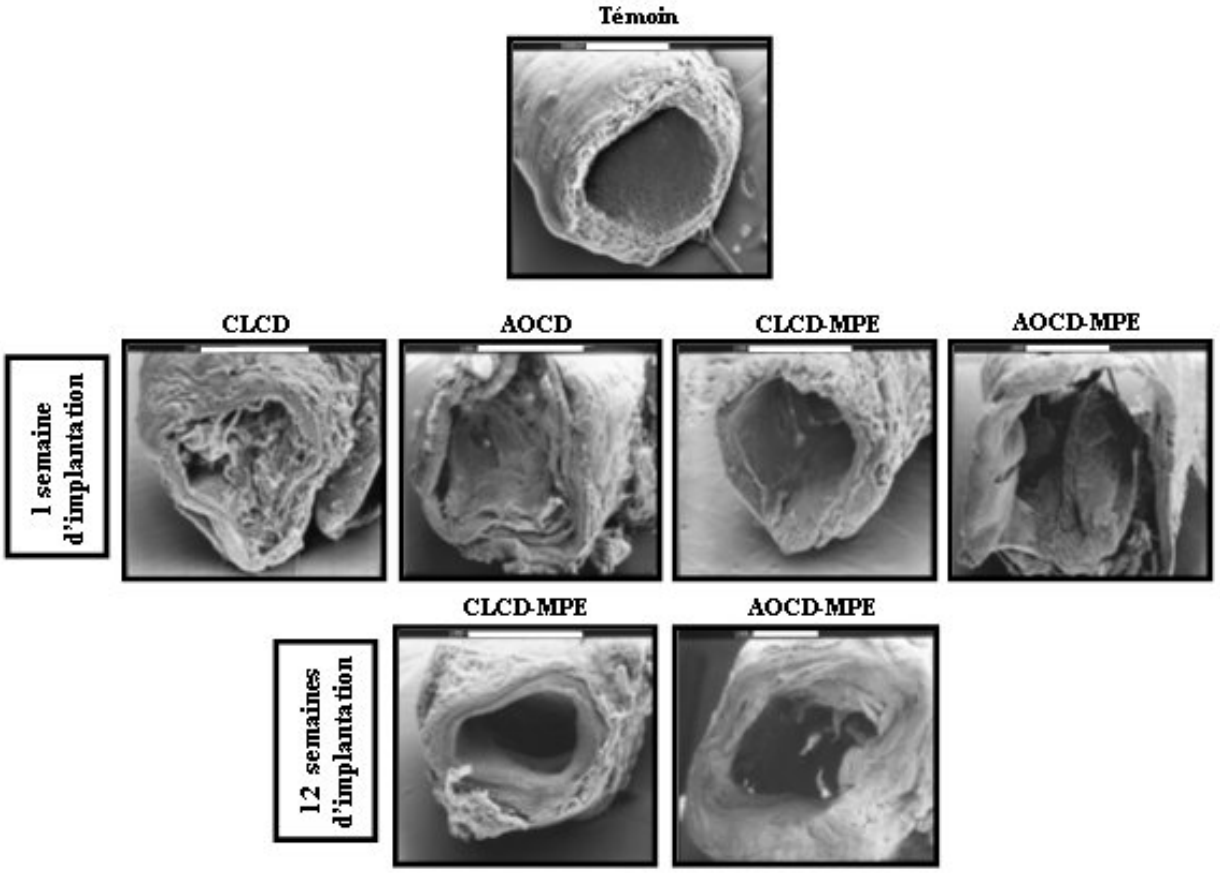


Figure 48 : ***Visualisation des artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après une et douze semaine(s) d'implantation ;*** *la lumière des artères non traitées par le film est obstruée après seulement une semaine d'implantation. Les artères traitées restent perméables après 12 semaines d'implantation. AOCD, artère ombilicale humaine cryoconservée, désendothélialisée, AOCD-MPE, artère ombilicale humaine cryoconservée, désendothélialisée traitée par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$ CLCD : carotide de lapin cryoconservée, désendothélialisée, CLCD-MPE : carotide de lapin cryoconservée, désendothélialisée traitée par le film $(PAH\text{-}PSS)_3$. Microscope électronique à balayage, (Cambridge Instruments Stéreoscan S 240, UK) à 30 kV ; nombre de lapins = 6.*

☞ **Examen des artères par histologie**

Les examens histologiques ont été entrepris pour confirmer l'anti thrombogénicité du film et d'évaluer l'état histologique des artères après une puis douze semaines d'implantation. Après une semaine d'implantation, les coupes histologiques colorées à l'H&S confirment la formation du thrombus dans la lumière des artères non traitées et l'absence de thrombose pour les artères traitées avec le film (Figure 49). Par ailleurs, la coloration rose du film $(PAH\text{-}PSS)_3$ apparaissant sur la figure 49A et 49B indique une bonne stabilité de ce dernier. Nous constatons une perte importante de cellules musculaires lisses au niveau de la média. Cette perte entraîne une nécrose et une dégénérescence de la paroi artérielle. Nous observons également la formation d'un tissu périvasculaire avec une infiltration de cellules inflammatoire au niveau de l'adventice. Cependant aucune inflammation au niveau de l'intima n'est constatée.

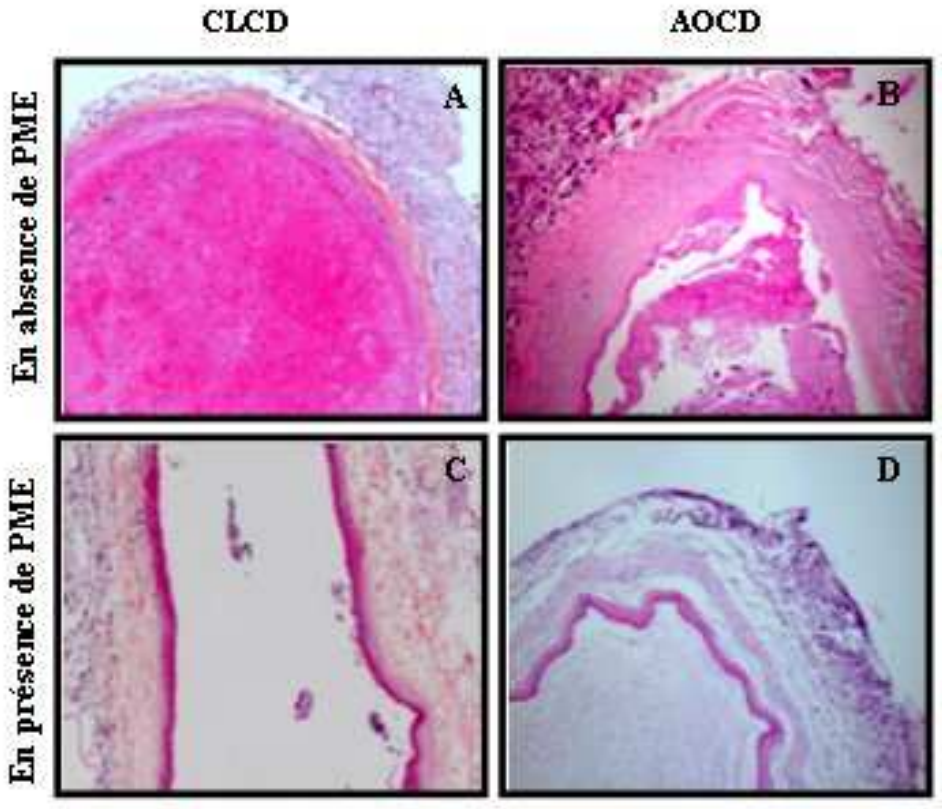


Figure 49 : ***Coupes histologiques d'artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film $(PAH\text{-}PSS)_3$ après une semaine d'implantation.*** *La lumière des artères non traitées par le film est obstruée après une semaine d'implantation. AOCD, artère ombilicale humaine cryoconservée, désendothélialisée, CLCD : carotide de lapin cryoconservée, désendothélialisée, MPE :Film multicouche de polyélectrolytes. (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon). Coloration Hématoxyline-éosine-safran, grossissement × 200 ; nombre de lapins = 6.*

Après douze semaines d'implantation, les artères traitées par le film restent toujours perméables. Nous assistons à une résorption de l'inflammation au niveau de l'adventice et la réapparition des cellules au niveau de la média (Figure 50A et 50B). Contrairement aux observations effectuées après une semaine, aucune coloration du film n'est observée. La réaction de von Kossa ne montre pas la présence de précipité d'argent noir (Figure 50C et 50D) ce qui suggère l'absence de calcification de la paroi artèrielle. L'identification des cellules de la média à travers l'expression de l'α SMA par immunohistochimie montre la présence de quelque cellules positives. Ce qui signifie un début de recolonisation de la média par les cellules musculaires lisses (Figure 50E et 50F).

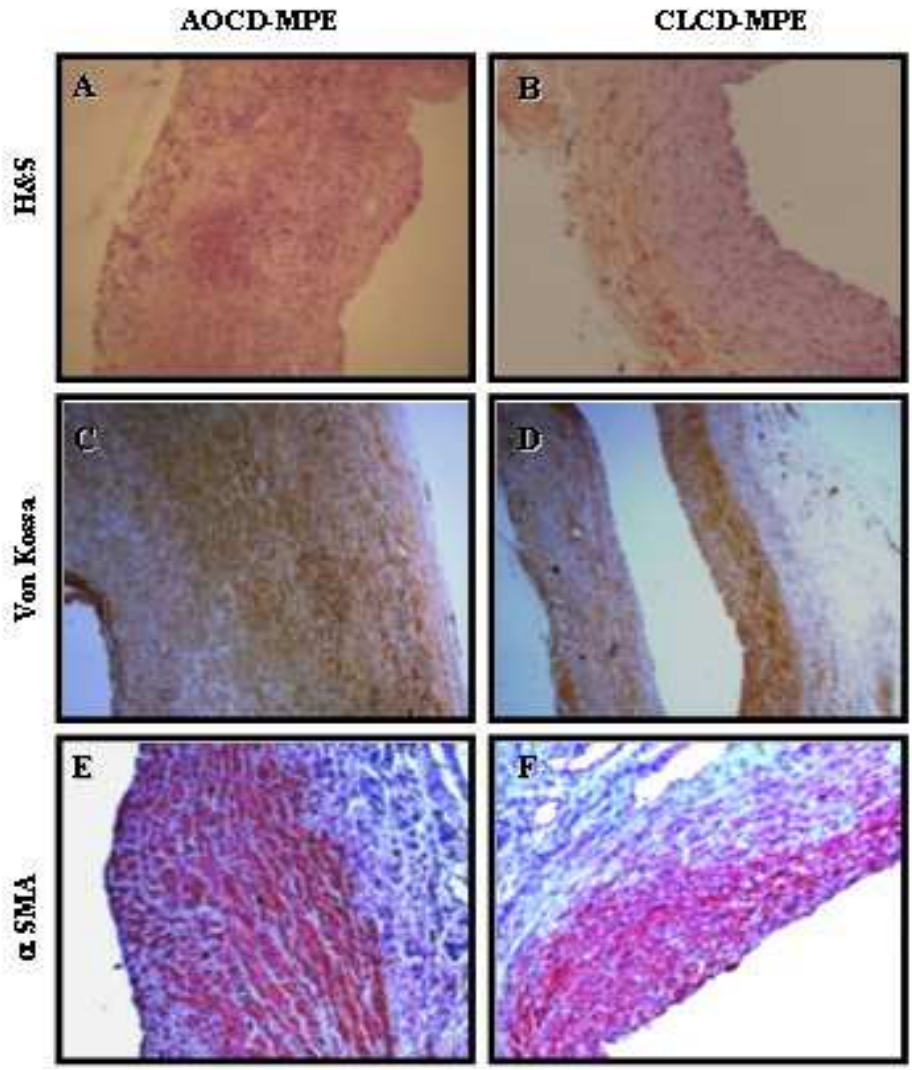


Figure 50 : ***Coupes histologiques d'artères ombilicales et des carotides cryoconservées désendothélialisées traitées ou non par un film (PAH-PSS)$_3$ après douze semaines d'implantation ;*** *les artères traitées restent perméables, avec une recolonisation de la média par les cellules musculaires lisses. De plus aucun dépôt de calcium au niveau de la paroi n'est observé. Grossissement × 200. (Microscope inversé Olympus IX 50, Japon) ; nombres de lapins = 6.*

V. 2. DISCUSSION

L'évaluation *in vivo*, du comportement non thrombogénique des substituts vasculaires ont concerné des substituts traitées selon diverses approches. Celles-ci ont été largement décrites par Cardon et Conklin [196, 222]. La plus répandue consiste à recouvrir la surface interne des prothèses avec de la colle biologique dans le but de développer une surface non thrombogénique [222, 223]. La fibrine (issue du fibrinogène sou l'action de la thrombine en présence et de chlorure de calcium) tire ses avantages de son origine (autologue), de son pouvoir à réduire l'adhésion plaquettaire dans la lumière des prothèses vasculaires, et de permettre la migration cellulaire ; ces dernières synthétisent alors de la matrice extracellulaire (collagène de type I, de type IV, …) [224, 225]. La fibrine présente cependant l'inconvénient de se dégrader au cours de l'implantation. En effet, la présence de thrombine (exogène), protéine décisive dans la cascade de coagulation, favorise la formation de thrombus [226-228]. Ye *et al.* [227] ont observé chez les ovins lors de pontages coronariens effectués avec du Dacron® dont la lumière est préalablement recouverte avec de la fibrine, que la totalité des pontages s'obstruent après 14 jours d'implantation. Pour palier cet inconvénient, Hasegawa *et al*. [224] ont inactivé la thrombine par la chaleur (65°C). Ils ont constaté qu'*in vitro* l'adhésion des plaquettes est réduite, mais qu'*in vivo* (chez le lapin) il y a formation de thrombus après deux mois d'implantation.

Une autre approche pour développer une surface anti-thrombogénique consiste à recouvrir la surface interne de l'artère et des endoprothèses vasculaires avec le film multicouche construit à partir de chitosan et d'acide hyluronique et dont la dernière couche porte des charges négatives. L'évaluation *in vitro* du recouvrement a montré une réduction de l'adhésion plaquettaire et leucocytaire sur ces films [168, 169, 192]. Ces résultats importants ont ouvert une nouvelle voie pour le développement d'une surface anti-thrombogènique, cependant à notre connaissance aucune évaluation chez l'animal n'a été effectuée à ce jour.

Dans cette étude, nous avons entrepris de soumettre les artères ombilicales traitées par nos films à une évaluation *in vivo*. Il nous a paru plus judicieux d'opérer cette évaluation sur le lapin qui est connu pour être un excellent modèle de thrombose. Nous avons choisi d'adopter les conditions d'implantation les plus sévères : une anastomose en position termino – latérale et l'administration d'une dose unique d'héparine lors de l'implantation. L'**Echo-Doppler**, technique non invasive, utilisée pour évaluer la perméabilité des greffons vasculaires, présente l'avantage de ne pas recourir à l'anesthésie car cette dernière peut

modifier les paramètres hémodynamiques du sang (viscosité). L'évaluation des substituts à l'Echo-doppler a montré que les substituts vasculaires traités par le film polymère sont restés perméables pendant toute la durée de l'étude. Cette technique présente cependant l'inconvénient de ne pas être trés reproductible. En effet, la position de la sonde n'étant pas toujours identique et l'état éveillé du lapin (stress de l'animal), nous permettent d'avoir des résultats approximatifs du flux sanguin et du diamètre interne des substituts implanté. Les valeurs du débit sanguin obtenues suggèrent les deux remarques suivantes : (*i*) la faible variation du flux observée au cours du temps montre une bonne perméabilité des substituts, (*ii*) ces faibles variations sont du même ordre que celles observées sur l'artère native (témoin), ce qui montrent qu'il n'y a eu aucune augmentation de la vélocité sanguine, précurseur d'une occlusion. De plus, aucune augmentation anormale du diamètre n'a été observée suggérant l'absence de formation d'anévrisme.

Les investigations macroscopiques et microscopiques effectuées après une puis douze semaine(s) d'implantation ont révélé une bonne résistance des artères à la suture et l'absence de tout signe de rejet immunologique. Ces investigations ont aussi montré que l'apparition d'une thrombose précoce dans la lumière des substituts vasculaires non traités est probablement due à l'exposition du collagène, hautement thrombogène, aux plaquettes et leucocytes circulants. Par contre, le film $(PAH\text{-}PSS)_3$, constituerait un écran, qui rend les sites de fixation de la matrice artérielle inaccessibles aux éléments thrombogénes du sang. De plus, les répulsions électrostatiques exercées par la charge négative superficielle du film réduisent l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur la surface interne de l'artère [168]. La coloration rouge indiquant la présence du film n'est plus visible après douze semaines d'implantation, ce qui pourrait laisser penser à sa disparition. Mais l'absence de thrombus suggère la persistance du film. Cette ambivalence peut s'expliquer par la recolonisation de la paroi par les CML qui ont recréée un environnement favorable à la synthèse de leur matrice extracellulaire. Pour vérifier la présence du film après douze semaines, il faudrait marquer le film avec une molécule fluorescente telle que la rhodamine.

Par ailleurs, l'examen des coupes histologiques des parois artérielles réalisées après une et douze semaine(s) d'implantation a montré une évolution des structures constitutives de l'artère. La nécrose (perte des cellules de la média) de la paroi observée à une semaine n'est plus constatée après douze semaines, ce qui suggère une recolonisation de la média. La réaction inflammatoire au niveau de l'adventice observée après douze semaines s'est résorbée

et a fait place à la cicatrisation artérielle. La réaction de von Kossa ne révèle aucun dépôt de calcium au niveau de la paroi artérielle synonyme d'une bonne stabilité de la greffe.

La perte des cellules vasculaires (dégénérescence de la paroi artérielle) après une semaine et la recolonisation après douze semaines d'implantation peuvent s'expliquer à la lumière des données de la littérature.

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la dégénérescence de la paroi vasculaire. La première [229] invoque les contraintes mécaniques exercées sur la surface interne de l'artère. En effet, Ces contraintes générées par la circulation sanguine agissent sur les cellules endothéliales qui libèrent des facteurs de croissance, des cytokines et surexpriment à leur surface des molécules d'adhésion telles que la E-sélectine et les VCAM-1. Ces molécules d'adhésion assurent la diapédèse des leucocytes qui éliminent les cellules de la paroi vasculaires. La seconde hypothèse stipule que la dégénérescence est due au manque de vascularisation de la paroi artérielle (absence du *vasa vasorum*) [230]. Pour notre part, nous sommes en accord avec la seconde hypothèse pour les raisons suivantes :

(1) l'absence dans la lumière de nos substituts, de l'endothélium vasculaire qui assure les différentes étapes de la diapédèse leucocytaire.

(2) les observations récentes de L'heureux *et al.* [57] ont montré la formation du *vasa vasorum* qu'après un mois d'implantation.

Au cours de cette étude, la non disponibilité des anticorps spécifiques révélant la présence des cellules endothéliales du lapin ne nous a pas permis de mettre en évidence le *vasa vasorum* après douze semaines d'implantation.

Pour argumenter la recolonisation cellulaire de la média, la auteurs proposent trois sources de cellules possibles. (1) pénétration dans la paroi vasculaire des cellules progénitrices circulantes, (2) la migration de cellules musculaires des tissus adjacents et (3) sous l'effet des cytokines et des facteurs de croissance, la différenciation des cellules inflammatoires (leucocytes présents dans l'adventice) en cellules musculaires lisses [105, 231, 232]. Dans notre cas, les deux dernières suggestions apparaissent applicables pour expliquer la cellularisation de la matrice. Quant à la première hypothèse, elle parait peu probable dans notre cas car l'absence de l'inflammation au niveau de l'intima à une semaine et la présence de la charge négative dans la lumière des substituts empêchent l'adhésion et la migration des cellules progénitrices circulantes au sein de la matrice.

V. 3. CONCLUSION

L'évaluation *in vivo* de substituts artériels recouvert par un film multicouche de polyélectrolytes a été réalisée pour la première fois. Cette évaluation a montré :

(1) l'absence de rejet de nos artères (calcification, destruction de la matrice artérielle).

(2) la persistance de la perméabilité de nos substituts. En effet, en absence d'endothélium vasculaire, la matrice artérielle est hautement thrombogène. Le recouvrement de la lumière de l'artère par un film multicouche de polyélectrolytes finissant par une charge négative nous a permis d'obtenir une surface non thrombogène active même après douze semaine d'implantation.

(3) le remodelage et la recolonisation de la paroi des artères traitées par le film par les cellules musculaires lisses après douze semaines d'implantation.

L'ensemble de ces résultats ne semble montrer aucune endothélialisation de la lumière de nos artères traitées. Cependant cette observation demande vérification avec des techniques d'approches plus performantes comme la microscopie confocale. En tout état de cause, la necessité d'effectuer une endothélialisation des substituts avant implantation nous parait impérative. Les cellules endothéliales assureraient au greffon une fonctionnalité totale dès implantation. Une évaluation à plus long terme sur le gros animal (les ovins) de l'ensemble de nos substituts (endothélialisés ou non endothélialisées) devra également être entreprise.

PARTIE IV

CONCLUSION GENERALE

L'augmentation de la fréquence des pathologies cardiovasculaires ainsi que les limites des thérapies applicables nécessiteront au cours des prochaines décennies des besoins importants en substituts vasculaires pour le remplacement d'artères de faible calibre. Dans ce travail, nous avons pu montrer la possibilité de développer une matrice artérielle naturelle possédant une lumière anti-thrombotique. L'utilisation d'une artère ombilicale cryoconservée et désendothélialisée comme matrice présente plusieurs avantages : origine humaine, biodisponibilité, taille (diamètre interne d'environ 3 mm) adaptée au remplacement des vaisseaux de petit calibre, faible potentiel antigénique… Deux inconvénients majeurs demeurent. Le premier est la diminution des propriétés biomécanique de la paroi artérielle qui, à long terme, pourrait entraîner une prolifération anormale des cellules musculaires lisses et l'échec de la greffe. Le second est l'accessibilité de la matrice artérielle hautement thrombogène aux plaquettes et aux leucocytes, dont le caillot résultant obturerait la lumière du greffon. Afin de palier à ces inconvénients, nous avons recouvert la surface luminale des artères avec un film multicouche de polyélectrolytes dont la couche terminale est une charge contrôlée. Compte tenu des résultats antérieurs obtenus au laboratoire nous avons choisi de construire le film à partir d'hydrochlorure de polyallyamine (polycation) et de poly (sodium 4 styrène sulfonate) (polyanion). Ce film déposé dans la lumière des vaisseaux a montré une bonne adhésion et rétention des cellules endothéliales lorsque la charge est positive et une bonne perméabilité et intégration des substituts après trois mois d'implantation chez le lapin. Contrairement à plusieurs travaux réalisés chez l'animal, nos résultats ne semblent cependant montrer aucune endothélialisation du greffon. Par ailleurs, les propriétés biomécaniques (élasticité) de la paroi artérielle semblent restaurées après dépôt du film, ce qui permettrait d'éviter l'apparition de complications tardives comme l'hyperplasie intimale au niveau des sites d'anastomose. Ces résultats, sur lesquels se sont appuyés un projet ANR appelé SUBVACEL, accepté en 2007, ouvre de très larges perspectives dans le domaine des allogreffes vasculaires notamment si l'endothélialisation de la surface luminale pouvait être effectuée avec des progéniteurs endothéliaux circulants. A la lumière des derniers résultats obtenus au laboratoire (Berthelemy *et al*., soumise) il serait pertinent de différencier les progéniteurs endothéliaux directement dans la lumière des artères traitées par le film puis d'évaluer *in vivo* la résistance et la perméabilité de ces greffons endothélialisés. Il serait également judicieux de fonctionnaliser les multicouches par des réservoirs contenant des facteurs de croissance (VEGF). La libération de ces facteurs dans la circulation permettraient le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux *in vivo*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] R. S. Reneman, T. Arts, A. P. Hoeks. Wall shear stress-an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system *in vivo*. Discrepancies with theory. ***J. Vasc. Res.*** 43 (2006), 251-269.

[2] A. K. Bohra, T. Doyle, C. Harvey. True aneurysm of a femoropopliteal vein graft. ***Int. J. Clin. Pract.*** 55 (2001), 725-726.

[3] R. M. Peer, J. F. Upson. Superficial femoral artery as inflow for bypass to the proximal popliteal artery. ***J. Cardiovasc. Surg.*** 31 (1990), 735-738.

[4] J. J. Alexander, Y. C. Liu. Atherosclerotic aneurysm formation in an in situ saphenous vein graft. ***J. Vasc. Surg.*** 20 (1994), 660-664.

[5] L. H. Jr. Harrison. Historical aspects in the development of venous autografts. ***Ann. Surg.*** 183 (1976), 101-106.

[6] G. Arnulf. Long- term results of Jean Kunklin's first venous autograft. Apropos of the report of M. J. Descotes *et al.* ***Chirurgie*** 113 (1987), 751-752.

[7] B. W. Lytle, F. D. Loop, D. M. Cosgrove, N. B. Ratliff, K. Easley, P. C. Taylor. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. ***J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 89 (1985), 248-258.

[8] M. G. Davies, P. O. Hagen. Pathobiology of intimal hyperplasia. ***Br. J. Surg.*** 81 (1994), 1254-1269.

[9] S. Roy, P. Silacci, N. Stergiopulos. Biomechanical proprieties of decellularized porcine common carotid arteries. ***Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*** 289 (2005), H1567-.H1576.

[10] P. D. Ballyk, C. Walsh, J. Butany, M. Ojha. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. ***J. Biomech.*** 31 (1998), 229-237.

[11] J. C. Stanley, C. B. Ernst, W. J. Fry. Fate of 100 aortorenal vein grafts: characteristics of late graft expansion, aneurysmal dilatation, and stenosis. ***Surgery*** 74 (1973), 931-944.

[12] F. D. Loop, B. W. Lytle, D. M. Cosgrove, R. W. Stewart, M. Goormastic, G. W. Williams, L. A. Golding, C. C. Gill, P. C. Taylor, W. C. Sheldon. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. ***N. Engl. J. Med.*** 314 (1986), 1-6.

[13] A. Cameron, H. G. Jr. Kemp, G. E. Green. Bypass surgery with the internal mammary artery graft: 15 year follow-up. ***Circulation*** 74 (1986), III30- III36.

[14] C. C. Canver. Conduit options in coronary artery bypass surgery. ***Chest*** 108 (1995), 1150-1155.

[15] J. L. Ochsner, J. D. Lawson, S. J. Eskind, N. L. Mills, P. T. DeCamp. Homologous veins as an arterial substitute long-term results. ***J. Vasc. Surg.*** 1 (1984), 306-313.

[16] J. Gelbfish, I. J. Jacobowitz, D. M. Rose, M. W. Connolly, A. J. Acinapura, Z. Zisbrod, K. H. Lim, P. Cappabianca, J. N. Jr. Cunningham. Cryopreserved homologous saphenous vein: early and late patency in coronary artery bypass surgical procedures. ***Ann. Thorac. Surg.*** 42 (1986), 70-73.

[17] M. Gabriel, K. Wachal, L. Dzieciuchowicz, K. Pawlaczyk, Z. Krasiński, G. Oszkinis. The influence of cryopreservation on changes in diameter and compliance of allografts in an animal experimental model. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 32 (2006), 169-175.

[18] W. C. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, J. P. Carteaux, X. Wang, J. F. Stoltz. Investigation of 3-D mechanical properties of blood vessels using a new *in vitro* tests system: results on sheep common carotid arteries. ***IEEE. Trans. Biomed. Eng.*** 48 (2001), 442-451.

[19] B. Lehalle, C. Geschier, G. Fieve, J. F. Stoltz. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. ***J. Vasc. Surg.*** 25 (1997), 751-752.

[20] G. Pasquinelli, L. Foroni, M. Buzzi, P. L. Tazzari, C. Vaselli, M. Mirelli, M. Gargiulo, R. Conte, A. Stella. Smooth muscle cell injury after cryopreservation of human thoracic aorta. ***Cryobiology*** 52 (2006), 309-316.

[21] G. Pascual, C. Escdero, M. Rodriguez, C. Corrales, N. Serrano, J. M. Bellón, J. Buján. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial graft: co-culture of venous and arterial endothelial cells. ***Cryobiology*** 49 (2004), 272-285.

[22] D. M. Rosenberg, B. A. Glass, N. Rosenberg, M. R. Lewis, W. A. Dale. Experiences with modified bovine carotid arteries in arterial surgery. ***Surgery*** 68 (1970), 1064-1073.

[23] N. Chakfé, F. Dieval, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand, J. C. Kertz. Substituts vasculaires. ***Ann. Chir.*** 129 (2004), 301-309.

[24] I. M. Mitchell, A. R. Essop, P. J. Scott, P. G. Martin, N. K. Gupta, N. R. Saunders, R. U. Nair, G. J. Williams. Bovine internal mammary artery as a conduit for coronary revascularization: long-term results. ***Ann. Thorac. Surg.*** 55 (1993), 120-122.

[25] H. Dardik. The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization. ***Cardiovasc. Surg.*** 3 (1995), 265-269.

[26] H. Dardik, I. M. Ibrahim, I. Dardik. Evaluation of glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein as a vascular prosthesis for bypass to the popliteal, tibial, and peroneal arteries. ***Surgery*** 83 (1978), 577-588.

[27] G. M. Silver, G. E. Katske, F. L. Stutzman, N. E. Wood. Umbilical vein for aortocoronary bypass. ***Angiology*** 33 (1982), 450-453.

[28] W. S. Edwards, L. M. Jr. Bargeron. The importance of the azygos vein in superior cava-pulmonary artery anastomosis. ***J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 46 (1963), 811-817.

[29] K. Watanabe. Microarterial prostheses of expanded polytetrafluoroethylene. ***J. Microsurg.*** 2 (1980), 11-21.

[30] R. B. Chard, D. C. Johnson, G. R. Nunn, T. B. Cartmill. Aorta-coronary bypass grafting with polytetrafluoroethylene conduits. Early and late outcome in eight patients. ***J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 94 (1987), 132-134.

[31] A. B. Jr. Voorhees, A 3rd Jaretzki, A. H. Blakemore. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. ***Ann. Surg.*** 135 (1952), 332-336.

[32] Z. Zhang, Y. Marois, R. G. Guidoin, P. Bull, M. Marois, T. How, G. Laroche, M. W. King. Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. ***Biomaterials*** 18 (1997), 113-124.

[33] A. G. Mikos, S. W. Herring, P. Ochareon, J. Elisseeff, H. H. Lu, R. Kandel, F. J. Schoen, M. Toner, D. Mooney, A. Atala, M. E. Van Dyke, D. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic. Engineering complex tissues. ***Tissue Eng.*** 12 (2006), 3307-3339.

[34] L. E. Freed, F. Guilak, X. E. Guo, M. L. Gray, R. Tranquillo, J. W. Holmes, M. Radisic, M. V. Sefton, D. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signalling. ***Tissue Eng.*** 12 (2006), 3285-3305.

[35] E. Hunziker, M. Spector, J. Libera, A. Gertzman, S. L. Woo, A. Ratcliffe, M. Lysaght, A. Coury, D. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic. Translation from research to applications. ***Tissue Eng.*** 12 (2006), 3341-3364.

[36] R. Cancedda, P. Giannoni, M. Mastregiacomo. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. ***Biomaterials*** 28 (2007), 4240-4250.

[37] F. M. Wood, M. L. Kolybaba, P. Allen. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience. ***Burns*** 32 (2006), 538-544.

[38] G. Naughton, J. Mansbridge, G. Gentzkow. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. ***Artif. Organs*** 21 (1997), 1203-1210.

[39] R. E. Schreiber, B. M. Ilten-Kirby, N. S. Dunkelman, K. T. Symons, L. M. Rekettye, J. Willoughby, A. Ratcliffe. Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants. ***Clin. Orthop. Relat. Res.*** 367 (1999), S382- S395.

[40] K. H. Yow, J. Ingram, S. A. Korossis, E. Ingham, S. Homer-Vanniasinkam. Tissue engineering of vascular conduits. ***Br. J. Surg.*** 93 (2006), 652-661.

[41] N. L'Heureux, S. Paquet, R. Labbe, L. Germain, F. A. Auger. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. ***FASEB J.*** 12 (1998), 47-56.

[42] I. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka, M. Kadletz. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. ***J. Vasc. Surg.*** 6 (1987), 535-541.

[43] C. B. Weinberg, E. Bell. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. ***Science*** 231 (1986), 397-400.

[44] N. L'Heureux, L. Germain, R. Labbe, F. A. Auger. *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. ***J. Vasc. Surg.*** 17 (1993), 499-509.

[45] J. Hirai, K. Kanda, T. Oka, T. Matsuda. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. ***ASAIO J.*** 40 (1994), M383- M388.

[46]. J. D. Kakisis, C. D. Liapis, C. Breuer, B. E. Sumpio. Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. ***J. Vasc. Surg.*** 41 (2005), 349-354.

[47] D. Seliktar, R. A. Black, R. P. Vito, R. M. Nerem. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling *in vitro*. ***Ann. Biomed. Eng.*** 28 (2000), 351-362.

[48] M. R. Neidert, E. S. Lee, T. R. Oegema, R. T. Tranquillo. Enhanced fibrin remodeling *in vitro* with TGF-beta1, insulin and plasmin for improved tissue-equivalents. ***Biomaterials*** 23 (2002), 3717-3731.

[49] W. He, T. Yong, W. E. Teo, Z. Ma, S. Ramakrishna. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. ***Tissue Eng.*** 11 (2005), 1574-1588.

[50] J. Hirai, T. Matsuda. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: tissue regeneration process. ***Cell Transplant.*** 5 (1996), 93-105.

[51] L. E. Niklason, W. M. Abbott, J. Gao, B. Klagges, K. K. Hirschi, K. Ulubayram, N. Conroy, R. Jones, A. Vasanawala, S. Sanzgiri, R. Langer. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. ***J. Vasc. Surg.*** 33 (2001), 628-638.

[52] L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, R. Langer. Functional arteries grown *in vitro*. ***Science*** 284 (1999), 489-493.

[53] S. P. Hoerstrup, G. Zund, R. Sodian, A. M. Schnell, J. Grunenfelder, M. I. Turina. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. ***Eur. J. Cardiothorac. Surg.*** 20 (2001), 164-169.

[54] S. H. Kim, J. H. Kwon, M. S. Chung, E. Chung, Y. Jung, S. H. Kim, Y. H. Kim. Fabrication of a new tubular fibrous PLCL scaffold for vascular tissue engineering. ***J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*** 17 (2006), 1359-1374.

[55] J. D. Roh, M. P. Brennan, R. I. Lopez-Soler, P. M. Fong, A. Goyal, A. Dardik, C. K. Breuer. Construction of an autologous tissue-engineered venous conduit from bone marrow-derived vascular cells: optimization of cell harvest and seeding techniques. ***J. Pediatr. Surg.*** 42 (2007), 198-202.

[56] T. Shin'oka. Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. ***Nippon Geka Gakkai Zasshi.*** 105 (2004), 459-463.

[57] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T. N. Wight, N. A. Chronos, A. E. Kyles, C. R. Gregory, G. Hoyt, R. C. Robbins, T. N. McAllister. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. ***Nat. Med.*** 12 (2006), 361-365.

[58]. H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, T. Matsuda. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. ***Biomaterials*** 28 (2007), 486-495.

[59] J. C. Stoclet, K. Laflamme, F. A. Auger, L. Germain. Human blood vessels created with tissue engineering. ***Med. Sci. (Paris)*** 20 (2004), 675-678.

[60] X. Wang, P. Lin, Q. Yao, C. Chen. Development of Small-Diameter Vascular Grafts. ***World J. Surg.*** 31(2007), 682-689.

[61] H. Kerdjoudj, V. Moby, N. Berthelemy, M. Gentils, C. Boura, L. Bordenave, J. F. Stoltz, P. Menu. The ideal small arterial substitute: Role of cell seeding and tissue engineering. ***Clin. Hemorheol. Microcirc.*** 37 (2007), 89-98.

[62] D. T. Simionescu, Q. Lu, Y. Song, J. S. Lee, T. N. Rosenbalm, C. Kelley, N. R. Vyavahare. Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds. ***Biomaterials*** 27 (2006), 702-113.

[63] A. Ketchedjian, A. L. Jones, P. Krueger, E. Robinson, K. Crouch, L. Wolfinbarger, R. Hopkins. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in Ovine great vessel reconstruction. ***Ann. Thorac. Surg.*** 79 (2005), 888-896.

[64] P. Lamm, G. Juchem, S. Milz, M. Schuffenhauer, B. Reichart. Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations. ***Circulation*** 104 (2001), I108-I114.

[65] K. Akimaru, M. Onda, T. Tajiri, H. Yoshida, Y. Mamada, N. Taniai, M. Yoshioka, S. Mineta. Reconstruction of the vena cava with the peritoneum. ***Am. J. Surg.*** 179 (2000), 289-293.

[66] T. P. Sarac, K. Carnevale, N. Smedira, E. Tanquilut, P. Augustinos, A. Patel, T. Naska, D. Clair, K. Ouriel. *In vivo* and mechanical properties of peritoneum/fascia as a novel arterial substitute. ***J. Vasc. Surg.*** 41 (2005), 490-497.

[67] K. Yavuz S. Geyik, D. Pavcnik, B.T. Uchida, C. L. Corless, D. E. Hartley, A, Goktay, L. O. Correa, H. Timmermans, J. P. Hodde, J. A. Kaufman, F. S. Keller, J. Rosch. Comparison of the endothelialization of small intestinal submucosa, Dacron, and expanded polytetrafluoroethylene suspended in the thoracoabdominal aorta in sheep. ***J. Vasc. Interv. Radiol.*** 17 (2006), 873-882.

[68] G. C. Lantz, S. F. Badylak, A. C. Coffey, L. A. Geddes, G. E. Sandusky. Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. ***J. Surg. Res.*** 53 (1992), 175-181.

[69] A. S. Arunkalaivanan, J. W. Barrington. Randomized trial of porcine dermal sling (Pelvicol implant) *vs.* tension-free vaginal tape (TVT) in the surgical treatment of stress incontinence: a questionnaire-based study. ***Int. Urogynecol. J. Pelvic. Floor. Dysfunct.*** 14 (2003), 17-23.

[70] M. Ojha. Spatial and temporal variations of wall shear stress within an end-to-side arterial anastomosis model. ***J. Biomech.*** 26 (1993), 1377-1388.

[71] P. F. Davies. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. ***Physiol. Rev.*** 75 (1995), 519-560.

[72] M. Herring, A. Gardner, J. Glover. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. ***Surgery*** 84 (1978), 498-504.

[73] L. Bordenave, P. Fernandez, M. Remy-Zolghadri, S. Villars, R. Daculsi, D. Midy. *In vitro* endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. ***Clin. Hemorheol. Microcirc.*** 33 (2005), 227-234.

[74] H. R. Laube, J. Duwe, W. Rutsch, W. Konertz. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. ***Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 120 (2000), 134-141.

[75] M. Deutsch, J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss, P. Zilla. Clinical autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. ***Surgery*** 126 (1999), 847-855.

[76] G. Leseche, J. Ohan, S. Bouttier, T. Palombi, P. Bertrand, B. Andreassian. Above-knee femoropopliteal bypass grafting using endothelial cell seeded PTFE grafts: five-year clinical experience. ***Ann. Vasc. Surg.*** 9 (1995), S15-S23.

[77] B. Boneu, J. P. Cazenave. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2ème édition révisée, Boehringer Ingelheim France, (1997), pp8-15.

[78] C. Gaucher, C. Devaux, C. Boura, P. Lacolley, J. F. Stoltz, P. Menu. *In vitro* impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. ***Clin. Hemorheol. Microcirc.*** 37 (2007), 99-107.

[79] P. Withfield. Le corps humain. Paris: édition Solar, (1996), pp124-125.

[80] O. Chappey, M. P. Wautier, J. L. Wautier. Structure and functions of the endothelium. ***Rev. Prat.*** 47 (1997), 2223-2226.

[81] R. M. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. ***Nature*** 327 (1987), 524-526.

[82] M. Feletou, P. M. Vanhoutte, A. H. Weston, G. Edwards. EDHF and endothelial potassiun channels: IKCa and SKCa. ***Br. J. Pharmacol.*** 140 (2003), 594-601.

[83] D. G. Harrison. Endothelial function and oxidant stress. ***Clin. Cardiol.*** 20 (1997), 11-17.

[84] M.Yanagisawa, H. Kurihara, S. Kimura, K. Goto, T. Masaki. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca^{2+} channels. ***J. Hypertens. Suppl.*** 6 (1988), S188- S191.

[85] A. P. McGuigan, M. V. Sefton. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. ***Biomaterials*** 28 (2007), 2547-2571.

[86] L. M. Graham, D. W. Vinter, J. W. Ford, R. H. Kahn, W. E. Burkel, J. C. Stanley. Endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts: early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. ***Arch. Surg.*** 115 (1980), 929-933.

[87] M. Herring, J. Smith, M. Dalsing, J. Glover, R. Compton, K. Etchberger, T. Zollinger. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency. ***J. Vasc. Surg.*** 20 (1994), 650-655.

[88] I. J. Varma, R. G. Breuls, T. E. Schouten, W. J. Jurgens, H. J. Bontkes, G. J. Schuurhuis, S. M. van Ham, F. J. van Milligen. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. ***Stem Cells Dev.*** 16 (2007), 91-104.

[89] S. K. Williams, B. E. Jarrell, D. G. Rose, J. Pontell, B. A. Kapelan, P. K. Park, T. L. Carter. Human microvessel endothelial cell isolation and vascular graft sodding in the operating room. ***Ann. Vasc. Surg.*** 3 (1989), 146-152.

[90] B. E. Jarrell, S. K. Williams, L. Solomon, L. Speicher, E. Koolpe, J. Radomski, R. A. Carabasi, D. Greener, F. E. Rosato. Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation. Temporal dynamics and compatibility with the operating room. ***Ann. Surg.*** 203 (1986), 671-678.

[91] I. A. Rupnick, F. A. Hubbard, K. Pratt, B. E. Jarrell, S. K. Williams. Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells. ***J. Vasc. Surg.*** 9 (1989), 788-795.

[92] S. W. Cho, S. H. Lim, I. K. Kim, Y. S. Hong, S. S. Kim, K. J. Yoo, H. Y. Park, Y. Jang, B. C. Chang, C. Y. Choi, K. C. Hwang, B. S. Kim. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. ***Ann. Surg.*** 241 (2005), 506–515.

[93] S. W. Cho, H. J. Park, J. H. Ryu, S. H. Kim, Y. H. Kim, C. Y. Choi, M. J. Lee, J. S. Kim, I. S. Jang, D. I. Kim, B. S. Kim. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. ***Biomaterials*** 26 (2005), 1915–1924.

[94] S. Kanki-Horimoto, H. Horimoto, S. Mieno, K. Kishida, F. Watanabe, E. Furuya, T. Katsumata. Synthetic vascular prosthesis impregnated with genetically modified bone marrow cells produced recombinant proteins. ***Artif. Organs*** 29 (2005), 815-819.

[95] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J. M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. ***Science*** 275 (1997), 964-967.

[96] S. Rafii, D. Lyden. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. ***Nat. Med.*** 9 (2003), 702-712.

[97] L. Bonello, A. Basire, F. Sabatier, F. Paganelli, F. Dignat-George. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. ***J. Thromb. Haemost.*** 4 (2006), 979-981.

[98] C. Kalka, H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner, T. Asahara. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*** 97 (2000), 3422-3427.

[99] G. Condorelli, U. Borello, L. De Angelis, M. Latronico, D. Sirabella, M. Coletta, R. Galli, G. Balconi, A. Follenzi, G. Frati, M. G. Cusella De Angelis, L. Gioglio, S. Amuchastegui, L. Adorini, L. Naldini, A. Vescovi, E. Dejana, G. Cossu. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*** 98 (2001), 10733-10738.

[100] A. Kawamoto, H. C. Gwon, H. Iwaguro, J. I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, M. J. Isner, T. Asahara. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. ***Circulation*** 103 (2001), 634-637.

[101] P. Zammaretti, M. Jaconi. Cardiac tissue engineering: regeneration of the wounded heart. ***Curr. Opin. Biotechnol.*** 15 (2004), 430-434.

[102] T. Aper, A. Schmidt, M. Duchrow, H. P. Bruch. Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 33 (2007), 33-39.

[103] H. He, T. Shirota, H. Yasui, T. Matsuda. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. ***J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 126 (2003), 455-464.

[104] D. P. Griese, A. Ehsan, L. G. Melo, D. Kong, L. Zhang, M. J. Mann, R. E. Pratt, R. C. Mulligan, V. J. Dzau. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. ***Circulation*** 108 (2003), 2710-2715.

[105] S. Kaushal, G. E. Amiel, K. J. Guleserian, O. M. Shapira, T. Perry, F. W. Sutherland, E. Rabkin, A. M. Moran, F. J. Schoen, A. Atala, S. Soker, J. Bischoff, J. E. Jr. Mayer. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*. ***Nat. Med.*** 7 (2001), 1035-1040.

[106] S. S. Khan, M. A. Solomon, J. P. Jr. McCoy. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. ***Cytom. part b-clin. Cy.*** 64 (2005), 1-8.

[107] L. Xiao, D. Shi. Role of precoating in artificial vessel endothelialization. ***Chin. J. Traumatol.*** 7 (2004), 312-316.

[108] H. J. Salacinski, G. Punshon, B. Krijgsman, G. Hamilton, A. Seifalian. A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human omentum. ***Artif. Organs*** 25 (2001), 974-982

[109] P. Feugier, R. A. Black, J. A. Hunt, T. V. How. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. ***Biomaterials*** 26 (2005), 1457-1466.

[110] J. S. Budd, P. R. Bell, R. F. James. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. ***Br. J. Surg.*** 76 (1989), 1259-1261.

[111] A. Dekker, A. A. Poot, J. A. van Mourik, M. P. Workel, T. Beugeling, A. Bantjes, J. Feijen, W. G. van Aken. Improved adhesion and proliferation of human endothelial cells on polyethylene precoated with monoclonal antibodies directed against cell membrane antigens and extracellular matrix proteins. ***Thromb. Haemost.*** 66 (1991), 715-724.

[112] A. Sank, K. Rostami, F. Weaver, D. Ertl, A. Yellin, M. Nimni, T. L. Tuan. New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts. ***Am. J. Surg.*** 164 (1992), 199-204.

[113] A. Schneider, R. N. Melmed, H. Schwalb, M. Karck, I. Vlodavsky, G. Uretzky. An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluroethylene small caliber vascular grafts. ***J. Vasc. Surg.***15 (1992), 649-656.

[114] I. P. Ziats, J. M. Anderson. Human vascular endothelial cell attachment and growth inhibition by type V collagen. ***J. Vasc. Surg.*** 17 (1993), 710-718.

[115] K. C. Kent, A. Oshima, T. Ikemoto, A. D. Whittemore. An *in vitro* model for human endothelial cell seeding of a small diameter vascular graft. ***ASAIO Trans.*** 34 (1988), 578-580.

[116] B. Lindblad, W. E. Burkel, T. W. Wakefield, L. M. Graham, J. C. Stanley. Endothelial cell seeding efficiency onto expanded polytetrafluorethylene grafts with different coatings. ***Acta. Chir. Scand.*** 152 (1986), 653-656.

[117] S. K. Williams, B. E. Jarrell, L. Friend, J. S. Radomski, R. A. Carabasi, E. Koolpe, S .N. Mueller, S. C. Thornton, T. Marinucci, E. Levine. Adult human endothelial cell compatibility with prosthetic graft material. ***J. Surg. Res.*** 38 (1985), 618-629.

[118] A. Tiwari, H. J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton, A. M. Seifalian. Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach. ***FASEB J.*** 16 (2002), 791-796.

[119] G. Stansby, N. Shukla, B. Fuller, G. Hamilton. Seeding of human microvasclular endothelial cells onto polytetrafluoroethylene graft material. ***Br. J. Surg.*** 78 (1991), 1189-1192.

[120] K. R. Kidd, D. Dal Ponte, A. L. Stone, J. B. Hoying, R. B. Nagle, S. K. Williams. Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene. ***Tissue Eng.*** 11 (2005), 1379-1391.

[121] G. J. Thomson, R. K. Vohra, M. H. Carr, M. G. Walker. Adult human endothelial cell seeding using expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts: a comparison of four substrates. ***Surgery*** 109 (1991), 20-27.

[122] D. L. Wooster, R. E. Louch, S. Krajden. Intraoperative bacterial contamination of vascular grafts: a prospective study. ***Can. J. Surg.*** 28 (1985), 407-409.

[123] F. R. Pu, R. L. Williams, T. K. Markkula, J. A. Hunt. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells *in vitro*. ***Biomaterials*** 23 (2002), 2411-2488.

[124] P. M. Consigny. Placement of endothelial cells on the luminal surface of denuded arteries *in vitro* and *in vivo*. ***J. Vasc. Interv. Radiol.*** 8 (1997), 595-604.

[125] K. C. Kent, A. Oshima, A. D. Whittemore. Optimal seeding conditions for human endothelial cells. ***Ann. Vasc. Surg.*** 6 (1992), 258-264.

[126] S. G. Lalka, L. M. Oelker, J. M. Malone, R. C. Duhamel, M. A. Kevorkian, B. A. Raper, J. C. Nixon, K. J. Etchberger, M. C. Dalsing, D. F. Cikrit. Acellular vascular matrix: a natural endothelial cell substrate. ***Ann. Vasc. Surg.*** 3 (1989), 108-117.

[127] J. G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Froschl, P. Zilla. Clinical autologous *in vitro* endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. ***Ann. Thorac. Surg.*** 71 (2001), S327-S331.

[128] J. M. Bellon, J. Bujan, N. G. Honduvilla, A. Hernando, J. Navlet. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. ***Ann. Vasc. Surg.*** 7 (1993), 549-555.

[129] H. W. Jun, J. West. Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization. ***J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*** 15 (2004), 73-94.

[130] S. H. Hsu, S. H. Sun, D. C. Chen. Improved retention of endothelial cells seeded on polyurethane small-diameter vascular grafts modified by a recombinant RGD-containing Protein. ***Artif. Organs*** 27 (2003), 1068-1078.

[131] S. Kouvroukoglou, K. C. Dee, R. B. Bizios, L. V. McIntire. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. ***Biomaterials*** 21 (2000), 1725-1733.

[132] J. B. Huebsch, G. B. Fields, T. G. Triebes, D. L. Mooradian. Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell adhesion and spreading on biomaterial surfaces. ***J. Biomed. Mater. Res.*** 31 (1996), 555-567.

[133] I. J. Wissink, R. Beernink, N. M. Scharenborg, A. A. Poot, G. H. Engbers, T. Beugeling, W. G. van Aken, J. Feijen. Endothelial cell seeding of (heparinized) collagen matrices: effects of bFGF pre-loading on proliferation (after low density seeding) and pro-coagulant factors. ***J. Control. Release*** 67 (2003), 141-155.

[134] K. Takahashi. Adsorption of basic fibroblast growth factor onto Dacron® vascular prosthesis and its biological efficacy. ***Artif. Organs*** 21 (1997), 1041-1046.

[135] R. Vohra, G. J. Thomson, H. M. Carr, H. Sharma, M. G. Walker. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. ***Br. J. Surg.*** 78 (1991), 417-420.

[136] J. S. Anderson, T. M. Price, S. R. Hanson, L. A. Harker. *In vitro* endothelialization of small-caliber vascular grafts. ***Surgery*** 101 (1987), 577-586.

[137] M. Braddock, J. L. Schwachtgen, P. Houston, M. C. Dickson, M. J. Lee, C. J. Campbell. Fluid Shear Stress Modulation of Gene Expression in Endothelial Cells. ***News Physiol. Sci.*** 13 (1998), 241-246.

[138] G. M. Riha, P. H. Lin, A. B. Lumsden, Q. Yao, C. Chen. Review: application of stem cells for vascular tissue engineering. ***Tissue Eng.*** 11 (2005), 1535-1552.

[139] S. Jockenhoevel, G. Zund, S. P. Hoerstrup, A. Schnell, M. Turina. Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for *in vitro* improvement of mechanical tissue properties. ***ASAIO J.*** 48 (2002), 8-11.

[140] C. F. Jr. Dewey, S. R. Bussolari, M. A. Jr. Gimbrone, P. F. Davies. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. ***J. Biomech. Eng.*** 103 (1981), 177-185.

[141] M. J. Levesque, R. M. Nerem. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. ***J. Biomech. Eng.*** 107 (1985), 341-347

[142] B. H. Wang, X. H. Liu, D. Dumas, J. F. Stoltz, X. Wang. The migration of endothelial cells under laminar shear stress. Arch. Int. Physiol. Bioch. Biophys, procceding du XXVIIIème congrès de la société de biomécanique, Poitiers, France. 111 (2003).

[143] M. J. Levesque, R. M. Nerem, E. A. Sprague. Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow. ***Biomaterials*** 11 (1990), 702-777.

[144] K. Yamamoto, T. Takahashi, T. Asahara, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya, J. Ando. Proliferation, diffecrenciation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. ***J. Appl. Physiol.*** 95 (3003), 2081-2088.

[145] S. M. Wasserman, F. Mehraban, L. G. Komuves, R. B. Yang, J. E. Tomlinson, Y. Zhang, F. Spriggs, J. N. Topper. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. ***Physiol. Genomics.*** 12 (2002), 13-23.

[146] C. H. 3 rd Brown, R. F. Lemuth, J. D. Hellums, L. B. Leverett, C. P. Alfrey. Response of human platelets to shear stress. ***Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*** 21 (1975), 35-39.

[147] T. Nagel, N. Resnick, W. J. Atkinson, F. Dewey, M. A. Gimbrone. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. ***J. Clin. Invest.*** 94 (1994), 885-891.

[148] M. Malek, S. Izumo. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endhothelium. ***Am. J. Physiol. Cell Physiol.*** 263 (1992), 389-396.

[149] M. Noris, M. Morigi, R. Donadelli, S. Aiello, M. Foppolo, M. Todeschini, S. Orisio, G. Remuzzi, A. Remuzzi. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. ***Circ. Res.*** 76 (1995), 536-543.

[150] M. Baguneid, D. Murray, H. J. Salacinski, B. Fuller, G. Hamilton, M. Walker, A. M. Seifalian. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. ***Biotechnol. Appl. Biochem.*** 39 (2004), 151-157.

[151] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt. Build up of ultrathin multilayer films by a self assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. ***Thin solid Films*** (1992), 831-835.

[152] G. Decher. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. ***Science*** 227 (1997), 1232-1237.

[153] Y. Lvov, K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose, T. Kunitake. A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. ***Colloid. Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*** 146 (1999), 337-346.

[154] R. Advincula, E. Aust, W. Meyer, W. Knoll. *In Situ* Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy. ***Langmuir*** 12 (1996), 3536-3540.

[155] N. G. Hoogeveen, M. A. Cohen Stuart, G. J. Fleer, M. R. Bohmer. Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. ***Langmuir*** 12 (1996), 3675-3681.

[156] I. J. Ramsden, Y. M. Lvov, G. Decher. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. ***Thin Solid Films*** 254 (1995), 246-251.

[157] F. Caruso, E. Donath, H. Mohwald. Influence of Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-Carboxyfluorescein and Rhodamine B-Labeled Particles in Aqueous Solution. ***J. Phys. Chem. B.*** 102 (1998), 2011-2016.

[158] G. Ladam, P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher, F. Cuisinier. *In Situ* Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. ***Langmuir*** 16 (2000), 1249-1255.

[159] N. A. Kotov. Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. ***Nanostructured Materials*** 12 (1999), 789-796.

[160] P. Lavalle, C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, C. Picart. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an *in situ* atomic force microscopy study. ***Macromolecules*** 35 (2002), 4458-4465.

[161] S. S. Shiratori, M. F. Rubner. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. ***Macromolecules*** 33 (2000), 4213-4219.

[162] J. D. Mendelsohn, C. J. Barrett, V. V. Chan, A. J. Pal, A. M. Mayes, M. F. Rubner. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. ***Langmuir*** 16 (2000), 5017-5023.

[163] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J. C. Voegel, P. Lavalle, Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** 99 (2002), 12531-12535.

[164] F. Boulmedais, V. Ball, P. Schwinte, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel. Buildup of exponentially growing multilayer polypeptide films with internal secondary structure. Langmuir 19 (2003), 440-445.

[165] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayers architecture functionbalized by embedded proteins. ***Adv. Mater.*** 15 (2003), 692-695.

[166] V. Smuleac, D. A. Butterfield, D. Bhattacharyya. Layer-by-layer-assembled microfiltration membranes for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis. Langmuir. 22 (2006), 10118-10124.

[167] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. A. Kotov. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. Adv. Mater. 18 (2006), 3203-3224.

[168] B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, M. Tabrizian. Nanocoatings onto arteries *via* layer-by-layer deposition: toward the *in vivo* repair of damaged blood vessels. ***J. Am. Chem. Soc.*** 125 (2003), 7494-7495.

[169] B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, M. Tabrizian. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. ***Biomacromolecules*** 4 (2003), 1564-1571.

[170] P. Tryoen-Toht, D. Vautier, Y. Haikel, J. C. Voegel, P. Shaaf, J. Chluba, J. Ogier. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. ***J. Biomed. Mater. Res.*** 60 (2002), 657-667.

[171] D. Vautier, V. Karsten, C. Egles, J. Chluba, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier. Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells. ***J. Biomater. Sci. Polymer edn.*** 13 (2002), 713-732.

[172] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller, J. F. Stoltz. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. ***Biomaterials*** 24 (2003), 3521-3530.

[173] C. Boura, S. Muller, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. ***Biomaterials*** 26 (2005), 4568-4575.

[174] E. A. Jaffe, R. L. Nachmn, C. G. Becher, C. R. Minick. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. ***J. Clin. Invest.*** 52 (1976), 2745-2756.

[175] M. J. Ott, B. J. Ballermann. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to *in vitro* shear stress. ***Surgery*** 117 (1995), 334-339.

[176] E. Rendal, M. V. Santos, M. Rodriguez, J. Sánchez, R. Segura, G. Matheu, P. Filgueira, S. Pértega, C. Andión. Effects of cryoreserved and thawing on the structure of vascular segement. ***Transplant. Proc.*** 36 (2004), 3283-3287.

[177] N. Solanes, M. Rigol, E. Khabiri, M. Castellà, J. Ramírez, M. Roqué, E. Agustí, E. Roig, F. Pérez-Villa, J. Segalés, J. L. Pomar, P. Engel, A. Massaguer, J. Martorell, J. A. Rodríguez, G. Sanz, M. Heras. Effects of cryopreservation on the immunogenicity of porcine arterial allografts in early stages of transplant vasculopathy. ***Cryobiology*** 51 (2005), 130-141.

[178] S. Gu, C. J. Liu, T. Qiao, X. M. Sun, J. H. Chen. Abdominal aorta transplantation after programmed cryopreservation. ***World J. Gastroenterol.*** 10 (2004), 555-559.

[179] A. Yamada, K. Okada, R. Takahashi, Y. Okita. Pathologic features of cryopreserved aortic allograft implanted in the active infection. ***J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*** 132 (2006), 203-204.

[180] J. M. Bellon, J. Bujan, N. G. Honduvilla, A. Hernando, J. Navlet. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. ***Ann. Vasc. Surg.*** 7 (1993), 549-555.

[181] A. J. Hunt, Y. C. Song, E. A. Bateson, D. E. Pegg. Fractures in cryopreserved arteries. ***Cryobiology*** 31(1994), 506-515.

[182] J. Bujàn, G. Pascual, R. Lopez, C. Corrales, M. Rodriguez, F. Turegano, J. M. Bellon. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. ***Cryobiology*** 42 (2001), 256–265.

[183] M. Rigol, M. Heras, A. Martínez, M. J. Zurbano, E. Agustí, E. Roig, J. L. Pomar, G. Sanz. Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries. ***J. Vasc. Surg.*** 31 (2000), 1018-1025.

[184] R. T. Venkatasurbramanian, E. D. Grassl, V. H. Baroca, D. Lafontaine, J. C. Bischof. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. ***Ann. Biomed. Eng.*** 34 (2006), 823-832.

[185] T. T. Tower, R. T. Tranquillo. Alignment maps of tissues: II. Fast harmonic analysis for imaging. ***Biophys. J.*** 81 (2001), 2964-2971.

[186] D. S. Vara, H. J. Salacinski, R. Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton, A. M. Seifalian. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. ***Pathol. Biol. (Paris)*** 53 (2005), 599-612.

[187] E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff, A. Haverich. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 19 (2000), 381-386.

[188] H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, K. Montagne, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, P. Menu. Re-endothelialization of human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayers: a tool for damaged vessel replacement. ***Adv. Funct. Mater***. (2007), Sous presse.

[189] M. Amara, H. Kerdjoudj. Modification of cation-exchange membrane properties by electro-adsorption of polyethyleneimine. ***Desalination*** 155 (2003), 79-87.

[190] L. Szyk-Warszynska, A. Trybala. Deposition of core latex particles encapsulated in polyelectrolyte shells at modified mica surfaces. ***J. Colloid. Interface Sci***. 314 (2007), 398-404.

[191] Y. Liu, T. He, C. Gao. Surface modification of poly (ethylene terephthalate) *via* hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. ***Colloids Surf. B. Biointerfaces*** 46 (2005), 117-126.

[192] J. J. Hwang, S. Jelacic, N. T. Samuel, R. V. Maier, C. T. Campbell, D. G. Castner, A. S. Hoffman, P. S. Stayton. Monocyte activation on polyelectrolyte multilayers. ***J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*** 16 (2005), 237-251.

[193] M. T. Thompson, M. C. Berg, I. S. Tobias, M. F. Rubner, K. J. Van Vliet. Tuning compliance of nanoscale polyeletctrolyte multilayers to modulate cell adhesion. ***Biomaterials*** 26 (2005), 6836- 6845.

[194] A. Meddahi-Pelle, I. Bataille, P. Subra, D. Letourneur. Vascular biomaterials: from biomedical engineering to tissue engineering. ***Med. Sci. (Paris)*** 20 (2004), 679-684.

[195] N. D. Martin, P. J. Schaner, T. N. Tulenko, I. M. Shapiro, C. A. Dimatteo, T. K. Williams, E. S. Hager, P. J. DiMuzio. *In vivo* behavior of decellularized vein allograft. ***J. Surg. Res.*** 129 (2005), 17-23.

[196] B. S. Conklin, E. R. Richter, K. L. Kreutziger, D. S. Zhong, C. Chen. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xénograft. ***Med. Eng. Phys.*** 24 (2002), 173-183.

[197] W. C. Pevec, G. J. L'Italien, J. Megerman, R. P. Cambria, W. M. Abbott. Abnormal wall strain at distal end-to-side anastomoses. ***Ann. Vasc. Surg.*** 7 (1993), 14-20.

[198] H. S. Bassiouny, S. White, S. Glagov, E. Choi, D. P. Giddens, C. K. Zarins. Anastomotic intimal hyperplasia: mechanical injury or flow induced. ***J. Vasc. Surg.*** 15 (1992), 708-716.

[199] W. M. Abbott, J. Megerman, J. E. Hasson, G. L'Italien, D. F. Warnock. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. ***J. Vasc. Surg.*** 5 (1987), 376-382.

[200] G. Pascual, S. Martinez, M. Rodriguez, N. Serrano, J. M. Bellón, J. Buján. Patency and structural changes in cryopreserved arterial grafts used as vessels substitutes in the rat. ***J. Surg. Res.*** 124 (2005), 297-304.

[201] M. Rigol, M. Heras, A. Martínez, M. J. Zurbano, E. Agustí, E. Roig, J. L. Pomar, G. Sanz. Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries. ***J. Vasc. Surg.*** 31 (2000), 1018-1025.

[202] D. Bia, F. Pessana, R. Armentano, H. Pérez, S. Graf, Y. Zócalo, M. Saldías, N. Perez, O. Alvarez, W. Silva, D. Machin, P. Sueta, S. Ferrin, M. Acosta, I. Alvarez. Cryopreservation procedure does not modify human carotid homografts mechanical properties: an isobaric and dynamic analysis. ***Cell Tissue Bank*** 7 (2006), 183-194.

[203] D. Bia, Y. Zócalo, F. Pessana, R. Armentano, H. Pérez-Campos, M. Saldías, I. Alvarez. Femoral arteries energy dissipation and filtering function remain unchanged after cryopreservation procedure. ***Transpl. Int.*** 18 (2005), 1346-1355.

[204] R. L. Armentano, D. B. Santana, E. I. Cabrera Fischer, S. Graf, H. P. Cámpos, Y. Z. Germán, M. D. Carmen Saldías, I. Alvarez. An *in vitro* study of cryopreserved and fresh human arteries: a comparison with ePTFE prostheses and human arteries studied non-invasively *in vivo*. ***Cryobiology*** 52 (2006), 17-26.

[205] N. R. Tai, H. J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton, A. M. Seifalian. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. ***Br. J. Surg.*** 87 (2000), 1516-1524.

[206] C. Choserot, E. Péry, J. C. Goebel, D. Dumas, J. Didelon, J. F. Stoltz, W. C. Blondel. Experimental comparison between autofluorescence spectra of constrained fresh and cryopreserved arteries. ***Clin. Hemorheol. Microcirc.*** 33 (2005), 235-242.

[207] G. H. Borschel, Y. C. Huang, S. Calve, E. M. Arruda, J. B. Lynch, D. E. Dow, W. M. Kuzon, R. G. Dennis, D. L. Brown. Tissue engineering of decellularized small-diameter vascular grafts. ***Tissue Eng.*** 11 (2005), 778-786.

[208] M. W. Radomski, R. M. Palmer, S. Moncada. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. ***Br. J. Pharmacol.*** 92 (1987), 639-646.

[209] T. M. Carlos, J. M. Harlan. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. ***Blood*** 84 (1994), 2068-101.

[210] J. R. Vane, E. E. Anggård, R. M. Botting. Regulatory functions of the vascular endothelium. ***N. Engl. J. Med.*** 323 (1990), 27-36.

[211] A. W. Clowes, M. M. Clowes, M. A. Reidy. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. ***Lab. Invest.*** 54 (1986), 295-303.

[212] J. M. Heyligers, C. H. Arts, H. J. Verhagen, P. G. de Groot, F. L. Moll. Improving small-diameter vascular grafts: from the application of an endothelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel. ***Ann. Vasc. Surg.*** 19 (2005), 448-456.

[213] K. P. Walluscheck, G. Steinhoff, S. Kelm, A. Haverich. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD containing peptides. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 12 (1996), 321-330.

[214] S. Lepidi, G. Abatangelo, V. Vindigni, G. P. Deriu, B. GP, Zavan B, Tonello C, Cortivo R. *In vivo* regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. ***FASEB J.*** 20 (2006), 103-105.

[215] J. Denekamp. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. ***Br. J. Radiol.*** 66 (1993), 181-196.

[216] M. V. Risbud, M. R. Bhonde, R. R. Bhonde. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells: implications in islet immunoisolation. ***J. Biomed. Mater. Res.*** 57 (2001), 300-305.

[217] L. I. Romero, D. N. Zhang, G. S. Herron, M. A. Karasek. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. ***J. Cell Physiol.*** 173 (1997), 84-92.

[218] E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff, A. Haverich. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 19 (2000), 381-386.

[219] F. Opitz, K. Schenke-Layland, T. U. Cohnert, B. Starcher, K. J. Halbhuber, D. P. Martin, U. A. Stock. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis *in vivo*. ***Cardiovasc. Res.*** 63 (2004), 719-730.

[220] A. Bouaziz, A. Richert, A. Caprani. Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly (vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions. ***Biomaterials*** 18 (1997), 107-112.

[221] M. T. Thompson, M. C. Berg, I. S. Tobias, M. F. Rubner, K. J. Van Vliet. Tuning compliance of nanoscale polyeletctrolyte multilayers to modulate cell adhesion. ***Biomaterials*** 26 (2005), 6836- 6845.

[222] A. Cardon, N. Chakfe, F. Thaveau, E. Gagnon, O. Hartung, S. Aillet, Y. Kerdiles, Y. M. Dion, J. C. Kretz, C. J. Doillon. Sealing of polyester prostheses with autologous fibrin glue and bone marrow. ***Ann. Vasc. Surg.*** 14 (2000), 543-552.

[223] H. K. Kjaergard, U. S. Weis-Fogh. Autologous fibrin glue for sealing vascular prostheses of high porosity. ***Cardiovasc. Surg.*** 2 (1994), 45-47.

[224] T. Hasegawa, K. Okada, Y. Takano, Y. Hiraishi, Y. Yoshida, Y. Okita. Hybrid small-caliber vascular prosthesis for coronary artery bypass grafting: a preliminary study of plasmin-treated fibrin-coated vascular prosthesis. ***ASAIO J.*** 51 (2005), 725-729.

[225] T. Pfeiffer, M. Kever, K. Grabitz, L. Reiher, K. M. Muller, A. Hildebrand, W. Sandmann. Healing characteristics of small-calibre vascular prostheses coated with plasmin-treated fibrin-an experimental study. ***Vasa.*** 29 (2000), 117-124.

[226] N. Yahyapour, C. Eriksson, P. Malmberg, H. Nygren. Thrombin, kallikrein and complement C5b-9 adsorption on hydrophilic and hydrophobic titanium and glass after short time exposure to whole blood. ***Biomaterials*** 25 (2004), 3171-3176.

[227] Q. Ye, G. Zund, P. Benedikt, S. Jockenhoevel, S. P. Hoerstrup, S. Sakyama, J. A. Hubbell, M. Turina. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. ***Eur. J. Cardiothorac. Surg.***17 (2000), 587-591.

[228] I. K. Jang, H. K. Gold, A. A. Ziskind, R. C. Leinbach, J. T. Fallon, D. Collen. Prevention of platelet-rich arterial thrombosis by selective thrombin inhibition. ***Circulation*** 81 (1990), 219-225.

[229] Y. Zou, H. Dictrich, Y. Hu, B. Metzler, G. Wick, Q. Xu. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. ***Am. J. Pathol.*** 153 (1998), 1301-1310.

[230] A. Westerband, D. Crouse, L. C. Richter, M. L. Aguirre, C. C. Wixon, D. C. James, J. L. Mills, G. C. Hunter, R. L. Heimark. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. ***J. Vasc. Surg.*** 33 (2001), 561-569.

[231] S. Mellander, P. Fogelstrand, K. Enocson, B. R. Johansson, E. Mattsson. Healing of PTFE grafts in a pig model recruit neointimal cells from different sources and do not endothelialize. ***Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*** 30 (2005), 63–70.

[232] J. H. Campbell, J. L. Efendy, C. Han, A. A. Girjes, G. R. Campbell. Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body. ***J. Vasc. Res.*** 37 (2000), 364-371.

Nancy-Université

Université Henri Poincaré

Nom : **Mademoiselle KERDJOUDJ**

Prénom : **Halima-Assia**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : ***INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE***

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 16 janvier 2008

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

24 - 30 rue Lionnois | BP 60120
54003 Nancy Cedex | FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 68 20 00
Fax : +33(0)3 83 68 21 00

info@uhp-nancy.fr | www.uhp-nancy.fr

Résumé

Modification de la surface luminale artérielle par films de polyelectrolytes en vue d'obtenir un substitut vasculaire non thrombogénique.

L'augmentation de la fréquence des pathologies cardiovasculaires ainsi que les limites des thérapies disponibles, conduiront, ces prochaines décennies, à des besoins importants en substituts vasculaires, surtout de faibles calibres. L'objectif de ce travail est d'élaborer de nouvelles matrices naturelles vasculaires, répondant aux qualités nécessaires pour le remplacement de vaisseaux endommagés. Nous avons choisi de valoriser des artères ombilicales humaines cryoconservées et désendothélialisées en les fonctionnalisant avec un film de polyélectrolytes. Ces films sont construits par dépôts alternés d'hydrochlorure de polyallylamine (polycation) et de poly (sodium-4-styrène sulfonate) (polyanion). L'évaluation des propriétés biomécaniques de la paroi du greffon après dépôt du film montre la restauration de son élasticité perdue au cours de la congélation. Pour le développement d'une surface luminale non thrombogène deux approches ont été envisagées : 1)- Favoriser la formation d'un néo-endothélium vasculaire sur un film qui se termine par une couche positive, 2)- Empêcher toute adhésion cellulaire sur la surface luminale chargée négativement. La caractérisation *in vitro* des artères endothélialisées a montré que le film permettait le développement d'un endothélium avec une morphologie proche de l'artère native. Nous observons également une meilleure résistance des cellules au cisaillement. L'implantation chez le lapin d'artères non endothélialisées a montré une bonne fonctionnalité (perméabilité, résistance, structure…) des artères après trois mois d'implantation. Ces résultats encourageants permettent d'envisager une évaluation des substituts fonctionnalisés endothélialisés ou décellularisés chez le gros animal.

Mots Clés : Matrice artérielle naturelle, film multicouche de polyélectrolytes, adhérence cellulaire, cellules endothéliales, substituts vasculaires, ingénierie tissulaire.

Abstract

Modification of the arterial luminal surface by polyelectrolyte film to obtain none thrombogenic vascular substitute.

The enhancement of cardiovascular pathology frequencies and unavailability of the adequate therapies will imply during the next decades an important requirement in vascular substitutes, especially for small calibre. The aim of this study is to elaborate a functional vascular substitute. We present here a new procedure to treat cryopreserved arteries based on their inner surface coating with poly(sodium-4-styrene sulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) polyelectrolyte multilayer (PEM). We show that this treatment improves the mechanical properties of the cryopreserved vessel. In order to elaborate an antithrombogenic luminal surface two approaches have been considered. The first was to improve the endothelium formation when the terminal layer is a polycation. The second was to prevent cell adhesion on the negative luminal surface. *In vitro* results show that PEM allows the endothelial cell spreading and an enhancement of cell retention to shear stress. *In vivo* results show a good graft patency during three months of implantation after rabbit carotid replacement. All these promising results open the route towards the development of future new biocompatible tissue substitutes allowing long-term functionality after implantation.

Keywords: Natural arterial scaffold, polyelectrolyte multilayer film, cell adhesion, endothelial cells, Vascular grafts, tissue engineering.

Spécialité : Bioingénierie cellulaire et tissulaire
Mécanique et Ingénierie cellulaire et tissulaire
Equipe LEMTA-UMR-CNRS 7563
Faculté de médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre Lès Nancy Cedex