

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE EN GÉNIE
CONCENTRATION TECHNOLOGIE DE LA SANTÉ
M. Ing.

PAR
Hicham FADLALLAH

INFLUENCE DE REVÊTEMENTS BIOACTIFS SUR LES CELLULES
ENDOTHÉLIALES: VERS DES PROTHÈSES VASCULAIRES NON THROMBOTIQUES

MONTRÉAL, LE 22 OCTOBRE 2013



Hicham Fadlallah, 2013



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de mémoire
Génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Yahye Merhi, codirecteur de mémoire
Département de médecine à l'Université de Montréal

Mme Natalia Nuño, présidente du jury
Génie de la production automatisée à l'École de technologie supérieure

Mme Nicola Hagemeister, membre du jury
Génie de la production automatisée à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 03 OCTOBRE 2013

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier ma directrice de recherche, Mme Sophie Lerouge pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa patience et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse mes remerciements à mon codirecteur de recherche, M. Yahye Merhi pour son attention, pour ses conseils avisés et sa confiance qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette mémoire. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

Je tiens à remercier tous mes collègues au laboratoire LBeV et au laboratoire de thrombose et hémostasie pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour leur sympathie et leur accueil pendant ma maîtrise. J'aimerais spécifier une grande merci à Bruno La Colla, Pauline Lequoy, Marion Maire, Angel Conteras Gracias, Pradeep Thalla, Houman Savoji, Ahmed Hachem, Rahma Mrad, Lara Bou Khzam, et pour le technicien du microscope confocal Louis Villeneuve.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes parents, mes frères et mes soeurs qui m'ont encouragé à toujours aller plus loin, et qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Je remercie également mon amour Rima pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi. Sans vous je ne serais pas là.

INFLUENCE DE REVÊTEMENT BIOACTIFS SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES: VERS DES PROTHÈSES VASCULAIRES NON THROMBOTIQUES

Hicham FADLALLAH

RÉSUMÉ

Développer des prothèses vasculaires de petit diamètre pour le remplacement de vaisseaux bouchés par l'athérosclérose reste un défi à cause des risques de thrombose. L'ensemencement de cellules endothéliales (CEs), exerçant une fonction antithrombogénique, est une solution prometteuse, mais il faut créer des surfaces favorisant leur adhésion et leur rétention malgré le flux sanguin à la surface. Ce projet de maîtrise consistait à étudier l'effet d'un revêtement polymérisé par plasma riche en amines primaires (appelé LP), associé ou non à des éléments de la matrice extracellulaire (fibronectine (FN) ou chondroïtine sulfate (CS)) sur les CEs et l'hémocompatibilité du polyéthylène téréphtalate (PET). L'adhésion, la croissance et le maintien de CEs du cordon ombilical humain (HUVECs) sur le PET et le LP, en présence et en absence de FN ou de CS, ont été étudiés. De même, l'adhésion plaquettaire sur les différentes surfaces a été évaluée par un test de perfusion avec du sang complet, les plaquettes étant préalablement marquées à la rhodamine. Enfin, un double marquage cellulaire (au Cellview® Maroon pour marquer les HUVECs et anticorps CD61 pour les plaquettes) a été mis au point pour étudier le maintien des CEs en condition de flux sanguin et vérifier leur caractère non thrombogène.

Les résultats obtenus montrent que le revêtement LP et la FN adsorbée augmentent tous deux fortement l'adhésion et la croissance cellulaire sur le PET, cependant sans effet additif lorsque les deux sont combinés. De plus, ils augmentent la rétention cellulaire à la surface, mais celle-ci reste incomplète. De plus, on observe que le revêtement plasma LP augmente fortement la thrombogénicité de la surface, avec une forte adhésion et activation plaquettaire. Cette thrombogénicité est fortement diminuée lorsque les CEs recouvrent la surface, mais la perte de cellules sous l'effet du cisaillement engendré par la perfusion forme des zones d'adhésion plaquettaire non négligeable.

Le greffage de la CS sur le LP permet également une bonne adhésion, croissance et rétention sous cisaillement des HUVECs, sans différence avec le LP seul. De plus la CS diminue très nettement l'adhésion plaquettaire, qui diminue sous la valeur observée pour le PET. Un double marquage cellulaire a permis de montrer que les cellules adhérentes sur le LP+CS ont un phénotype anti-thrombotique et peuvent résister au flux sanguin. Ces travaux suggèrent que le greffage de CS est une stratégie prometteuse pour les prothèses vasculaires étant donné la combinaison de la bonne adhésion des CEs et la faible thrombogénicité de la surface sous-jacente.

Mots-clés: prothèses vasculaires, polymères, revêtement bioactif, thrombogénicité, HUVECs.

INFLUENCE DE REVÊTEMENT BIOACTIFS SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES: VERS DES PROTHÈSES VASCULAIRES NON THROMBOTIQUES

Hicham FADLALLAH

ABSTRACT

Developing vascular prostheses of small diameter to replace vessels closed by atherosclerosis remains a challenge because of the risk of thrombosis. Seeding of endothelial cells, which have antithrombotic properties, is a promising solution, but we must create surfaces which promote their adhesion and retention to resist shear stresses created by the blood flow on the surface. This master's project aimed at investigating the effect of a plasma polymerized coating rich in primary amines (called LP), with or without elements of the extracellular matrix (Fibronectin (FN) or chondroitin sulphate (CS)) on the endothelial cells and hemocompatibility of polyethylene terephthalate (PET). The adhesion, growth and retention of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on PET and LP, in the presence and absence of FN or CS, have been studied. In addition, platelet adhesion on different surfaces was evaluated by a perfusion test with whole blood, platelets being previously labeled with rhodamine. Finally a double fluorescent labeling (using Cellview Maroon to mark the HUVECs and CD61 antibody for platelets) was developed to study the retention of endothelial cells, under blood flow and verify their non thrombotic character.

The results obtained show that both the LP coating and the adsorbed FN, strongly increase both the cellular adhesion and growth on PET; however they have no additional effect when the two are combined. They also augment cellular retention to surface, but this remains incomplete. Moreover we observed that the plasma coating (LP) greatly increases the thrombotic character of the surface, with strong platelet adhesion and activation. This thrombotic character is extremely reduced when endothelial cells cover the surface, but cell loss under the effect of shear produced by the perfusion creates significant areas of platelet adhesion.

The grafting of CS on LP also permits good HUVECs adhesion, growth and retention under shear stress on HUVEC, with no difference from the LP alone. In addition, the CS sharply decreases the platelet adhesion, which is found below the value observed for PET. The double cell labeling also showed that cells adhered on LP+CS has an anti-thrombotic phenotype and can resist blood flow. These studies suggest that a coating of CS is a promising strategy for vascular prosthesis given the combination of the good adhesion of endothelial cells and the low thrombotic character of the underlying surface.

Keywords: vascular prostheses, polymers, bioactive coating, thrombotic character, HUVECs.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1.1 Le système vasculaire : composantes, propriétés et pathologies.....	3
1.1.1 Le milieu sanguin.....	3
1.1.2 Paroi artérielle normale.....	3
1.2 Cellules endothéliales.....	5
1.2.1 Endothélium vasculaire.....	5
1.2.2 Les cellules endothéliales et leurs rôles.....	5
1.2.3 Processus de coagulation et fibrinolyse.....	6
1.2.4 Implication des plaquettes dans l'agrégation et la coagulation.....	9
1.2.5 Influence de CEs sur l'hémostase.....	10
1.2.6 L'athérosclérose.....	11
1.3 Substituts vasculaires.....	13
1.3.1 Les substituts vasculaires autologues.....	13
1.3.2 Les substituts vasculaires d'origine synthétique (prothèses vasculaires synthétiques).....	14
1.3.3 Limite des prothèses vasculaires synthétiques.....	16
1.4 Pré-ensemencement des prothèses synthétiques pour améliorer leur performance clinique.....	17
1.5 Modification de surface pour le pré-ensemencement par CEs.....	18
1.5.1 Modifications physico-chimiques.....	18
1.5.2 Modifications par biofonctionnalisation.....	21
1.6 Impact du cisaillement sur les CEs.....	22
1.7 Travaux antérieurs du laboratoire pour un revêtement bioactif.....	25
1.8 Conclusions de la revue de littérature et objectifs.....	26
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	29
2.1 Préparation des surfaces.....	29
2.1.1 Revêtement polymérisé par plasma (LP).....	30
2.1.2 Surfaces contrôle.....	30
2.1.3 Adsorption de la Fibronectine.....	30
2.1.4 Greffage de la CS et de l'EGF.....	31
2.2 Adhésion et croissance des HUVECs sur les surfaces bioactives.....	32
2.2.1 Culture cellulaire des HUVECs.....	32
2.2.2 Adhésion cellulaire.....	32
2.2.3 Croissance cellulaire.....	33
2.3 Étude de la thrombogenicité des surfaces.....	33
2.3.1 Système de perfusion.....	34
2.3.2 Calcul du taux de cisaillement (S.R. pour « Shear rate » en anglais).....	35
2.3.3 Prélèvement sanguin.....	37
2.3.4 Isolation des plaquettes.....	37
2.3.5 Mesure de l'adhésion plaquettaire par marquage des plaquettes à l'indium ¹¹¹	38

2.3.6	Coloration plaquettaire à la Rhodamine	39
2.3.6.1	Coloration du sang complet	39
2.3.6.2	Coloration des plaquettes isolées	40
2.3.7	Évaluation de l'adhésion plaquettaire	41
2.3.7.1	Comptage des plaquettes en fluorescence.....	41
2.3.7.2	Étude de l'activation plaquettaire par microscopie électronique à balayage	42
2.4	Stabilité des HUVECs sous cisaillement et leur propriété non-thrombogénique sur les différentes surfaces.....	43
2.4.1	Coloration des HUVECs au Cellvue Maroon.....	43
2.4.2	Coloration des plaquettes avec anti-CD61/FITC.....	43
2.4.3	Test de thrombogénicité sous force de cisaillement en présence des HUVECs	43
2.5	Analyse statistique	44
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		45
3.1	Optimisation des revêtements bioactifs pour la formation d'une couche endothéliale.....	45
3.1.1	Adhésion et croissance des HUVECs en présence et en absence de fibronectine	45
3.1.2	Étude du maintien des HUVECs sous condition de flux en présence et en absence de FN.	47
3.1.3	Étude de l'effet de la Chondroïtine sulfate sur l'adhésion et la croissance des HUVECs	50
3.2	Étude de la thrombogénicité des surfaces par perfusion.....	51
3.3	Effet sur le maintien des HUVECs durant la perfusion et de la thrombogénicité de surfaces après ensemencement cellulaire.	56
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVE.....		63
4.1	Synthèse des principaux résultats	63
4.2	Difficultés rencontrées et limites du projet.....	69
4.3	Perspectives	69
CONCLUSION		71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		73

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Modèle d'organisation de la paroi	4
Figure 1.2	Facteurs synthétisés par les CEs.....	6
Figure 1.3	Les voies et les facteurs de la coagulation.....	8
Figure 1.4	Les étapes de formation de la sténose et de la thrombose sur une plaque athéromateuse.	11
Figure 1.5	Schéma d'un pontage vasculaire veineux (veine saphène) et artériel (artère mammaire interne).....	13
Figure 1.6	Prothèse en poly (éthylène téréphtalate) tricotée (A et B) et tissée (C et D) A et C : aspect macroscopique. B et D : observation de la surface interne des prothèses par microscopie électronique à balayage	15
Figure 1.7	Exemples de techniques de modifications de surface favorisant l'endothélialisation.....	20
Figure 1.8	Contrainte mécanique exercée sur la paroi artérielle.....	23
Figure 1.9	La contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement dans les différents vaisseaux. Les vaisseaux de petit diamètre ont un diamètre et un flux situé entre les artères et les artérioles	23
Figure 1.10	Le shear stress laminaire (15 dynes/cm^2 pendant 24h) induit la réorganisation du cytosquelette et l'alignement de CEs	24
Figure 1.11	Réponse de CEs en fonction du flux	25
Figure 1.12	Immunocoloration des HUVECs adhérentes à 24h. Actine (vert) / Vinculin (orange) / noyaux (bleu). Les fibres terminées par vinculine sont la marque des adhésions focales.....	26
Figure 2.1	Schéma du réacteur plasma utilisé.....	29
Figure 2.2	Greffage de la CS et de l'EGF sur le LP	31
Figure 2.3	Les différentes surfaces testées.....	32
Figure 2.4	Chambre de perfusion contenant une fenêtre de diamètre intérieur de 2 mm et de 10 mm de longueur qui est fermée par un capuchon en plastique et resserré avec une vis.....	34

Figure 2.5	Système de perfusion constituant : la pompe péristaltique, les chambres et les tubulures de connexion.	35
Figure 2.6	Surfaces (LP et PET) exposées en perfusion de 15 min au sang complet marqué à la rhodamine. Les plaquettes sont marquées à la rhodamine.....	40
Figure 2.7	HUVECs sur le PET après 7 jours de culture suivis d'une perfusion de 15 min au sang complet marqué à la rhodamine. Les cellules sont marquées au Cellvue Maroon, mais se colorent aussi en rouge sous l'effet de la rhodamine, ce qui empêche de bien visualiser les plaquettes adhérees	40
Figure 2.8	Adhésion des plaquettes sur des surfaces en PET et LP exposées, à des suspensions des plaquettes isolées et marquées avec la rhodamine, pendant 15 min à un débit de 40 mL/min.....	41
Figure 3.1	Adhésion (4h) des HUVECs sur les différentes surfaces en (PCP+gélatine, PET et LP, avec (+) et sans (-) FN). Coloration par cristal violet. (Microscopie optique, x100).....	45
Figure 3.2	Croissance des HUVECs après 7 jours en présence et en absence de (FN). Coloration par cristal violet. (Microscopie optique, x100).	46
Figure 3.3	Graphique représentant les densités moyennes par $\text{cm}^2 \pm$ écart type (n= 5 à 8) de l'adhésion et la croissance des HUVECs en absence et en présence de la FN. (* $p < 0.05$, PET est significativement différents des autres surfaces. $^{\&}p < 0.05$, PET est significativement différents de LP Fibro).	47
Figure 3.4	Adhésion des cellules HUVECs sur le PET et le LP, sans (-) et après (+) 15 min. de perfusion, en absence et présence de Fn (microscopie optique, x50).....	48
Figure 3.5	Graphique représentant les densités moyennes \pm écart type (n= 6 à 10), après 7j de la croissance des HUVECs avec et sans perfusion (* $p < 0.005$ par rapport aux autres surfaces sans perfusion). ($^{\&}p < 0.0001$ par rapport aux autres surfaces avec perfusion).....	49
Figure 3.6	Croissance cellulaire des HUVECs après 1, 4 et 6 jours de culture sur le PCP, le PET, le LP en absence et présence de CS greffée, évaluée par coloration au cristal violet. (Microscopie optique, x50). Les résultats sont exprimés en pourcentage \pm Écart type par rapport à la valeur initiale à J1 sur le PET (n = 12, * $p < 0,05$ par rapport à toutes les autres surfaces).....	51
Figure 3.7	Adhésion des plaquettes sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP et greffées avec la CS (LP+CS) sans ou avec EGF (LP+CS+EGF). Perfusion de sang complet marqué avec la rhodamine.	52

Figure 3.8	Pourcentage de la surface recouverte par des plaquettes après perfusion au sang complet marqué avec la rhodamine, pour les différentes surfaces (PET vierge et PET avec revêtement de LP, LP+CS et LP+CS+EGF). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm Écart type (n = 5-7, *p<0.0001).....53
Figure 3.9	Observation par MEB de la morphologie des plaquettes suite à leur adhésion sur différentes surfaces de PET recouvert ou non de LP, et greffées avec la CS (LP+CS) sans ou avec EGF (LP+CS+EGF).....55
Figure 3.10	Adhésion des plaquettes suite à leur exposition sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP et greffées avec la CS (LP+CS). Cette expérience a été faite avec du sang complet contenant des plaquettes marquées à l'indium ¹¹¹ . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm Écart type (n = 10, *p<0.0001).....56
Figure 3.11	Adhésion des plaquettes sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP (LP) et greffées avec la CS (LP+CS). Cette expérience a été faite avec du sang complet. Les plaquettes adhérentes sur les surfaces après la perfusion ont été marquées avec un anti-CD61/FITC.....57
Figure 3.12	Surfaces de PET, LP et LP+CS après croissance des HUVECs (7j) (Marquage au Cellvue Maroon) avant et après perfusion de 15 min au sang complet. Les plaquettes adhérentes sur les surfaces après la perfusion ont été marquées avec un anti-CD61/FITC. (microscopie confocale, grossissement 10x).58
Figure 3.13	Pourcentage de surface de PET, LP et LP+CS recouvertes par les plaquettes après perfusion en présence (+HUVEC) et en absence (-HUVEC) de cellules préalablement ensemencées. Cette expérience a été faite avec du sang complet. Marquage des plaquettes après la perfusion avec un anti-CD61/FITC. Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne \pm Écart type, n \geq 7 (*p<0.0001 par rapport à toutes les autres conditions)59
Figure 3.14	Maintien des HUVEC durant la perfusion : densité cellulaire sur différentes surfaces soumises ou non à une perfusion de sang complet. Les HUVECs ont été marquées avec le CellVue maroon. Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne \pm Écart type, (n = 7 *p<0.0001 par rapport au PET non perfusé et aux autres surfaces perfusées).60
Figure 3.15	Pourcentage de rétention cellulaire sur les différentes surfaces (PET vierge, PET avec LP avec et sans greffage de CS (LP et LP+CS). Cette expérience a été faite avec du sang complet. Marquage des HUVECs au CellVue maroon. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm Écart type (n \geq 7; *p<0.0001 par rapport aux autres surfaces)..... 61

Figure 4.1 Structure chimique de la CS qui présente le groupement sulfonate (SO-O_3^-)
chargé négativement.....67

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACD	Anticoagulant citrate-dextrose
ADP	Adénosine diphosphate
BSA	Sérum-albumine bovine
CEs	Cellules endothéliales
CMLs	Cellules musculaires lisses
CS	Chondroïtine-4-Sulfate
EGF	Facteur de croissance épidermique
FN	Fibronectine
HUVECs	Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain
LP	<i>Low-pressure – Plasma Polymerized Ethylene: Nitrogen-rich</i>
MEB	Microscopie électronique à balayage
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS	Tampon phosphate salin
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polyéthylène téréphtalate
PGI	Prostacycline
PPACK	DPhenylalanyl-L-prolyl-L-argininechlorométhylcétone
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRP	Plasma riche en plaquettes
PTFE	Poly (tétrafluoroéthylène)
RGD	Arginine (ARG); Glycine (GLY); Acide aspartique (ASP)

XVIII

TXA2	Thromboxane A2
PCP	Tissue de Culture Polystyrène
TF	Facteur tissulaire
TFPI	Inhibiteur du facteur tissulaire
tPA	Activateur du plasminogène
vWF	Facteur Willebrand

INTRODUCTION

Les maladies vasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde et d'invalidité dans les pays occidentaux. L'athérosclérose, pathologie complexe et multifactorielle de la paroi artérielle, entraîne un rétrécissement progressif de la lumière vasculaire conduisant à un manque d'irrigation des tissus qui peut être mortel (infarctus, accident vasculaire, cérébral, etc.). Ces pathologies nécessitent, en dernier recours, la réalisation d'un pontage vasculaire pour remplacer ou éviter les régions athérosclérotiques bouchées. Ces pontages peuvent être effectués à l'aide des greffons vasculaires autologues (veine saphène, artère mammaire), mais cette technique présente plusieurs inconvénients et ces vaisseaux ne sont pas disponibles chez tous les patients. Dans ce cas, le recours à une prothèse synthétique à base de polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) ou Polyéthylène téréphtalate (PET) reste le meilleur moyen pour substituer les vaisseaux pathologiques.

À ce jour, les prothèses vasculaires ont montré une efficacité acceptable pour le remplacement d'artère de gros diamètre, mais le traitement des vaisseaux de diamètre interne inférieur ou égal à 6 mm reste problématique. En effet, la durée de vie de ces prothèses vasculaires est souvent limitée par le risque d'occlusion par formation de caillot sanguin et/ou d'hyperplasie intimale à proximité de l'anastomose. Ceci est dû au fait que les polymères synthétiques utilisés dans la fabrication des prothèses vasculaires synthétiques sont relativement biocompatibles, mais tout de même thrombogènes dans les zones de faible flux. Pour limiter ces réactions, il est nécessaire d'utiliser des traitements antithrombotiques qui peuvent être responsables de complications hémorragiques.

L'une des approches considérées comme une solution prometteuse à ce problème consiste en l'endothélialisation des prothèses synthétiques, c'est-à-dire le recouvrement de la surface interne du polymère par une monocouche de cellules endothéliales (CEs). Un tel substitut biohybride posséderait ainsi les propriétés anti-thrombotiques nécessaires à la passivation et la fonctionnalité des substituts vasculaires. Cette démarche est malheureusement limitée par la faible croissance cellulaire et la faible rétention cellulaire sous le flux sanguin. L'utilisation

de revêtements bioactifs qui favorisent la croissance, l'adhésion cellulaire et la résistance au cisaillement peut être une solution à l'échec de la greffe synthétique.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise consiste à étudier l'efficacité de revêtements bioactifs développés au laboratoire en tant que surface anti-thrombotique et d'évaluer différentes surfaces bioactives afin d'améliorer l'adhésion et la croissance de CEs. En particulier, l'effet d'un revêtement polymérisé par plasma riche en amines primaires, de la fibronectine (FN) et la chondroïtine sulfate (CS) sur les CEs et l'adhésion et activation plaquettaire a été étudié.

Ce rapport présente tout d'abord, au chapitre 1, la revue de littérature. Le système vasculaire, le rôle de CEs, les pathologies vasculaires et les prothèses vasculaires utilisées dans le marché sont présentées. Les limites des prothèses actuelles et la stratégie de pré-ensemencement par des CEs sont expliquées, puis les modifications de surfaces proposées, notamment par le groupe de recherche. À la fin, un rappel des travaux antérieurs du laboratoire pour un revêtement bioactif est effectué et le choix des modifications de surface utilisées dans ce projet est justifié. Le chapitre 2 présente des méthodes utilisées pour atteindre nos objectifs et le chapitre 3 présente les résultats obtenus. S'en suit une discussion générale au chapitre 4, suivie de la conclusion et des perspectives futures.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le système vasculaire : composantes, propriétés et pathologies

Le système circulatoire humain est composé de trois types de vaisseaux sanguins: les artères, les veines et les capillaires dans lesquels circule le sang.

1.1.1 Le milieu sanguin

Le milieu sanguin est constitué du plasma et de cellules. Le plasma sanguin constitue 55 à 60 % du volume du sang et les cellules sanguines représentent 40 à 45 % du volume du sang. Ces cellules sont réparties en trois catégories: les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes (thrombocytes) (Tortora, 1988).

Les plaquettes sont des cellules dépourvues de noyau; leur nombre est d'environ $2 \text{ à } 4 \times 10^8$ /ml de sang. Elles ont pour rôle le maintien de l'hémostase par le potentiel adhésif des plaquettes sur les surfaces vasculaires endommagées et leur implication dans la coagulation sanguine.

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 et crée des contraintes de cisaillement sur les CEs (Tortora, 1988).

1.1.2 Paroi artérielle normale

La paroi artérielle est composée de trois couches (Figure 1.1) :

- La couche externe ou l'adventice, formée de tissus connectifs qui font des liens avec les tissus environnants et permettent la vascularisation des gros vaisseaux.
- La couche médiane ou média, composée de cellules musculaires lisses (CMLs) et de matrices extracellulaires. Les CMLs synthétisent plusieurs protéines, comme les protéoglycanes, le collagène, la gélatine, la laminine et l'élastine, qui contribuent au maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité de la paroi artérielle (Henderson EL, 1999).
- La couche interne ou intima est composée d'un sous-endothélium soutenant une mono-couche de CEs qui tapisse la lumière des vaisseaux (Figure 1.1). Le rôle et la fonction de ces cellules sont décrits en détail ci-après.

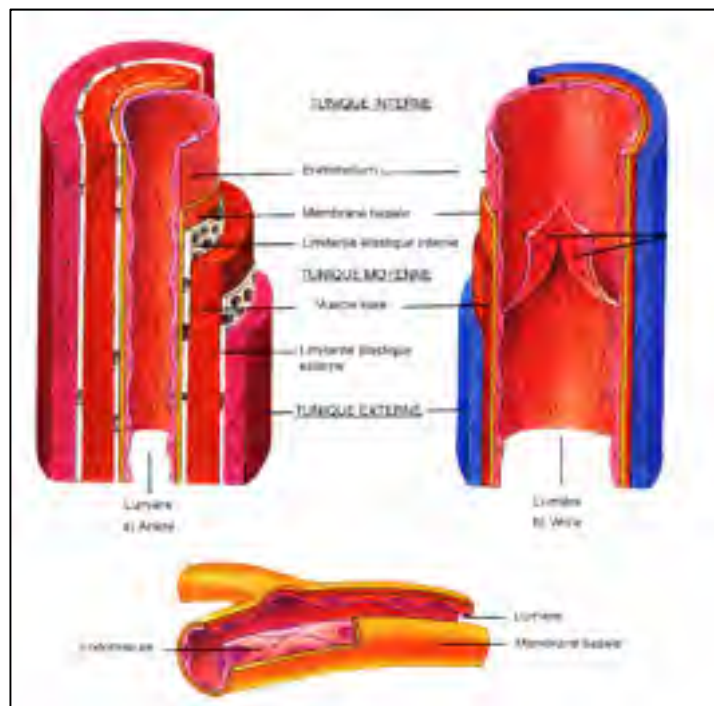


Figure 1.1 Modèle d'organisation de la paroi
(a) d'une artère (b) d'une veine

Tirée du site internet

<http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/>

1.2 Cellules endothéliales

1.2.1 Endothélium vasculaire

L'endothélium représente la couche cellulaire interne de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques. C'est un tissu constitué approximativement de $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ cellules qui couvre une surface de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ et représente approximativement 1 % du poids d'un individu. Il est formé d'une monocouche continue de CEs et il occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. Les CEs mesurent entre $0,3 - 0,5 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, $25 - 50 \text{ }\mu\text{m}$ de longueur et $15 \text{ }\mu\text{m}$ de largeur. Elles ont une forme polygonale et leur juxtaposition forme un tapis en mosaïque. Les CEs *in vivo* sont polarisées et reposent sur une matrice sous-endothéliale thrombogène composée de collagène, élastine, FN et laminine (Aird, 2007) qu'elles synthétisent. Les CEs ont la capacité non seulement de produire, mais aussi de remodeler les éléments de leur stroma (Langille, 1993).

1.2.2 Les cellules endothéliales et leurs rôles

Les CEs jouent divers rôles importants, résumés brièvement par la Figure 1.2. Elles forment une barrière semi-perméable sélective, qui autorise et régule les échanges de molécules entre le sang et les tissus. Elles jouent un rôle important dans le transport du glucose et des acides aminés par l'intermédiaire d'invaginations de la membrane cellulaire et de jonctions serrées (Galley et Webster, 2004). De plus, elles synthétisent et sécrètent de nombreuses substances qui diffusent et influencent la fonction des CMLs, des plaquettes et des leucocytes circulants. Elles jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse (Schwartz et Liaw, 1993) ainsi que dans les réponses inflammatoires et immunitaires, en exprimant notamment des molécules d'adhésion (Dejana, 1993) et en sécrétant des médiateurs lipidiques (Peter *et al.*, 1997). Enfin, elles jouent un rôle essentiel dans l'hémostase, processus physiologique qui permet l'écoulement sanguin dans nos vaisseaux sains et permet d'interrompre le saignement pour éviter l'hémorragie en cas de dommage au vaisseau. Les CEs interviennent dans la fonction plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse décrites ci-dessous.

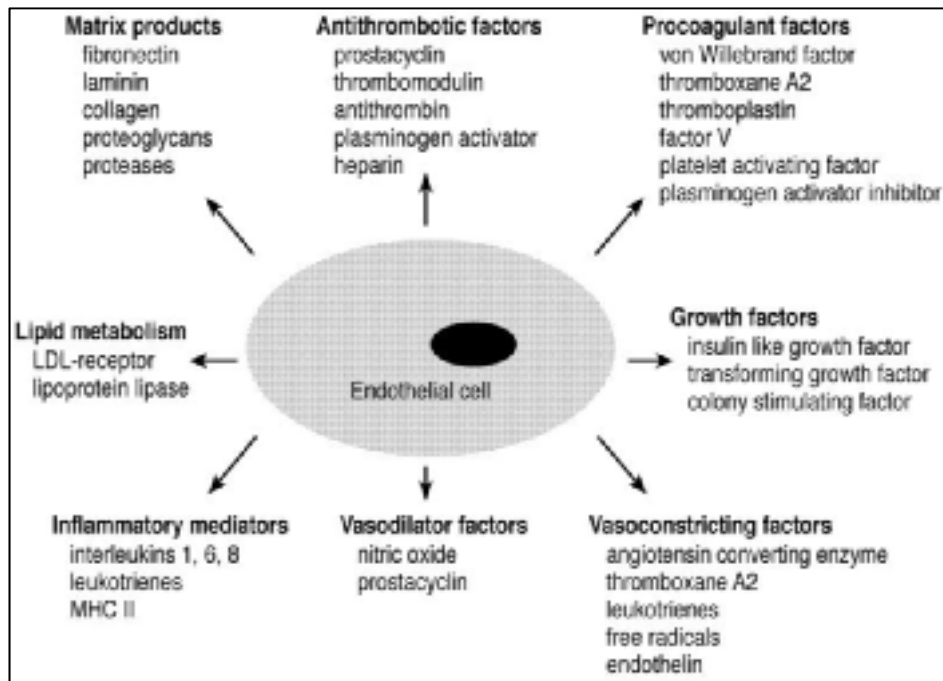


Figure 1.2 Facteurs synthétisés par les CEs
Tirée de (Galley et Webster, 2004)

1.2.3 Processus de coagulation et fibrinolyse

La coagulation est une cascade d'activation enzymatique qui mène à la formation d'un caillot sanguin. Le mécanisme de coagulation passe par deux voies: voie intrinsèque et voie extrinsèque, qui sont résumées à la Figure 1.3.

Le mécanisme de coagulation se base sur trois étapes (Tortora, 1988) :

- Première étape : la formation d'un activateur de la prothrombine par les voies intrinsèque et extrinsèque.
- Deuxième étape : la conversion de la prothrombine (une protéine plasmatique formée par le foie) en thrombine (une enzyme) par l'activateur de la prothrombine.

- Troisième étape : la conversion du fibrinogène (une autre protéine plasmatique formée par le foie) en fibrine insoluble par la thrombine. La fibrine forme les filaments du caillot.

La formation de l'activateur de la prothrombine est déclenchée par l'interaction des mécanismes extrinsèque et intrinsèque de la coagulation.

Le mécanisme extrinsèque de la coagulation s'effectue rapidement, en quelques secondes, dans le cas d'un traumatisme. On l'appelle ainsi parce que la formation de l'activateur de la prothrombine est déclenchée par des substances libérées par les vaisseaux sanguins lésés ou les tissus environnants, à l'extérieur du sang (Tortora, 1988).

Le mécanisme intrinsèque de la coagulation est plus complexe, et il s'effectue plus lentement, habituellement en quelques minutes. Il s'appelle ainsi parce que la formation de l'activateur de la prothrombine est déclenchée par une substance présente à l'intérieur du sang. Le mécanisme intrinsèque est déclenché lorsque le sang entre en contact avec les fibres du collagène sous-jacentes des vaisseaux sanguins lésés.

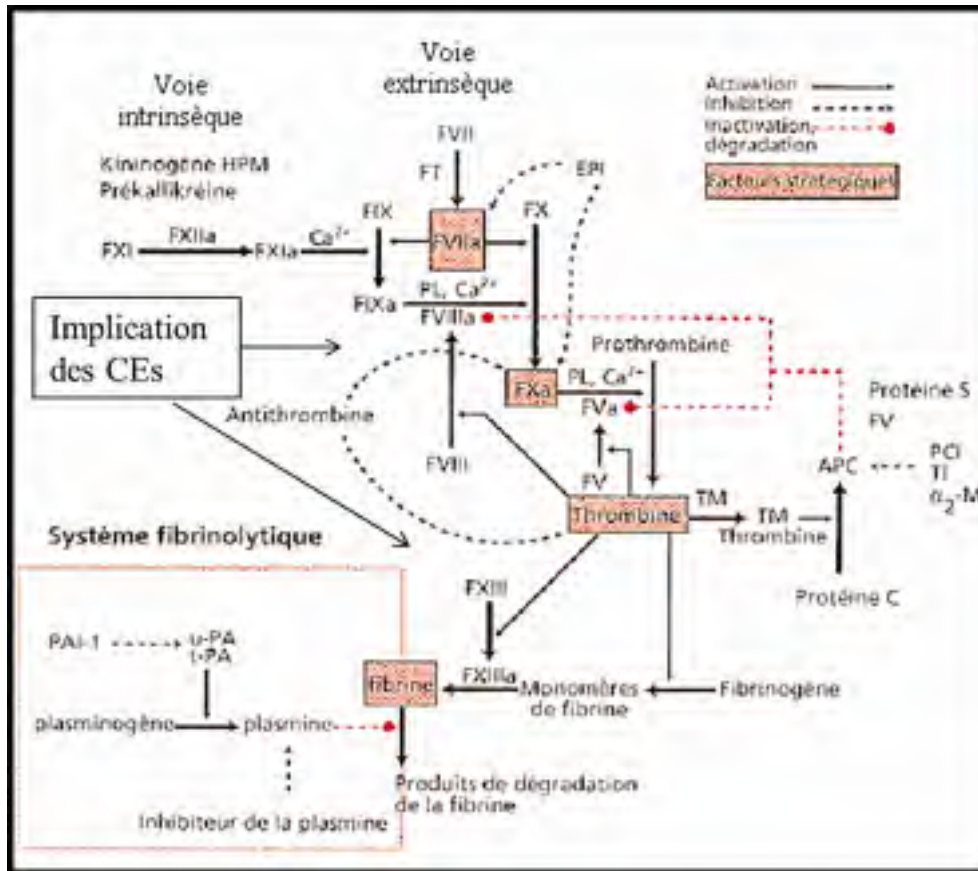


Figure 1.3 Les voies et les facteurs de la coagulation

Tirée du site internet

http://www.biogenic.fr/cq/textes/t_hemostase_shema.html

Si un caillot est formé, il peut être lysé par le mécanisme de fibrinolyse qui consiste en la dissolution du caillot de fibrine. En effet, une enzyme fibrinolytique plasmatique appelée plasminogène est incorporée dans le caillot. Les tissus de l'organisme et le sang contiennent des substances qui peuvent transformer la plasminogène en plasmine. Une fois que la plasmine est formée, elle peut dissoudre le caillot en digérant les filaments de fibrine et en inactivant des substances comme le fibrinogène et la prothrombine (Tortora, 1988).

1.2.4 Implication des plaquettes dans l'agrégation et la coagulation

Les plaquettes sont les plus petites cellules sanguines dont la principale caractéristique est leur absence de noyau. Lorsqu'elles sont dans un état quiescent, les plaquettes sont discoïdes avec une membrane lisse. L'adhésion plaquettaire se fait par des agonistes plaquettaires qui se collent au sous-endothélium grâce au facteur Willebrand, au collagène, et à la thrombine (Martin, 2006). Les plaquettes adhérees s'activent et deviennent plus sphériques; elles redistribuent à partir de leurs granules intracellulaires des substances vasoactives comme l'adénosine diphosphate (ADP) et le Thromboxane A2 (TXA2) vers leur surface, qui leur permettent d'adhérer et de s'étaler; elles se fixent à d'autres plaquettes circulantes en développant des extensions membranaires, notamment la formation de filopodes et de lamellipodes, ce qui favorise la formation d'agrégat plaquettaire. Des molécules d'adhésion comme les sélectines permettront aux plaquettes d'interagir avec d'autres types cellulaires dont les globules blancs ou leucocytes. Des interactions adhésives entre les plaquettes et les leucocytes jouent un rôle de premier plan dans l'inflammation, la coagulation, l'agrégation et la thrombose (Rinder *et al.*, 1991). L'agrégation plaquettaire se fait ainsi grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un thrombus. Elles s'agrègent au niveau des surfaces vasculaires blessées ou thrombogènes et mènent à la formation du thrombus.

Les plaquettes interviennent dans la coagulation : lorsque la plaquette est activée, les phospholipides membranaires se transforment en prostaglandines puis en TXA2 qui est un activateur plaquettaire (FitzGerald, 1991). Suite à l'activation plaquettaire, la libération des molécules servira de support à la coagulation, comme le calcium et le facteur tissulaire (TF), qui favorisent les voies intrinsèques et extrinsèques et participent à la transformation de la prothrombine en thrombine. Celle-ci, comme nous l'avons vu, transforme alors le fibrinogène en fibrine (Blockmans, Deckmyn et Vermynen, 1995).

1.2.5 Influence de CEs sur l'hémostase

En s'interposant de façon ininterrompue entre le sang et les substances sous-endothéliales procoagulantes, les CEs préviennent l'activation de la coagulation et des plaquettes. De plus, ces cellules sont douées de propriétés de synthèse extrêmement importantes : elles synthétisent des facteurs pro- et anti-coagulants impliqués dans l'hémostase (Tableau 1). Ainsi, elles peuvent activer la coagulation en exprimant à leur surface du facteur tissulaire (TF), mais peuvent aussi l'inhiber en exprimant de la thrombomoduline. De même pour la fibrinolyse, elles synthétisent un activateur, l'activateur du plasminogène (t-PA) et son inhibiteur, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) (Shireman et Pearce, 1996).

En temps normal, les CEs sont anti-thrombotiques. Elles sécrètent des facteurs anti-coagulants tels que la prostacycline (PGI₂), la thrombomoduline, et l'activateur du plasminogène (tPA). L'endothélium a alors un effet anti-inflammatoire, antioxydant et anti-thrombotique (Cunningham et Gotlieb, 2005). Par contre, lorsqu'elles sont activées, elles deviennent prothrombotiques, expriment le facteur Willebrand (vWF) et le TF, et seront le support des réactions aboutissant à la coagulation du sang.

Tableau 1 Régulation de la coagulation par les CEs
Adapté de (Shireman et Pearce, 1996)

Procoagulant	Anticoagulant
Thromboxan	Prostacyclin
Von willebrand factor	Protein C
Interleukin-1	Protein S
Platelet activating factor	Thrombomodulin
Phospholipids	Heparan sulfate
Tissue factor	Tissue factor pathway inhibitor
Plasminogen activator inhibitor type 1	Tissue type plasminogen activator

1.2.6 L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie chronique de la paroi artérielle, d'évolution lente, pouvant mener à des événements ischémiques aigus tels que l'infarctus du myocarde. Elle est causée par une accumulation de lipides, de glucides, de produit sanguin et de tissu fibreux ce qui provoque des modifications du média par la formation d'une plaque artérioscléreuse (Lusis, 2000). Elle touche les artères de gros calibre comme les aortes, mais elle peut atteindre les vaisseaux de petits calibres par exemple les artères coronaires. Le développement de cette plaque artérioscléreuse tapissant la paroi interne des artères peut obstruer partiellement (sténose), ou totalement (occlusion) la circulation sanguine (Figure 1.4).

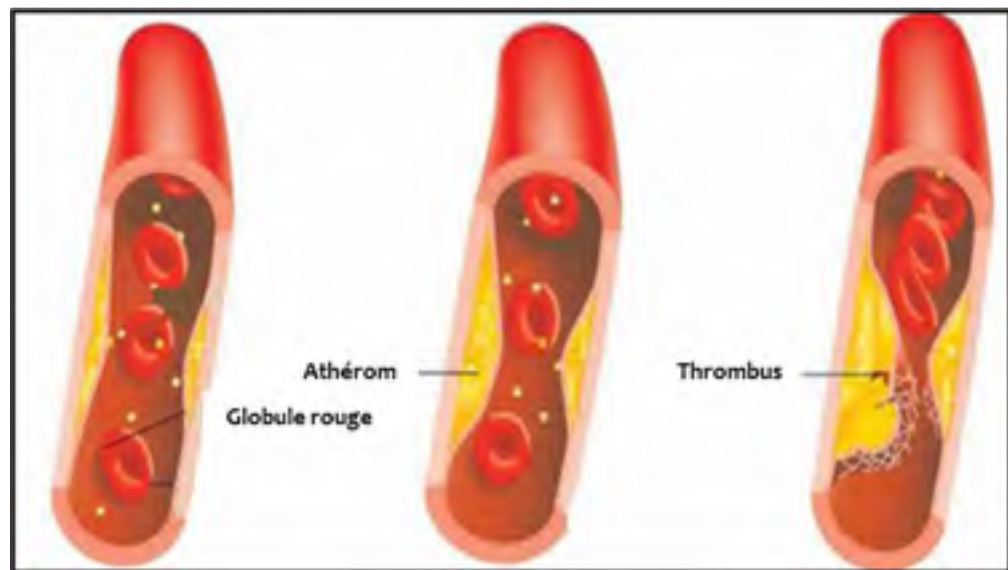


Figure 1.4 Les étapes de formation de la sténose et de la thrombose sur une plaque athéromateuse.

Adaptée du site internet www.prevention-cardio.com

La mortalité et la morbidité associées à la maladie athérosclérotiques sont essentiellement liées aux complications thromboemboliques de la rupture de plaque. Il est largement admis que l'évènement initial entraînant la formation d'un thrombus au niveau d'une plaque athéroscléreuse est la rupture (60% des cas) ou l'érosion (40% des cas) de la plaque, abolissant l'interface endothéliale et mettant en contact le matériel thrombogène contenu dans la plaque avec le sang circulant (Taubman *et al.*, 1997). Le thrombus formé peut

évoluer à terme jusqu'à obstruer totalement la lumière du vaisseau et arrêter le flux sanguin, et donc l'irrigation des tissus en amont. Ceci peut avoir des conséquences ischémiques très graves (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux ischémiques, ischémies aiguës des membres inférieurs) (Tortora, 1988).

La dysfonction endothéliale joue un rôle important dans le processus menant à cette pathologie. Les phénomènes observés sont :

- Une vasoconstriction avec une augmentation de la perméabilité endothéliale, une expression des protéines adhésives pour les plaquettes et les leucocytes, modulant ainsi les réactions thrombotiques et inflammatoires. Une activation des plaquettes suivie d'une coagulation favorisant la thrombose.

- Une altération de la fonction endothéliale causée par une augmentation des protéines oxydatives ou encore par les facteurs de risque (Roquer *et al.*, 2009).

La dysfonction endothéliale participe donc non seulement à l'initiation d'athérosclérose, mais aussi à la progression et l'évolution des plaques d'athérome conduisant à la thrombose.

Deux principaux types de procédures sont utilisés pour le traitement des artères obstruées :

- 1) Les techniques de réparation endovasculaire (angioplastie, stent, stent-grafts), non discutés ici. Bien que moins invasifs, ils ne sont pas toujours utilisables (zone malade trop étendue, etc.).

- 2) Les techniques de remplacement par un substitut vasculaire. Il existe 3 types de substituts vasculaires qui seront détaillés ci-après : les substituts biologiques, synthétiques et ceux issus de l'ingénierie tissulaire (Bordenave, Menu et Baquey, 2008). Ils connaissent un succès variable selon le type de pathologie et surtout le diamètre du vaisseau à remplacer.

1.3 Substituts vasculaires

1.3.1 Les substituts vasculaires autologues

Les substituts autologues, ou autogreffes se divisent en deux types, veineux et artériels.

L'un des matériaux utilisés avec succès pour les procédures de pontage de faible diamètre est la veine saphène du patient lui-même. Ce greffon est utilisé de façon importante du fait de sa longueur et de son diamètre qui est similaire à ceux des artères coronaires et fémorales ou poplitées (Wang *et al.*, 2007) (Figure 1.5).

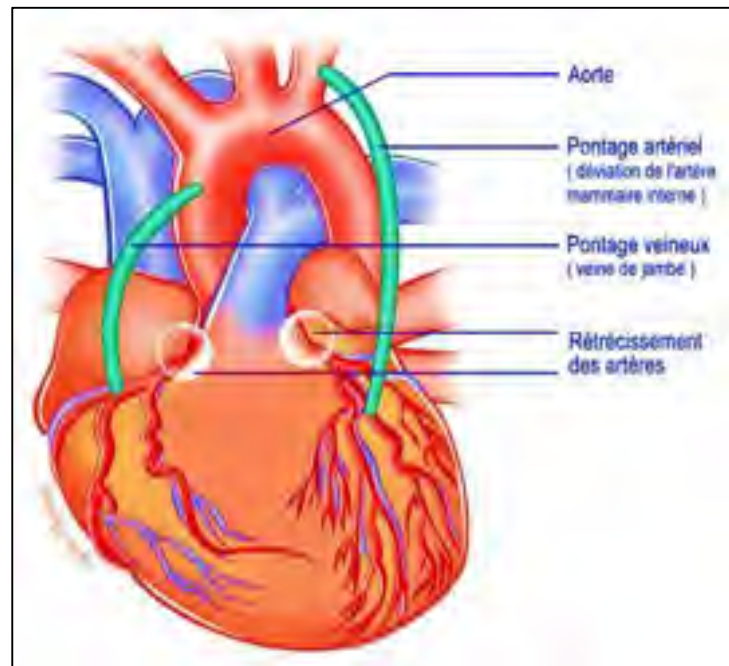


Figure 1.5 Schéma d'un pontage vasculaire veineux (veine saphène) et artériel (artère mammaire interne)

Tirée du site internet

<http://heartofthetechnology.wordpress.com/2012/12/17/ii-le-pontage/>

Présentement, il est reconnu que les substituts autologues artériels et veineux restent les matériaux de remplacement de choix pour les pontages coronariens et périphériques. Goldman et al. ont fait des études montrant que 85 % de cas de pontage avec des artères

mammaires ont une perméabilité à dix ans par rapport à 61 % pour l'utilisation de veines saphènes (Goldman *et al.*, 2004). Les performances nettement supérieures des veines saphènes et des artères mammaires autologues à tout autre substitut artériel sont en grande partie reliées à la présence de CEs qui recouvrent leur surface luminale et à l'absence de réactions immunitaires.

L'artère mammaire interne (Figure 1.5) représente des performances supérieures à celle de la veine saphène, toutefois, son utilisation est difficile et limitée par son accessibilité anatomique.

Les inconvénients majeurs qui limitent l'utilisation des pontages artériels biologiques sont le nombre réduit des sites de prélèvement, la difficulté de dissection et leur fragilité (Canver, 1995). Dans le cas d'une limitation de la disponibilité d'artères ou de veines pour la réalisation du pontage, l'implantation d'un autre type de substitut est nécessaire comme les substituts synthétiques (Couet, Rajan et Mantovani, 2007).

1.3.2 Les substituts vasculaires d'origine synthétique (prothèses vasculaires synthétiques)

Ces substituts sont élaborés à partir de deux polymères principaux comme le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) et le polyéthylène téréphtalate (PET). Ces matériaux se sont imposés en raison de leur grande inertie et de leur relativement bonne hémocompatibilité.

Prothèses en polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Le polytétrafluoroéthylène expansé, ePTFE, ou Teflon, a des caractéristiques exceptionnelles. En effet, ce polymère linéaire thermoplastique présente une excellente stabilité biologique, une résistance thermique à haute température (stérilisable à la chaleur contrairement au PET), et il conserve ses propriétés mécaniques et chimiques dans la plupart des environnements. Sa surface est hautement électronégative et hydrophobe, ce qui minimise sa réactivité avec les

cellules sanguines (Xue et Greisler, 2003). Ces propriétés, associées à sa neutralité et sa bonne hémocompatibilité en font le matériau de choix pour la réalisation de substituts vasculaires quand un pontage autologue n'est pas disponible. Cependant, il est à noter que l'hydrophobie du PTFE empêche l'adhésion des CEs ce qui constitue un handicap pour la substitution des vaisseaux de petit calibre. Malgré ce handicap, le PTFE reste le matériel synthétique le plus utilisé pour les pontages fémoropoplités et axillo-fémoraux.

Prothèses en polytéréphtalate d'éthylène (PET)

L'autre polymère couramment utilisé pour les prothèses vasculaires est le PET ou Dacron®. Ce polymère dur et rigide présente une bonne stabilité bidimensionnelle et une bonne résistance chimique. Sa cristallinité est variable et son taux d'absorption d'eau est faible. Il se présente sous la forme textile tricotée ou tissée (Figure 1.6) qui lui confère une meilleure compliance que le PTFE, une bonne porosité et une bonne suturabilité.

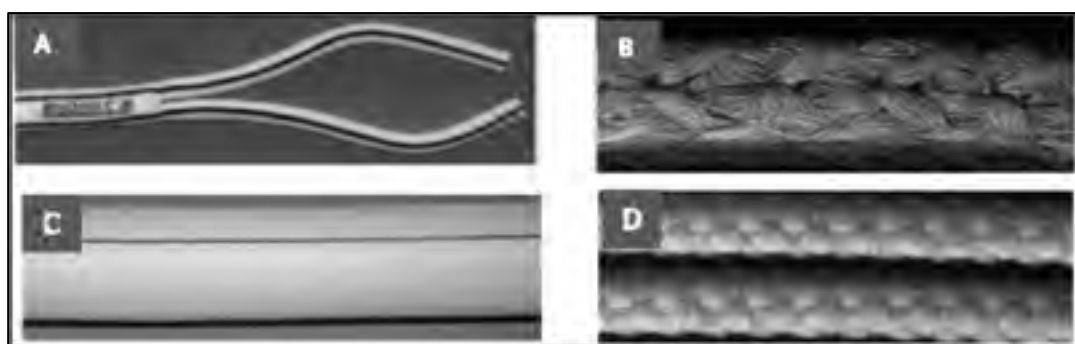


Figure 1.6 Prothèse en poly (éthylène téréphtalate) tricotée (A et B) et tissée (C et D). A et C : aspect macroscopique. B et D : observation de la surface interne des prothèses par microscopie électronique à balayage (grossissement $\times 250$) Tirée de (Chakfe *et al.*, 2004)

Les prothèses en PET sont actuellement utilisées comme substituts des grosses artères vasculaires comme l'aorte, en raison de leur perméabilité à long terme (Davidovic *et al.*, 2004). Par contre, elles demeurent inutilisables pour la substitution des vaisseaux de petits calibres (<6 mm) à cause de leur thrombogénicité.

1.3.3 Limite des prothèses vasculaires synthétiques

Actuellement, les prothèses synthétiques sont utilisées avec succès pour le traitement de pathologies touchant des artères de gros diamètre. Mais l'hémocompatibilité de ces matériaux est limitée et le remplacement des vaisseaux d'un diamètre interne inférieur ou égal à 6 mm donne lieu à de mauvais résultats cliniques à cause de la formation de caillot sanguin à court terme et à la formation d'hyperplasie intimale à plus long terme à proximité de l'anastomose. Ces phénomènes sont liés à l'adhésion, l'agrégation et l'activation des plaquettes sur les surfaces (via les protéines sanguines qui ont adhéré préalablement aux surfaces non endothélialisées) qui mènent à la formation d'un thrombus et d'autre part à l'accumulation de CMLs. Dans les deux cas, ces phénomènes sont liés au manque d'endothélialisation de la surface luminale observés lors des études cliniques.

Devant ce constat d'échec, l'amélioration de la perméabilité des prothèses a fait l'objet de nombreuses recherches. Les stratégies investiguées sont le développement de nouveaux matériaux, les modifications du PET et du ePTFE afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques et promouvoir la formation d'une couche endothéliale *in vivo* (Xue et Greisler, 2003), ou le pré-ensemencement de CEs (la cellularisation, ou endothélialisation). Ainsi, pour améliorer l'hémocompatibilité, des modifications de la surface interne du substitut ont été proposées, par exemple le recouvrement de la surface par une couche anti-adhésive (non-fouling) comme le PEG ou par une fine couche de carbone pour augmenter le caractère électronégatif de la surface (Groegler FM, 2002); ou encore le greffage d'agents anticoagulants ou antithrombotiques, en particulier la fixation d'héparine (Walpoth, 1998) (Bosiers et al., 2006). Malgré des résultats prometteurs, la durabilité de l'efficacité de ces revêtements est limitée. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, seules les CEs possèdent les propriétés anti-thrombotiques qui peuvent assurer l'absence de coagulation à long terme.

L'une des approches les plus prometteuses consiste donc plutôt en l'endothélialisation des prothèses synthétiques, c'est-à-dire le recouvrement du polymère par une monocouche de CEs (Xu *et al.*, 2011). Ceci fait l'objet de la prochaine section. On y verra que, comme la

surface luminale des prothèses synthétiques est initialement défavorable à l'adhésion des CEs, il est nécessaire de recourir à une modification de cette surface.

1.4 Pré-ensemencement des prothèses synthétiques pour améliorer leur performance clinique

Vara et al. ont fait le point sur l'endothélialisation des implants synthétiques et des diverses stratégies de fabrication des implants biologiques (Vara *et al.*, 2005). L'ensemencement endothélial de la surface interne des prothèses synthétiques semble être une approche prometteuse, puisque l'endothélium fournit une structure intégrale au vaisseau sanguin par la formation d'une barrière thromborésistante et activement anti-thrombotique entre la circulation sanguine et les parois artérielles (Vara *et al.*, 2005).

Deux stratégies sont utilisées pour l'ensemencement des CEs :

Ensemencement en une étape (Single-stage seeding)

Les cellules sont extraites et alignées directement sur les greffes. Cette technique peut être effectuée au cours d'une opération chirurgicale. L'application de *single-stage* donne des résultats intéressants en expérimentation animale, mais des résultats mitigés chez l'humain par manque d'endothélialisation (Alobaid *et al.*, 2005).

Ensemencement en deux étapes (Two- stage seeding)

Les cellules extraites du patient sont mises en culture pour une période de 2 à 4 semaines. Un grand nombre de cellules serait ensemencé, mais le problème avec cette technique d'ensemencement est la dureté de culture nécessaire pour la production des quantités des cellules suffisantes ce qui rend cette méthode non convenable en application clinique en cas d'urgence.

En 2009, Deutsch et al. ont rapporté une étude montrant que des prothèses de 7 et 6 mm enduites de colle de fibrine et endothélialisées avec des CEs autologues présentent une

perméabilité de respectivement 71 et 55 % à 10 ans (Deutsch *et al.*, 2009). Ces prothèses à 3 et 7 ans présentaient une perméabilité de 85 et 74 %, alors que les mêmes non endothélialisées présentaient une perméabilité de seulement 55 et 0 % (Deutsch *et al.*, 1999).

Il a également été démontré que les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) ont le potentiel de former une couche d'endothélium (Shirota *et al.*, 2003) (Kaushal *et al.*, 2001). Le gros avantage des EPCs par rapport aux CE étant la facilité de prélèvement (ponction veineuse à la place d'une procédure chirurgicale) (Ward, Stewart et Kutryk, 2007).

1.5 Modification de surface pour le pré-ensemencement par CEs

Quel que soit le type de cellule, le problème majeur de ces matrices demeure le manque d'adhésion spontanée des cellules au polymère, en particulier au PTFE, qui se traduit par un faible nombre de CEs adhérentes, présentes sur de petites portions de surface après exposition aux contraintes de cisaillement, représentatives du flux sanguin dans la circulation périphérique (Feugier *et al.*, 2005). Aussi les recherches se sont orientées vers les modifications de surface des matériaux pour améliorer l'adhésion cellulaire (Aper, Haverich et Teebken, 2009). Certaines méthodes sont purement physico-chimiques, et visent à créer des propriétés des surfaces plus adéquates pour l'adhésion, l'étalement et la croissance des cellules en modifiant la charge, mouillabilité, caractère hydrophile ou hydrophobe, la composition et la topographie de la surface (Tiwari *et al.*, 2003 ; Tiwari A, 2003). D'autres efforts visent à générer des interactions plus spécifiques avec les cellules (biofonctionnalisation ou revêtements bioactifs).

1.5.1 Modifications physico-chimiques

Différentes techniques de modification physico-chimiques des surfaces, pour modifier par exemple la rugosité et la mouillabilité, peuvent être utilisées pour favoriser l'endothelialisation des surfaces (Figure 1.7) (de Mel *et al.*, 2008). Ces techniques peuvent améliorer l'adhésion cellulaire via leur effet sur l'adsorption des protéines (Engler *et al.*, 2007). L'augmentation de la rugosité de 10 à 100 nm stimule *in vitro* l'adhésion et la croissance de CEs humaines sur des surfaces (Chung *et al.*, 2003). L'augmentation de la

porosité permet également d'améliorer la colonisation cellulaire (Zhang *et al.*, 2004 ; Zilla *et al.*, 1987). Des cellulesensemencées sur des surfaces polymériques présentant des groupements hydrophiles adhèrent et prolifèrent davantage que sur des surfaces hydrophobes (Kim *et al.*, 2007).

La modification des surfaces a bien entendu également un effet sur leur hémocompatibilité. L'effet de la charge de la surface a notamment été étudié. Les surfaces chargées positivement sont connues pour accélérer le phénomène de thrombose, contrairement aux surfaces chargées négativement qui le ralentissent. (Lee *et al.*, 1998 ; Sarkar *et al.*, 2007). De telles modifications peuvent être obtenues par le revêtement ou le greffage de groupements acide ou sulfonate qui donnera des surfaces chargées négativement alors que la présence de groupement amine donnera une surface chargée positivement.

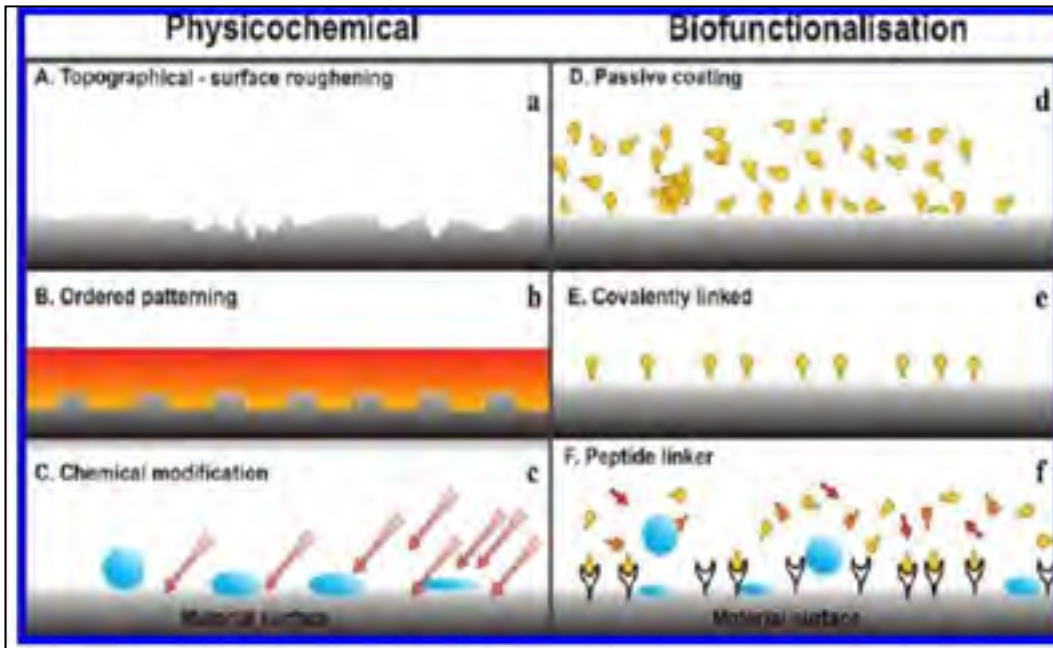


Figure 1.7 Exemples de techniques de modifications de surface favorisant l'endothélialisation
Tirée de (de Mel *et al.*, 2008).

Modification par plasma

Une technologie qui nous intéresse particulièrement ici est le traitement par plasma. Le plasma est un gaz partiellement ionisé composé d'atomes, de molécules, d'ions et de radicaux libres excités, suite à une stimulation par radio-fréquences, micro-ondes ou une décharge d'électrons (Chu PK, 2002). Le plasma permet de réaliser plusieurs types de modification de surface, comme la gravure par arrachement ionique, l'implantation ionique, la pulvérisation et la déposition (Chu PK, 2002). Il permet d'influencer le caractère hydrophile/hydrophobe, la charge et la rugosité de surface. En particulier, des plasmas à base d'azote, d'ammoniaque ou d'oxygène sont couramment utilisés pour générer des groupements fonctionnels à la surface des polymères, comme les hydroxyles, carboxyles ou amines sur les biomatériaux, qui sont connus pour favoriser l'adhésion cellulaire. D'autres précurseurs et différents mélanges sont utilisés pour former des revêtements minces par polymérisation. Ainsi, l'équipe du Professeur Wertheimer de l'École Polytechnique a mis au point une nouvelle gamme de revêtements organiques polymérisés par plasma basse pression (LP), qui sont riches en amines primaires

grâce à l'utilisation d'un mélange d'éthylène (C_2H_4) et d'ammoniaque (NH_3) (Ruiz *et al.*, 2010a ; Truica-Marasescu *et al.*, 2008). Les principaux avantages de ces revêtements, par rapport à d'autres techniques de modification sont; 1) la haute concentration en azote et en amines primaires, 2) un vieillissement relativement faible, 3) une très bonne uniformité de surface et 4) le fait que le revêtement hautement réticulé empêche sa restructuration en un matériel hydrophobe pour être thermo-dynamiquement plus stable, et ce malgré son énergie de surface élevée (Lerouge *et al.*, 2007). Dans le cadre de ce projet, on utilisera un revêtement créé par plasma basse pression à l'aide d'un ratio de flux de gaz $R (\equiv FN_{H_3} / FC_{2H_4}) = 0,75$, car il a été montré que celui-ci constituait le meilleur compromis entre la concentration en amine primaire et la stabilité en milieu aqueux (Ruiz JC, 2010).

1.5.2 Modifications par biofonctionnalisation

La biofonctionnalisation consiste à fixer des biomolécules sur une surface dans le but de contrôler les réponses cellulaires sur l'implant de façon plus spécifique. Ainsi de nombreuses équipes ont immobilisé des protéines ou séquences peptidiques à la surface de biomatériaux afin de favoriser l'adhésion spécifique des cellules. Ces motifs sont capables d'interagir de façon spécifique avec les récepteurs cellulaires (intégrines) et de provoquer une fixation « ferme » (Engler *et al.*, 2007) avec formation de points focaux et activation des mécanismes intracellulaires menant à la survie. Il existe différentes techniques pour fixer les protéines et peptides (Figure 1.7) comme par ex. : l'adsorption simple ou la liaison covalente (de Mel *et al.*, 2008).

Les constituants de la matrice extracellulaire (MEC) telle que la FN ou le collagène sont les plus étudiés (Fernandez *et al.*, 2005). Du collagène I, II ou III recouvrant des prothèses synthétiques augmente l'attachement et la prolifération cellulaires (Berard *et al.*, 2009). La FN (FN) est utilisée pour favoriser l'attachement et la rétention cellulaire (Kent *et al.*, 1988 ; Williams *et al.*, 1985). Pour obtenir un attachement cellulaire optimum, la concentration de FN doit être comprise entre 10 - 50 $\mu g/mL$ du milieu de reconstitution. Des études comparatives montrent que la FN adsorbée sur les plaques de polystyrène pour culture

tissulaire (PCP) augmente d'avantage l'attachement cellulaire que la présence de collagène, de gélatine ou de laminine (Budd, Bell et James, 1989). Le greffage covalent s'avère plus efficace que la simple adsorption de la protéine, probablement à cause des risques de dénaturation des protéines adsorbées (de Mel *et al.*, 2008).

De plus, comme les peptides résistent mieux aux variations de pH et de la température, des travaux ont rapidement démontré l'intérêt de travailler avec des séquences peptidiques courtes plutôt qu'avec des protéines (Engler *et al.*, 2007). Ainsi la FN peut lier les intégrines par deux séquences RGD (arginine (ARG); glycine (GLY); acide aspartique (ASP)). De nombreuses études récentes ont donc montré la capacité d'améliorer l'adhésion cellulaire par greffage de peptides RGD (Hsu, Sun et Chen, 2003 ; Jun et West, 2004 ; Kouvrakoglou *et al.*, 2000) ou autres séquences peptidiques encore plus spécifiques aux CEs sur la surface liminale des substituts vasculaires (Moon et West, 2008).

Cependant, ces techniques ont également des inconvénients, tel que le coût des peptides et la thrombogénicité de la FN (Lambrecht *et al.*, 1986) et des surfaces modifiées par peptides comme le RGD (Wilson, 2010). Il n'y a pas encore à ce jour de technique de modification de surface idéale, notamment à cause de la difficulté des CEs de résister au cisaillement sanguin.

1.6 Impact du cisaillement sur les CEs

Trois forces mécaniques s'appliquent sur les cellules de la paroi vasculaire (Figure 1.8) : La force circonférentielle, la pression transmurale et la contrainte de cisaillement (shear stress). La contrainte de cisaillement est la force exercée par le sang à la surface des CEs recouvrant la surface luminale de la paroi vasculaire.

La Figure 1.9 présente les observations in vivo de la contrainte de cisaillement dans les vaisseaux biologiques d'après la littérature. Les taux physiologiques de la contrainte de cisaillement sont d'environ 1 à 5 dynes/cm² pour les veines et de 10 à 20 dynes/cm² pour les artères ((Dela Paz, 2008), mais montent bien davantage dans les petits vaisseaux (Papaioannou et Stefanadis, 2005). En cas de sténose le flux sanguin n'est pas toujours

laminaire, ce qui peut influencer le phénotype endothélial et l'expression des gènes des CEs (Chien, 2008a, 2008b) (Nerem, 1984).

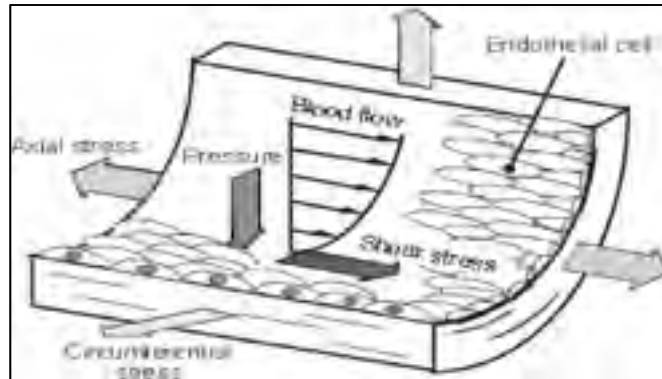


Figure 1.8 Contrainte mécanique exercée sur la paroi artérielle
Tirée de (Ohashi, 2005).

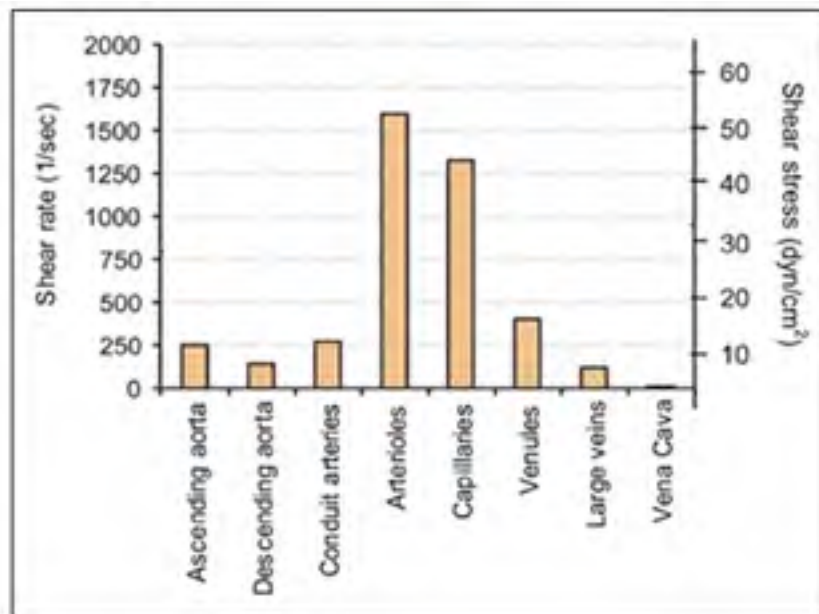


Figure 1.9 La contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement dans les différents vaisseaux. Les vaisseaux de petit diamètre ont un diamètre et un flux situé entre les artères et les artérioles

Tirée de (Papaioannou et Stefanadis, 2005)

En appliquant une contrainte de cisaillement, les cellules prennent la forme allongée dans le sens de flux (Davies, 2009). Ainsi la force de cisaillement artérielle d'une valeur de 15 dynes/cm² pendant un jour peut provoquer un alignement cellulaire dans le sens de flux (Figure 1.10). In vivo, les CEs possèdent la forme allongée surtout dans les artères où les forces de cisaillement sont très élevées (Ait-Oufella *et al.*, 2010).

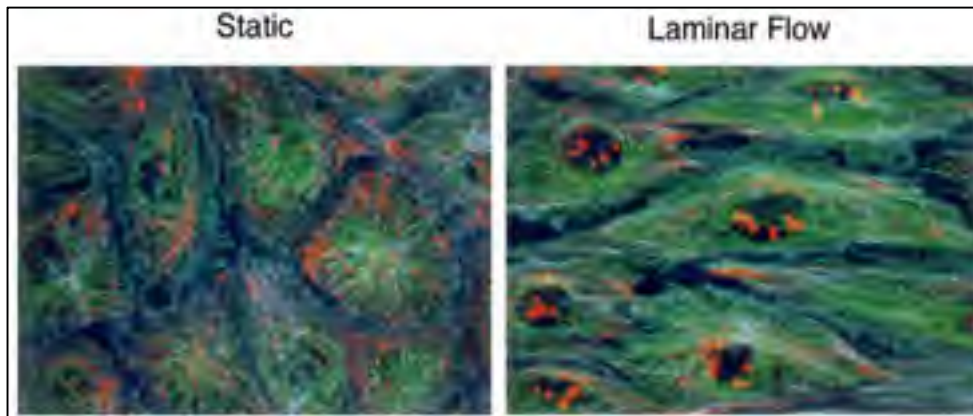


Figure 1.10 Le *shear stress* laminaire (15 dynes/cm² pendant 24h) induit la réorganisation du cytosquelette et l'alignement de CEs
Tirée de (Li, Haga et Chien, 2005)

Dans les régions rectilignes des artères (Figure 1.11) où le flux est laminaire, Les CEs présentent un phénotype anti-inflammatoire, avec un faible taux de stress oxydatif, de renouvellement cellulaire et les cellules sont protégées vis-à-vis du développement de l'athérosclérose (Hahn et Schwartz, 2009). Au contraire, dans les régions de division artérielle, le flux est perturbé (zones rouges dans la figure 1.11), les CEs ont un phénotype pro-inflammatoire, caractérisé par une absence d'alignement, un renouvellement cellulaire élevé, l'expression de gènes pro-inflammatoires provoquant une inflammation de la paroi vasculaire. Ces phénomènes évoluent vers l'athérosclérose. Dans le cas de prothèses vasculairesensemencées avec des CEs, il a été noté qu'une proportion importante de CEs se détachaient de la surface sous l'effet du cisaillement (Remy *et al.*, 2013).

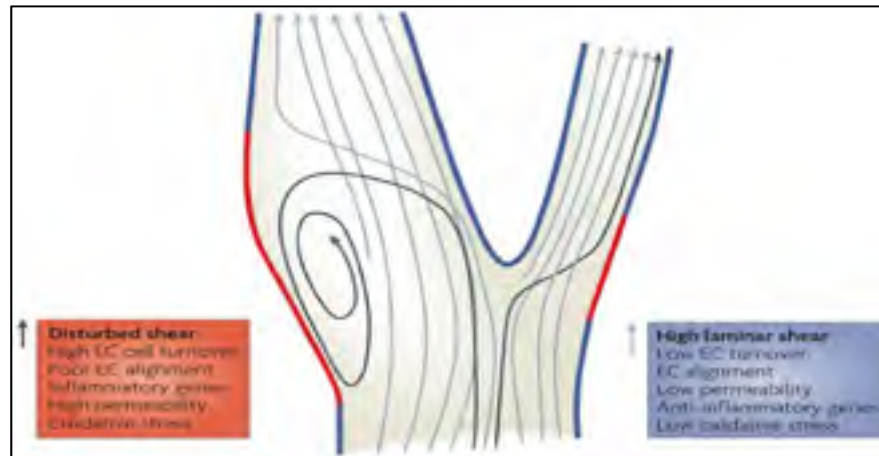


Figure 1.11 Réponse de CE en fonction du flux
Tirée de (Hahn et Schwartz, 2009).

1.7 Travaux antérieurs du laboratoire pour un revêtement bioactif

Lors de travaux antérieurs, il a déjà été montré que les revêtements plasma riches en amines primaires mis au point par l'équipe et décrits à la section 1.5.1 permettent d'améliorer l'adhésion et la rétention des CE (Gigout *et al.*, 2011). En effet, le LP favorise la croissance et la forte adhésion des HUVECs, ainsi que leur résistance au cisaillement sanguin sur des surfaces en PET ou PTFE. La morphologie des HUVECs sur le LP montre une forte adhésion cellulaire. Ceci a été démontré par de nombreux foyers d'adhésion et par la présence des plusieurs fibres de stress à terminaison vinculine, telle que démontré par la coloration immuno-histochimique (Figure 1.12).

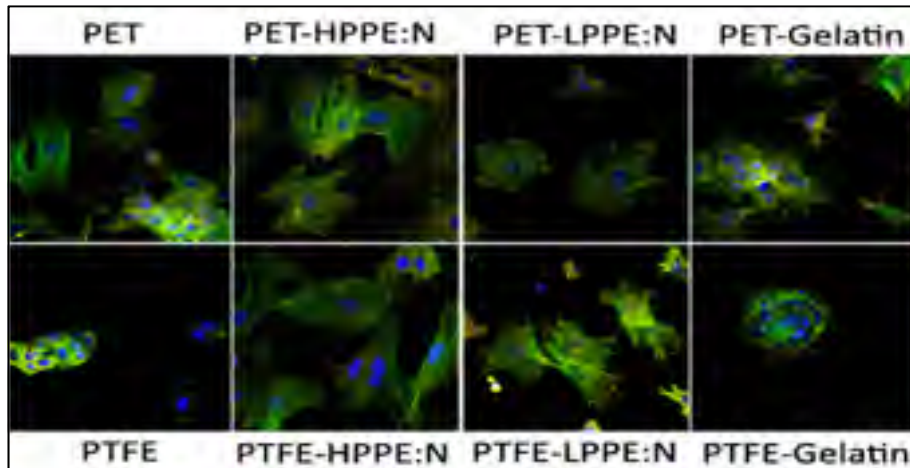


Figure 1.12 Immunocoloration des HUVECs adhérees à 24h. Actine (vert) / Vinculin (orange) / noyaux (bleu). Les fibres terminées par vinculine sont la marque des adhésions focales
Tirée de (Gigout *et al.*, 2011).

L'amélioration de la rétention cellulaire sur les surfaces PET+LP et PTFE+LP par rapport aux surfaces non modifiées a été vérifiée par des tests de résistance au cisaillement par exposition à un cisaillement orbital ou laminaire. Le LP, avec sa composition élevée en amine primaire, semble donc un revêtement intéressant pour favoriser l'endothélialisation de l'implant vasculaire. De plus, il peut être déposé sur n'importe quel type de surface.

En parallèle, Charbonneau et al.(Charbonneau *et al.*, 2011) ont développé un revêtement bioactif en greffant sur le LP d'un polysaccharide, composante de la matrice extracellulaire appelé chondroïtine sulfate (CS) avec ou sans le facteur de croissance épithélial (EGF) pour améliorer la guérison autour d'endoprothèse couverte. Les propriétés intéressantes observées sur les CMLs suggèrent que cette surface pourrait être hémocompatible tout en favorisant l'adhésion des CEs.

1.8 Conclusions de la revue de littérature et objectifs

La revue de littérature a montré le besoin de développer de nouvelles surfaces bioactives permettant d'améliorer l'adhésion, la croissance et la résistance au cisaillement engendrée par le flux sanguin, garants de résultats durables *in vivo*, tout en étant non thrombogène.

L'objectif général de ce projet consistait donc à étudier l'effet de revêtements bioactifs sur les CEs et l'hémocompatibilité. Le LP seul, ainsi que recouvert de FN ou de CS, ont été évalués et comparés au polyéthylène téréphtalate (PET) non modifié. Le premier objectif spécifique consistait à étudier l'adhésion, la croissance et le maintien de CEs (HUVECs). Le second objectif spécifique consistait à évaluer l'adhésion plaquettaire sur les différences surfaces par un test de perfusion avec du sang complet. Enfin, une technologie de double marquage a été mise au point afin d'étudier simultanément le maintien des CEs en condition de flux sanguin et leur caractère non thrombogène.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Préparation des surfaces

Plusieurs modifications de surface du PET ont été effectuées au cours de ce projet, afin d'étudier leur effet sur la thrombogénicité ou sur l'adhésion et la croissance des CEs. Les méthodes de préparation de ces surfaces et des surfaces contrôles sont détaillées ci-dessous.

2.1.1 Revêtement polymérisé par plasma (LP)

Le dépôt des revêtements LP sur le PET (Dupont Teijin Films, Hopewell, VA, États-Unis) est réalisé dans un réacteur plasma basse pression (Figure 2.1) avec une chambre cylindrique de 10 cm de diamètre interne reliée avec une génératrice radiofréquence de 13.56 Mhz et à un système de pompage composé d'une pompe mécanique et d'une pompe turbo. Le système peut être alimenté en gaz à l'aide d'un diffuseur en pommeau de douche fixé sur son couvercle.

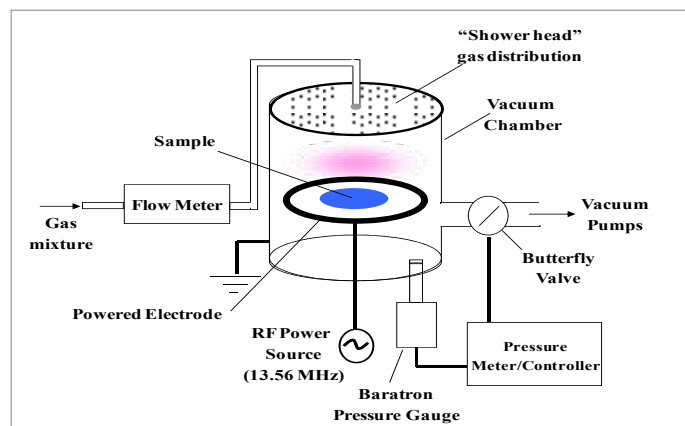


Figure 2.1 Schéma du réacteur plasma utilisé
Tirée de Ruiz *et al.* (2010b).

Le PET est coupé en disques de 6 cm de diamètre et placé au centre d'une plaque d'aluminium fixée sur la cathode, tandis que la paroi de la chambre joue le rôle de l'anode. Le système de pompage est composé de deux pompes : une mécanique pour établir le vide primaire (30 mTorr) et une pompe turbo pour amener la chambre à une pression d'environ 10^{-5} Pa. L'entrée des gaz est ensuite contrôlée par des débitmètres électroniques. Les gaz utilisés sont l'ammoniac (NH_3) et l'éthylène (C_2H_4). Le ratio R du mélange $\text{NH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$ peut être ajusté par le débit du NH_3 tandis que le débit du C_2H_4 est gardé constant à 20 sccm (centimètre cubique standard). Dans le cadre de ce projet, les conditions de déposition du LP ont été fixées pour obtenir un ratio de $R=0.75$ de mélange gazeux. Les autres paramètres de dépôt du LP correspondent à une combinaison de 10W de puissance d'entrée, 600 mTorr de pression de fonctionnement, et un temps de dépôt de 15 min (environ 120 nm d'épaisseur du LP). (Ruiz *et al.*, 2010b).

2.1.2 Surfaces contrôle

La gélatine est couramment utilisée pour favoriser l'adhésion et la croissance des HUVECs *in vitro*. Des puits de plaques de culture en polystyrène (PCP) (Costar, Acton, MA, États-Unis) recouvertes de gélatine ont été préparés comme une surface de contrôle. 250 μL de gélatine (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), préparée à une concentration de 0,2% , ont été ajoutés par puits et l'excédent immédiatement aspiré. Les puits ont été gardés à température ambiante pendant 24 h sous la hotte. Des films de PET vierge (sans revêtement ni addition de gélatine) ont été utilisés comme contrôle négatif.

2.1.3 Adsorption de la Fibronectine

Les surfaces PCP, PET, et LP ont été recouverts de FN par simple adsorption sur les surfaces. La solution de FN (VWR Internationale, Québec, Canada) , de concentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dilués dans du PBS, a été ajoutée dans des plaques de 24 puits (500 $\mu\text{l}/\text{puits}$) et incubée pendant une heure à 37 °C, sous 5 % de CO_2 . Après 3 rinçages au PBS pour éliminer la FN non adsorbée, les plaques étaient laissées à sécher à température ambiante.

2.1.4 Greffage de la CS et de l'EGF

Une autre modification de surface utilisée dans le cadre de ce travail a été réalisée par le greffage covalent de CS et d'EGF sur le LP (Figure 2.2). Ceci a été effectué par chimie carbodiimide selon le protocole développé par (Charbonneau *et al.*, 2011). En bref, une concentration de 0,1 % v/v de sulfate de chondroïtine (CS-4; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été utilisée pour le greffage. Les surfaces ont été exposées à 100 µl de la solution CS, contenant 40 % v/v d'éthanol, 50 mM de 2-(*N*-morpholino) éthane sulfonic acid (MES, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) et N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) (NHS /EDC: 0,2) pendant 60 min à température ambiante. Toutes les surfaces ont été rincées avec du PBS pendant 2 min et de l'eau stérile (2 x 2 min) pour éliminer la CS non liée.

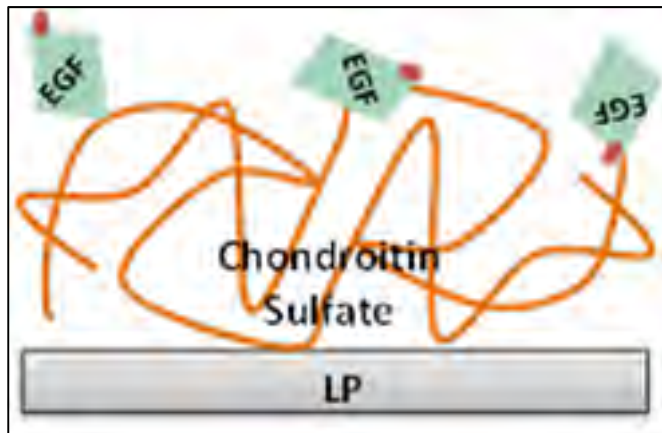


Figure 2.2 Greffage de la CS et de l'EGF sur le LP

Dans certains cas, le greffage de CS a été suivi d'un greffage d'EGF. L'EGF a alors été attaché à la CS greffée par création de liaisons amides entre les groupements d'acide carboxylique de la CS et les amines primaires du facteur de croissance. En bref, les surfaces présentant la CS ont été exposées à 100 µl d'une solution aqueuse contenant 40 % v/v d'éthanol, 22.8 mM EDC et 4.6 mM NHS, pendant 15 min à température ambiante pour activer les acides carboxyliques de la CS. Les surfaces ont ensuite été rincées à l'eau stérile

pour éliminer les résidus EDC/NHS et éviter les risques de formation de liaisons intramoléculaires de l'EGF, avant d'être exposées à une solution d'EGF (100 nM dans l'eau stérile) pendant 60 min à température ambiante. Les surfaces ont enfin été rincées une fois avec du PBS et deux fois avec de l'eau stérile puis séchées à température ambiante.

2.2 Adhésion et croissance des HUVECs sur les surfaces bioactives

L'adhésion et la croissance des HUVECs ont été étudiées sur les différentes surfaces modifiées (PET ±LP, LP-FN et LP-CS, ainsi que le PET et les PCP comme contrôle négatif et positif) (Figure 2.3)



Figure 2.3 Les différentes surfaces testées

2.2.1 Culture cellulaire des HUVECs

Les HUVECs (Lonza, Shawinigan, Canada) ont été systématiquement cultivées, dans un flacon de 75 cm², dans un milieu de croissance (*Endothelial Growth Medium ou EGM*) supplémenté avec la Bulletkit EGM-2, contenant du sérum bovin fœtal, ainsi que hFGF-B, IGF, héparine, GA-1000, rhEGF et VEGF (Lonza, Shawinigan, Canada). Les cellules ont été utilisées lors des passages 2 à 5.

2.2.2 Adhésion cellulaire

Les surfaces synthétiques en PET ±LP, LP-FN et LP-CS (coupées en carré de 1x1 cm) ont été déposées dans le fond de puits de plaques de culture 24 puits. Un cylindre en verre (diamètre intérieur 0,8 cm, Corning, Lowell, MA, USA) a été ensuite déposé sur les surfaces pour produire une surface d'adhésion bien définie et empêcher l'adhésion en dehors de la zone.

Les HUVECs ont été détachées des flasques par trypsine, comptées puis resuspendues dans le milieu complet et 200 µl de cette suspension cellulaire a été ajouté dans chaque cylindre, correspondant à 20×10^3 cellules/puits. Après 4 heures d'adhésion, les cylindres ont été enlevés, le milieu éliminé et les cellules ont été rincés avec du PBS (Sigma, Oakville, Canada), puis colorés au cristal violet (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, 0,75 % p/v dans 30 % v/v d'acide acétique) pendant 15 min. Après trois rinçages à l'eau stérile, les plaques ont été séchées à température ambiante. Pour évaluer la densité cellulaire sur les différentes surfaces, 3 photos par échantillon ont été prises avec un microscope Axiolab (Carl Zeiss Canada, North York, Canada) et les cellules ont été comptées, ce nombre divisé par l'aire de la surface observée. Le nombre d'échantillons par condition était de 4 et les expériences ont été reproduites entre deux et trois fois.

2.2.3 Croissance cellulaire

La croissance des CEs sur les revêtements PCP, PET, LP, LP-FN et LP-CS a également été évaluée. Brièvement, des cellules ont été laissées adhérer pendant 4 heures sur les films en présence des cylindres, puis les cylindres ont été enlevés et le milieu a été changé afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules ont été mises en culture pendant 7 j pour chaque surface, le milieu étant changé tous les 2 jours. Le nombre de cellules a été compté après une coloration au cristal violet tel que décrit précédemment.

2.3 Étude de la thrombogenicité des surfaces

La thrombogenicité des surfaces a été évaluée par la mesure de l'adhésion plaquettaire lors d'essais de perfusion in vitro d'une durée de 15 minutes à un débit de 40 ml/min en imitant les conditions physiologiques humaines.

Pour évaluer l'adhésion plaquettaire, différentes méthodes ont été utilisées. Tout d'abord le marquage radioactif à l'indium selon le protocole établi précédemment par l'équipe du professeur Yahye Merhi (Diener *et al.*, 2009). Puis des techniques de la coloration des

plaquettes ont été mises au point pour réduire les coûts et l'accessibilité au test et permettre des doubles colorations en présence de CEs. Toutes ces techniques sont détaillées ci-dessous.

Celles-ci ont permis d'évaluer l'adhésion plaquettaire sur chacune des surfaces décrites ci-dessus. Par la suite, l'adhésion plaquettaire sur les surfaces après croissance de CEs a également été évaluée.

2.3.1 Système de perfusion

Les essais d'adhésion plaquettaire sur les surfaces avec et sans CEs ont tous été effectués en utilisant des chambres de perfusion en plexiglas (Figure 2.4) (Merhi, King et Guidoin, 1997) qui imitent, en forme de tube demi-cylindrique, la forme des vaisseaux sanguins (Badimon *et al.*, 1987). Les échantillons (PET, LP, LP-CS et LP-EGF) ont été placés dans des chambres de perfusion rectangulaire permettant une exposition directe des échantillons au sang à un débit de 40 ml/min, ce qui correspond à un taux de cisaillement de 840 s^{-1} , tel qu'expliqué plus bas. Chaque test de perfusion permet d'exposer deux séries en parallèle de deux échantillons chacune.



Figure 2.4 Chambre de perfusion contenant une fenêtre de diamètre intérieur de 2 mm et de 10 mm de longueur qui est fermée par un capuchon en plastique et resserré avec une vis.

La liaison entre les chambres et la pompe péristaltique (Masterflex L/S 7518-10, Cole-Parmer Inc.) (Figure 2.5) a été réalisée en utilisant des tuyaux flexibles chirurgicaux non toxiques (Tygon R-100, Fisher Scientific, Canada). Un bain-marie contrôlé par thermostat a été utilisé pour maintenir le système de perfusion à 37 °C. Pour tous les essais effectués au cours de cette maîtrise, la durée de perfusion était de 15 minutes tel qu'utilisée antérieurement par l'équipe du Pr Yahye Merhi (Ahn *et al.*, 2001)



Figure 2.5 Système de perfusion constituant : la pompe péristaltique, les chambres et les tubulures de connexion.

2.3.2 Calcul du taux de cisaillement (S.R. pour « Shear rate » en anglais)

Les vaisseaux que nous voulons simuler avec la perfusion sont des vaisseaux de petit diamètre. Pour cette raison, nous avons choisi un débit volumétrique approprié du sang dans les chambres de perfusion, de façon à ce que la valeur du taux de cisaillement dans le système de perfusion simule les conditions dans les vaisseaux de petit diamètre. Les petits vaisseaux de diamètre que nous traitons ont une dimension comprise entre artérioles et les artères de

conduits, de sorte que nous avons choisi de créer un taux de cisaillement d'environ 800 s^{-1} (Papaioannou et Stefanadis, 2005) voir figure 1.9.

Le calcul de la contrainte de cisaillement a été réalisé avec l'approximation suivante:

$$\tau = \frac{32\mu Q \text{ (ml/sec)}}{\pi D^3} \text{ (Papaioannou et Stefanadis, 2005)} \quad (\text{Eq.1})$$

Où :

τ : contrainte de cisaillement

μ : viscosité du sang ($3.5 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$). Viscosité de l'eau ($1 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$)

Q : débit du sang ou de milieu de culture (40 ml/min)

Chambre à 2mm de diamètre interne $\longrightarrow \pi D^3 = \pi \times 0.008 = 0.025$

Pour un flux du sang à 40ml/min $\longrightarrow \tau = \frac{32 \times 3.5 \times 0.001 \text{ (40/60)}}{0.025}$

Donc : $\tau = 2.94 \text{ Pa} = 29.4 \text{ dyne/cm}^2$

Le taux de cisaillement est calculé par l'équation suivante

$\gamma = \frac{\tau}{\mu}$ Donc le taux de cisaillement est de 840/s.

Pour un flux du milieu de culture à 40ml/min $\longrightarrow \tau = \frac{32 \times 1 \times 0.001 \text{ (40/60)}}{0.025}$

Donc : $\tau = 0.85 \text{ Pa} = 8.5 \text{ dyne/cm}^2$

2.3.3 Prélèvement sanguin

L'adhésion des plaquettes sur les surfaces contrôles et modifiées a été évaluée par des tests de perfusion avec du sang humain frais, dans lequel les plaquettes ont été marquées directement dans le sang ou bien isolées puis marquées. Le sang a été prélevé sur des sujets sains, sans médication affectant la fonction plaquettaire pour au moins deux semaines avant le prélèvement, selon un protocole approuvé par le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Un échantillon de 60 ml de sang veineux de chaque sujet a été prélevé comme suit; deux seringues de 30 ml chacune contenant 3 ml d'anticoagulant DPhenylalanyl-L-prolyl-L-argininechlorométhylcétone (PPACK, Calbiochem, Canada). Notons que le PPACK a une durée de vie courte et ne provoque pas d'activation plaquettaire, c'est pourquoi on l'a utilisé pour éviter la coagulation sanguine entre le temps du prélèvement sanguin et le temps de la perfusion.

2.3.4 Isolation des plaquettes

Une seringue de 30 ml contenant 3 ml d'anticoagulant PPACK et une deuxième seringue contenant 5 ml d'anticoagulant citrate-dextrose (ACD, Baxter, Mississauga, Canada). Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été obtenu par centrifugation du sang avec ACD pendant 15 min à 1000 rpm, suivie d'une deuxième centrifugation du PRP pendant 10 min à 2300 rpm pour séparer les plaquettes du plasma pauvre en plaquettes (PPP). Le culot plaquettaire est ensuite suspendu avec 25 ml de saline équilibrée avec du tampon Hank (HBSS: Citraté) contenant 0,5 ug/uL de prostaglandine E1 (PGE1, Sigma, Canada) et centrifugé pendant 10 min à 2100 rpm. Le culot plaquettaire a été ensuite suspendu dans le tampon Hank à une concentration finale de 250×10^6 plaquettes/ml. Le compte plaquettaire a été ajusté à l'aide d'un compteur cellulaire automatisé ActDiff cell counter (Beckman Coulter, Canada).

2.3.5 Mesure de l'adhésion plaquettaire par marquage des plaquettes à l'indium¹¹¹

Pour certaines expériences au début de cette maîtrise, la technique de marquage radioactif des plaquettes mis au point dans le laboratoire du Pr Yahye Merhi, a été utilisée. Le sang contenant l'anticoagulant ACD a été utilisé pour isoler et radio-marquer les plaquettes avec l'indium¹¹¹, selon un protocole établi et publié (Diener *et al.*, 2009). Le culot plaquettaire a été suspendu avec 2 ml de HBSS contenant la PGE1, et incubé avec 250 µCi d' ¹¹¹Indium oxine (GE Healthcare Canada inc. Burlington, Ontario) pendant 15 min à température ambiante, suivi d'une dernière centrifugation pendant 8 min à 2100 rpm. Le surnageant est éliminé et les plaquettes radio-marquées (culot) ont été remises en suspension dans 10 ml de PPP pour être mélangées avec 60 mL de sang contenant du PPACK. Le compte plaquettaire de chaque échantillon a été mesuré à l'aide d'un compteur cellulaire. À titre de référence, 10 µL de sang, en triplicata, contenant des plaquettes marquées ont été prélevés afin de mesurer la radioactivité de l'indium¹¹¹ à l'aide d'un compteur gamma (Minaxi 5000, Packard Instruments, États-Unis).

La perfusion des surfaces durant 15 min a été suivie d'un rinçage avec une solution de saline et un autre rinçage avec une solution de formaline tamponnée pour la fixation. À la fin de chaque expérience, la radioactivité sur chaque échantillon ou surface exposée a été mesurée à l'aide du compteur gamma. Les plaquettes adhérees sur chaque surface d'essai ont été calculées selon l'équation suivante (Merhi, King et Guidoin, 1997) :

$$\text{adhésion plaquettaire} = \frac{{}^{111}\text{Ind cpm dans la partie exposée} * \frac{\text{No. des plaquettes par ml de sang}}{{}^{111}\text{Ind cpm par ml de sang}}}{\text{Surface exposée (cm}^2\text{)}} \quad (\text{Eq.2})$$

Cette équation tient compte de la radioactivité en cpm (Counts per minute) mesurée sur les surfaces exposées, le nombre des plaquettes/mL de sang, la radioactivité des échantillons de référence de sang et la surface exposée qui est de 0.2 cm².

Cette méthode a été utilisée au début du projet pour caractériser la thrombogénicité de surface. L'expérience a été répétée pour chaque surface d'essai en utilisant trois différents donneurs de sang.

Cependant cette technique a plusieurs limites importantes, en termes de coûts, de difficulté de mise en œuvre (puisque la demi-vie de indium¹¹¹ est courte) et des risques liés à la radioactivité. C'est pourquoi une partie importante de ce travail de maîtrise consistait à mettre au point une technique de coloration des plaquettes puis une double coloration plaquette/cellules, pour pouvoir réaliser nos objectifs de recherche.

2.3.6 Coloration plaquettaire à la Rhodamine

Le colorant utilisé pour évaluer l'adhésion plaquettaire sur les surfaces en absence de cellules est la rhodamine (Dimitrievska *et al.*, 2011). Plusieurs méthodes ont été utilisées afin de colorer les plaquettes à la rhodamine : en colorant les plaquettes directement dans le sang complet ou en colorant les plaquettes préalablement isolées et en les rajoutant ensuite dans du sang complet.

2.3.6.1 Coloration du sang complet

Un échantillon de 60 ml de sang veineux de chaque sujet a été prélevé avec 6 ml d'anticoagulant PPACK préparé dans une solution saline à une concentration finale de 50 μ M. La rhodamine (Sigma-Aldrich, Canada) d'une concentration de 10 μ g/ml est rajoutée au sang, suivi d'une incubation de 15 min à 37 °C avant d'être utilisé dans le test de perfusion. La figure présente un exemple de résultat obtenu avec le PET et le LP. On y voit bien les plaquettes sur les surfaces, beaucoup plus nombreuses dans le cas du LP que du PET (Figure 2.6) ce qui nous donne une première indication de la thrombogénicité du LP. Par contre, nous avons observé par la suite que la rhodamine colorait également les HUVECs (Figure 2.7). Cette technique ne peut être utilisée que sur les surfaces seules, sans pré-culture d'HUVEC à leur surface.

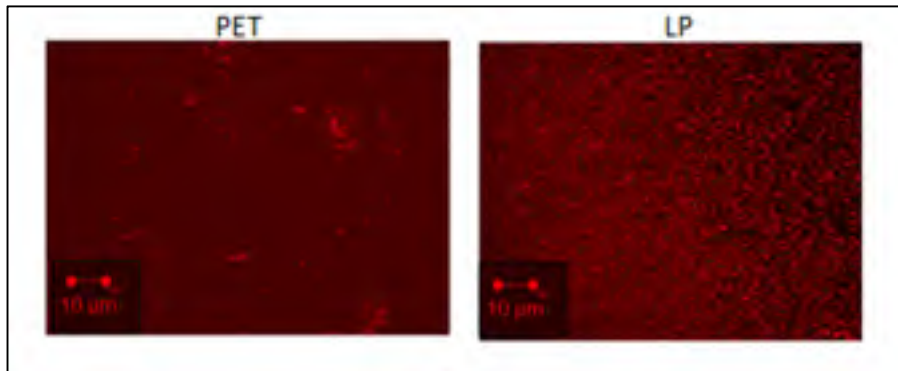


Figure 2.6 Surfaces (LP et PET) exposées en perfusion de 15 min au sang complet marqué à la rhodamine. Les plaquettes sont marquées à la rhodamine.

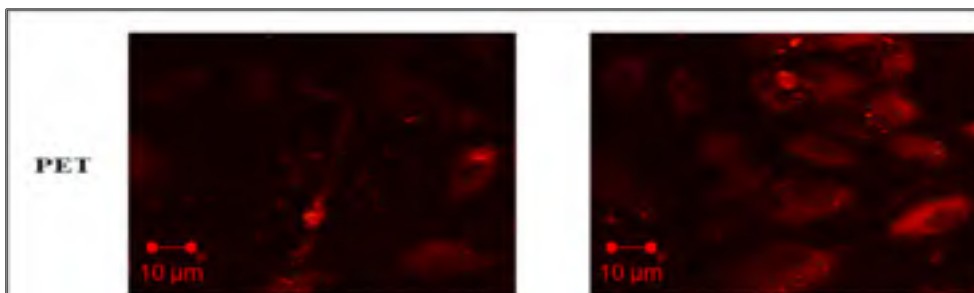


Figure 2.7 HUVECs sur le PET après 7 jours de culture suivis d'une perfusion de 15 min au sang complet marqué à la rhodamine. Les cellules sont marquées au Cellvue Maroon, mais se colorent aussi en rouge sous l'effet de la rhodamine, ce qui empêche de bien visualiser les plaquettes adhérentes

2.3.6.2 Coloration des plaquettes isolées

La coloration des plaquettes isolées à la rhodamine avant de les remettre dans le sang complet a été évaluée, afin de régler le problème cité précédemment. En bref, les plaquettes isolées ont été suspendues dans un volume de 25 ml avec le tampon citraté-PGE1 contenant 10 µg/ml de rhodamine. Ensuite elles ont été incubées pendant 15 min à la température de la pièce et centrifugées à 2100 rpm. Le culot a été suspendu dans le PPP et rajouté au sang complet contenant le PPACK.

Il a cependant été observé que cette méthode provoque une agrégation des plaquettes lors de la coloration, ce qui mène à l'observation d'agrégats plaquettaire sur les surfaces qui sont des artéfacts (Figure 2.8). Cette technique a donc été abandonnée et on a privilégié par la suite la coloration du sang complet à la rhodamine, même si cela rend impossible l'utilisation de cette technique en présence de CEs.

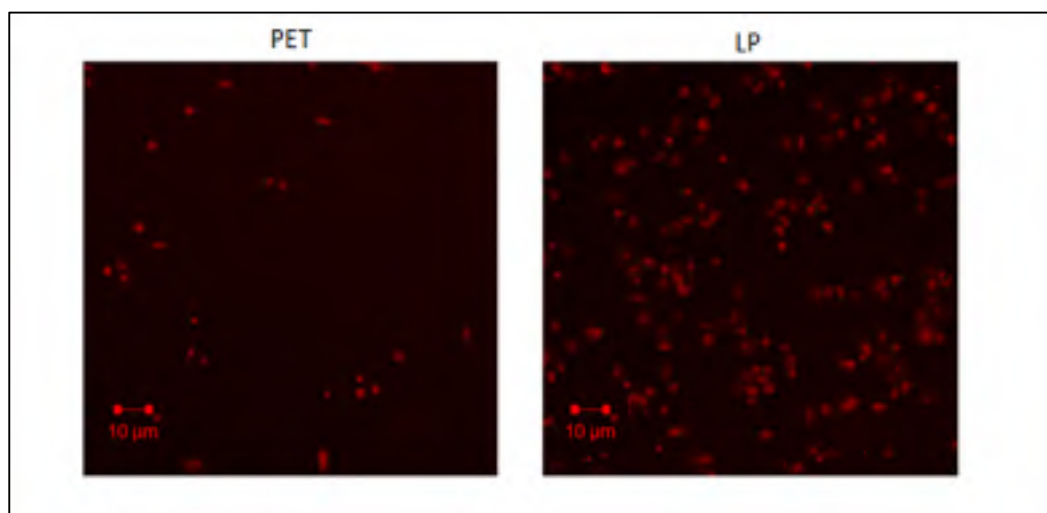


Figure 2.8 Adhésion des plaquettes sur des surfaces en PET et LP exposées, à des suspensions des plaquettes isolées et marquées avec la rhodamine, pendant 15 min à un débit de 40 mL/min

2.3.7 Évaluation de l'adhésion plaquettaire

2.3.7.1 Comptage des plaquettes en fluorescence

Les plaquettes marquées à la rhodamine dans le sang complet et exposées aux surfaces modifiées ont été observées à l'aide d'un microscope confocal. Après avoir été exposées, dans les chambres à perfusion, au sang complet pendant 15 min à un débit de 40 ml/min et rincées avec la solution saline pendant 10 sec pour enlever les plaquettes faiblement adhérentes, les surfaces exposées étaient fixées pendant 25 min avec du paraformaldéhyde 1 % (Sigma-Aldrich). Les surfaces ont été transférées sur des lames contenant le milieu de montage

(DABCO, Fisher Scientific, Canada) puis observées au microscope confocal (Carl Zeiss LSM 510).

Notons que les photos ont été prises au centre de la surface exposée, en excluant les bords, l'entrée et la sortie du flux sanguin, afin de s'assurer de ne prendre en compte que des zones où le flux sur la surface était laminaire et uniforme.

Le pourcentage de l'aire occupée par les plaquettes (par rapport à la surface totale exposée au sang en perfusion) a été estimé à l'aide du logiciel ImageJ.

Cette méthode a été utilisée pour comparer l'adhésion plaquettaire sur les surfaces PET, LP, LP-CS et LP-CS-EGF. Pour chaque surface, nous avons testé le sang de 3 donneurs différents, avec 2 échantillons pour chaque surface testée, pour chaque donneur, ce qui donne un total n=6).

2.3.7.2 Étude de l'activation plaquettaire par microscopie électronique à balayage

Afin d'évaluer l'activation et la quantification de l'adhésion plaquettaire, chaque type de surface a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) pour évaluer la morphologie des plaquettes adhérees. Les échantillons contenant des plaquettes fixées au glutaraldéhyde ont été déshydratés à travers une série de solutions d'éthanol (30 %, 50 %, 70 %, 95 % et 2 x 100 % v/v) et soumis au séchage à point critique avec CO₂ (E3000, Polaron, Technologies de quorum). Les échantillons séchés ont finalement été recouverts par pulvérisation d'or pour les rendre conducteurs, puis observés au MEB en utilisant un Hitachi S-3600N (Hitachi High-Technologies, Canada).

2.4 Stabilité des HUVECs sous cisaillement et leur propriété non-thrombogénique sur les différentes surfaces

La stabilité des HUVECs sous cisaillement sanguin et leur caractère non-thrombotique ont été testés sur les différentes surfaces bioactives en utilisant le système de perfusion et une double coloration (HUVEC/plaquette) à la fin de la perfusion pour visualisation en microscopie

confocale. Celle-ci a fait l'objet de longs travaux d'optimisation, non décrits ici. La technique finale est décrite ci-dessous.

2.4.1 Coloration des HUVECs au Cellvue Maroon

Les HUVECs ont été marquées à l'aide du colorant fluorescent Cellvue® Maroon (M.Target, West chester, États-Unis) (El-Ad, 2007) (Longueur d'onde de fluorescence = 650 nm). Ce marqueur permet de colorer en bleu les régions lipidiques de la membrane cellulaire. Après 7j de croissance cellulaires, 1 ml de Cellvue Maroon (Concentration 1.5 μ M, dilution dans du milieu sans sérum) a été déposé directement sur les cellules pendant 10 min à 37 °C. Le marquage est arrêté en rajoutant 1 ml de FBS. Une série de 3 lavages avec du milieu est faite une fois que le marquage est arrêté.

2.4.2 Coloration des plaquettes avec anti-CD61/FITC

Plusieurs colorations ont été étudiées pour les plaquettes (notamment le CellVue Red, voir protocole en annexe) mais une coloration spécifique aux CEs s'est avérée préférable lors des essais combinant cellules et plaquettes. L'anticorps monoclonal CD61/FITC (DAKO, Burlington, Ontario, Canada) a été choisi. Il s'agit d'un immunomarquage spécifique de la glycoprotéine membranaire des plaquettes (CD61) (Chou *et al.*, 2003). Cet anticorps est combiné avec une molécule fluorescente (FITC, longueur d'onde est de 488 nm). 15 μ g/ml de l'anti-CD61/FITC ont été dilués dans de la BSA 1% (sérum-albumine bovine), puis 100 μ l d'anticorps ont été déposés sur les plaquettes adhérentes après la perfusion durant 15 min. Une série de 3 lavages par PBS a ensuite été faite pour éliminer l'adhésion non spécifique sur les surfaces, avant la fixation et l'observation au microscope confocal.

2.4.3 Test de thrombogenicité sous force de cisaillement en présence des HUVECs

Après 7j de croissance des CEs sur les différentes surfaces étudiées, celles-ci ont été marquées au Cellvue Maroon et les surfaces transférées dans des chambres de perfusion et

exposées pendant 15 min au sang complet, sous condition de flux similaire que précédemment.. Les plaquettes ont ensuite été colorées (voir section 2.4.2), fixées avec du paraformaldehyde 1 %, puis les surfaces perfusées ont été observées au microscope confocal (Carl Zeiss LSM 510) afin d'observer les cellules et les plaquettes. Les photos ont été prises dans la zone centrale de la surface exposée en perfusion, en excluant les zones entrant et sortant du flux et les bords de la zone de perfusion. Des surfaces non soumises au flux ont également été colorées à titre de comparaison, pour déterminer le pourcentage d'HUVEC détachées de la surface lors de la perfusion.

2.5 Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de test d'analyse de variance ANOVA pour comparer les groupes. Un test de S également été utilisé pour comparer deux groupes. $P < 0.05$ a été considérée statistiquement significative.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Optimisation des revêtements bioactifs pour la formation d'une couche endothéliale

3.1.1 Adhésion et croissance des HUVECs en présence et en absence de fibronectine

Sachant que la FN est bien connue pour améliorer l'adhésion cellulaire, cette étape du projet consistait à comparer l'effet du LP et de la FN et à déterminer si l'adsorption de FN permet d'améliorer encore davantage l'adhésion et la croissance des CE sur le LP. Pour ce faire, la FN a été introduite par adsorption sur les surfaces polymériques, soit le LP, mais aussi sur le PET et le PCP à titre de comparaison. La Figure 3.1 présente des images représentatives de l'adhésion des HUVECs à 4 h sur chacune des surfaces avec et sans FN, après coloration par cristal violet.

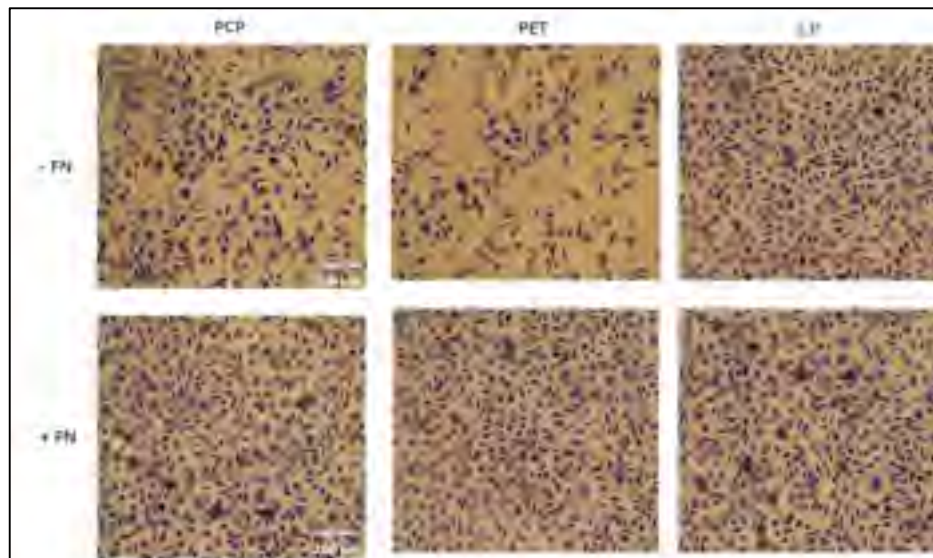


Figure 3.1 Adhésion (4 h) des HUVECs sur les différentes surfaces en (PCP+gélatine, PET et LP, avec (+) et sans (-) FN). Coloration par cristal violet. (Microscopie optique, x100).

La Figure 3.2 quant à elle présente des images représentatives de la croissance à 7 jours des HUVECs sur chacune des surfaces avec et sans FN, après coloration par cristal violet.

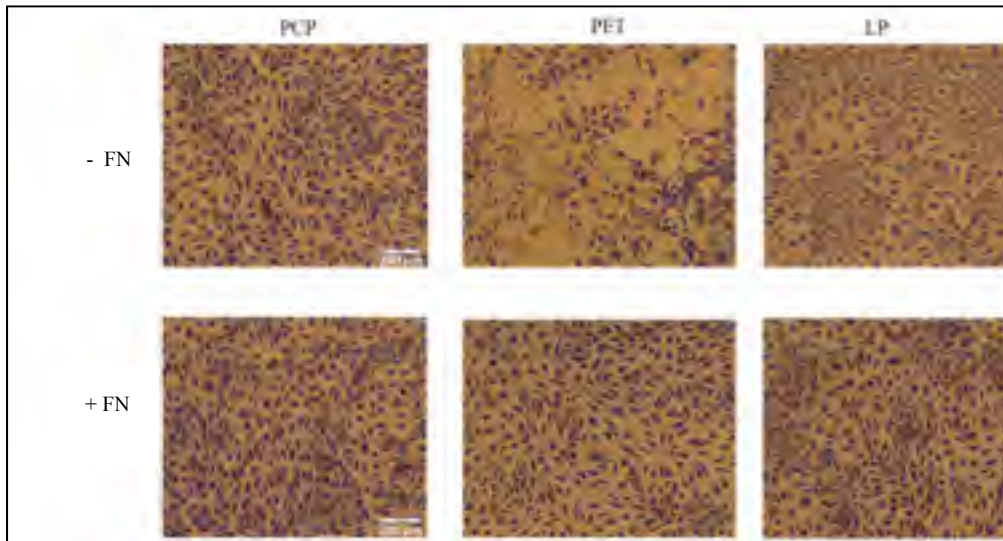


Figure 3.2 Croissance des HUVECs après 7 jours en présence et en absence de (FN). Coloration par cristal violet. (Microscopie optique, x100).

La Figure 3.3 montre les valeurs moyennes de l'adhésion à 4 h et la croissance à 7j des HUVECs sur chacune des surfaces avec et sans FN. L'adhésion cellulaire sur le LP est plus importante que celle observée sur le PET, ce qui est conforme aux travaux antérieurs du groupe (Gigout *et al.*, 2011). Elle est similaire ou légèrement supérieure au PCP (pas de différence significative). De même, la densité cellulaire à 7 jours est plus faible sur le PET, en comparaison avec le PCP et le LP.

L'ajout de FN favorise significativement l'adhésion cellulaire sur le PET ($p < 0.05$) tandis qu'on n'observe pas d'amélioration significative sur le LP et le PCP. L'ajout de la FN a également pour effet de favoriser la croissance des HUVECs sur le PET, sans influencer significativement leur croissance sur le PCP et le LP.

Au final, les surfaces avec FN ne présentent pas de différence significative entre elles. À part le PET vierge, toutes les surfaces présentent une densité de cellules similaire à 7 jours.

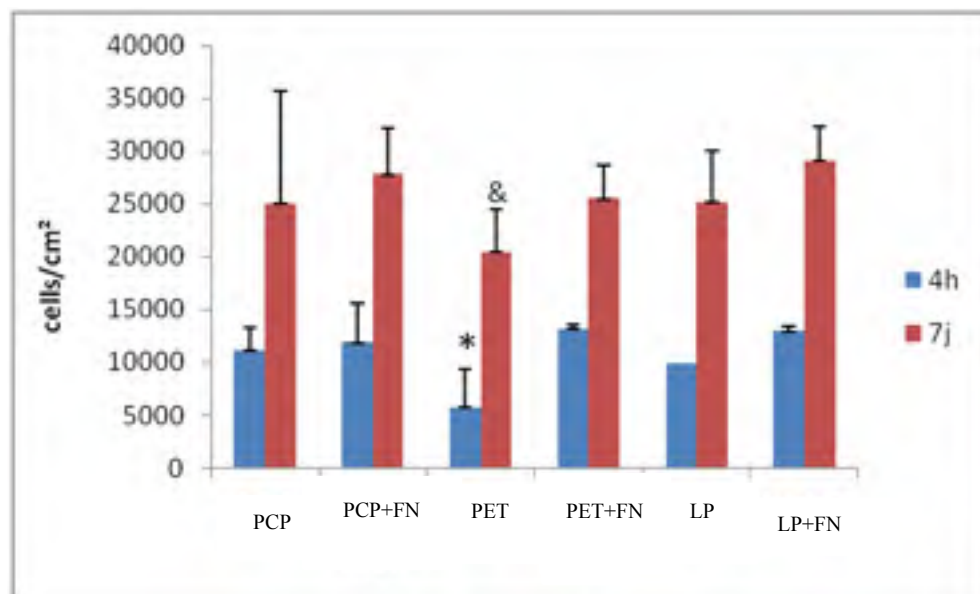


Figure 3.3 Graphique représentant les densités moyennes par $\text{cm}^2 \pm$ écart type ($n= 5$ à 8) de l'adhésion et la croissance des HUVECs en absence et en présence de la FN. (* $p<0.05$ PET est significativement différents des autres surfaces. & $p<0.05$, PET est significativement différents de LP+FN).

3.1.2 Étude du maintien des HUVECs sous condition de flux en présence et en absence de FN.

Sachant qu'il est essentiel, non seulement d'avoir une bonne endothélialisation de la surface, mais également que celle-ci soit maintenue en condition de flux, un test de perfusion a été effectué pour étudier le maintien des CE sur le PET et le LP, en présence et en absence de la FN. Les HUVECs ont été laissées adhérer et croître durant 7 jours sur les surfaces, qui ont été ensuite été perfusées avec du milieu de culture pendant 15 minutes à 37°C . Les images représentatives des surfaces avant et après perfusion sont présentées dans la Figure

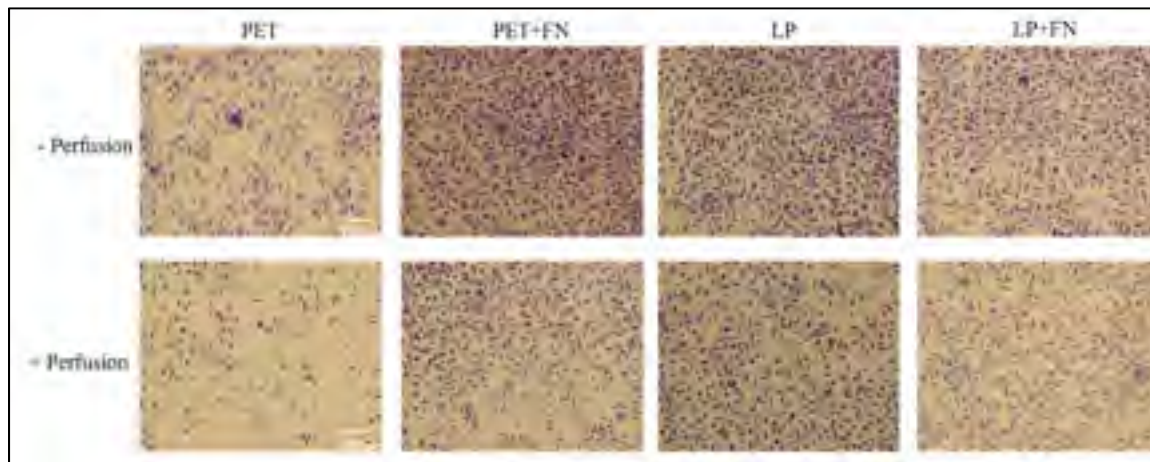


Figure 3.4 Adhésion des cellules HUVECs sur le PET et le LP, sans (-) et après (+) après 15 min. de perfusion, en absence et présence de Fn (microscopie optique, x50)

La Figure 3.5 montre que malgré 7 jours de culture, la densité cellulaire sur le PET non modifié reste faible et que la perfusion entraîne une diminution importante de cette densité. La présence de FN augmente très significativement le nombre de cellules à 7 jours, mais n'empêche pas un détachement cellulaire important sous l'effet de la perfusion. La densité cellulaire finale (après perfusion) sur le PET-FN reste cependant plus élevée que sur le PET non modifié.

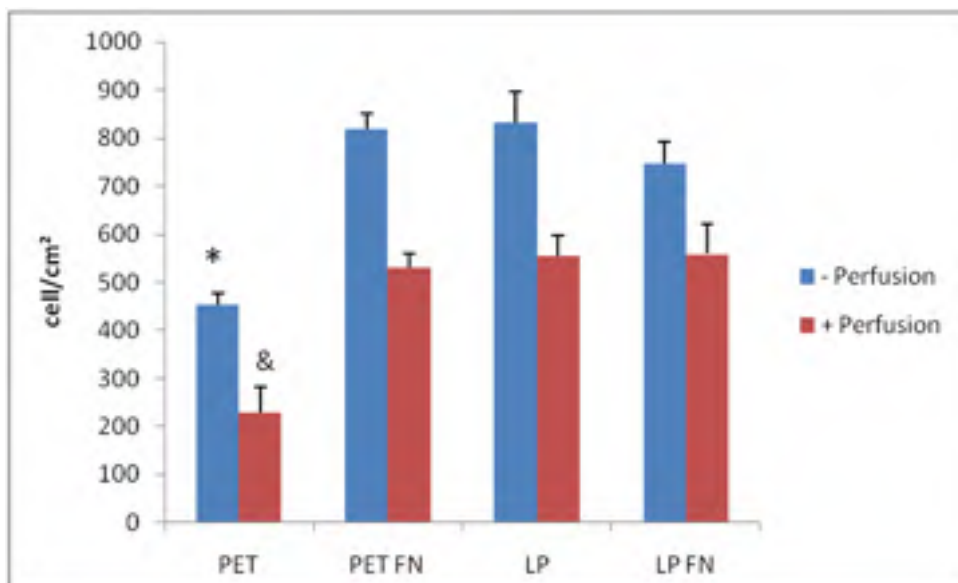


Figure 3.5 Graphique représentant les densités moyennes \pm écart type (n= 6 à 10), après 7j de la croissance des HUVECs avec et sans perfusion (* $p < 0.005$ par rapport aux autres surfaces sans perfusion). (& $p < 0.0001$ par rapport aux autres surfaces avec perfusion)

Les tests similaires sur le revêtement LP confirment la densité accrue des HUVECs après 7 jours de culture par rapport au PET. Celle-ci est légèrement diminuée par la perfusion. Ce résultat n'est pas affecté par l'adsorption préalable de FN. Au final, la densité de cellules après perfusion est semblable à celle du PET avec FN.

D'après ces résultats, l'adsorption de FN à la surface du PET permet d'améliorer l'adhésion et la croissance cellulaire, mais pas d'obtenir un bon maintien cellulaire en condition de flux, puisqu'une partie importante des cellules se sont décollées durant les 15 minutes de perfusion à un taux de cisaillement de 8.5 dynes/cm^2 (voir calcul page 37).

Les résultats sur le LP sont un peu meilleurs, mais également peu convaincants et contredisent légèrement des résultats antérieurs de l'équipe montrant environ 90% de maintien cellulaire sous l'effet du taux de cisaillement de l'ordre de 15 dyne/cm² (Gigout et al 2011). Il serait cependant bon de reproduire les tests.

3.1.3 Étude de l'effet de la Chondroïtine sulfate sur l'adhésion et la croissance des HUVECs.

D'après les études précédentes, la CS permettant d'obtenir une surface non thrombogène (Keuren *et al.*, 2003), il s'avérait intéressant de déterminer sa capacité à favoriser ou non l'adhésion et la croissance des HUVECs. L'adhésion et la croissance des HUVECs sur les surfaces LP+CS ont été comparées au LP, ainsi qu'au PET (contrôle négatif) et au PCP+gélatine (contrôle positif). L'essai a été reproduit 3 fois, pour un nombre total d'échantillons par condition de n=12. La Figure 3.6 présente la densité cellulaire sur les différentes surfaces et aux différents temps (1, 4 et 6 jours), normalisée par rapport au nombre observé à 1 jour sur le PET, ainsi que des images typiques obtenues après coloration au cristal violet.

On observe encore une fois que l'adhésion et la croissance des HUVECs restent limitées sur le PET mais sont nettement accrues sur LP ainsi que sur LP + CS, qui sont tous deux similaires au contrôle positif (PCP). Ainsi le PET vierge est significativement inférieur à toutes les autres surfaces et ce, à tous les temps observés ($p < 0.05$). On n'observe pas de différence entre le LP et LP+CS. Ce résultat met en évidence les propriétés proadhésives de la CS.

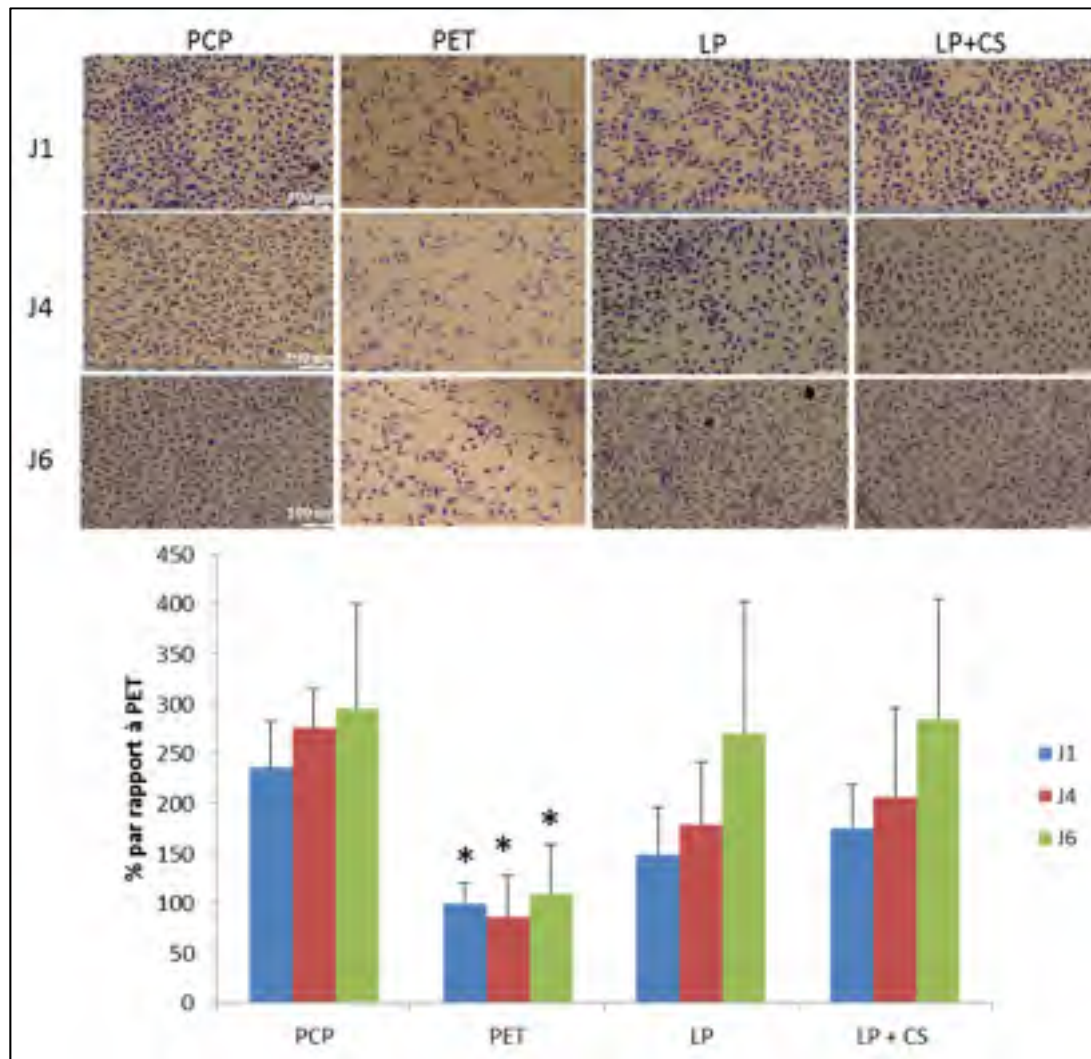


Figure 3.6 Croissance cellulaire des HUVECs après 1, 4 et 6 jours de culture sur le PCP, le PET, le LP en absence et présence de CS greffée, évaluée par coloration au cristal violet. (Microscopie optique, x50). Les résultats sont exprimés en pourcentage \pm Écart type par rapport à la valeur initiale à J1 sur le PET (n = 12, *p<0,05 par rapport à toutes les autres surfaces)

3.2 Étude de la thrombogénicité des surfaces par perfusion

Pour étudier la thrombogénicité des différentes surfaces d'intérêt (PET, LP, LP+CS et LP+CS+EGF), un test de perfusion a été fait, en utilisant du sang complet marqué avec la rhodamine. La Figure 3.7Figure montre des images typiques obtenues.

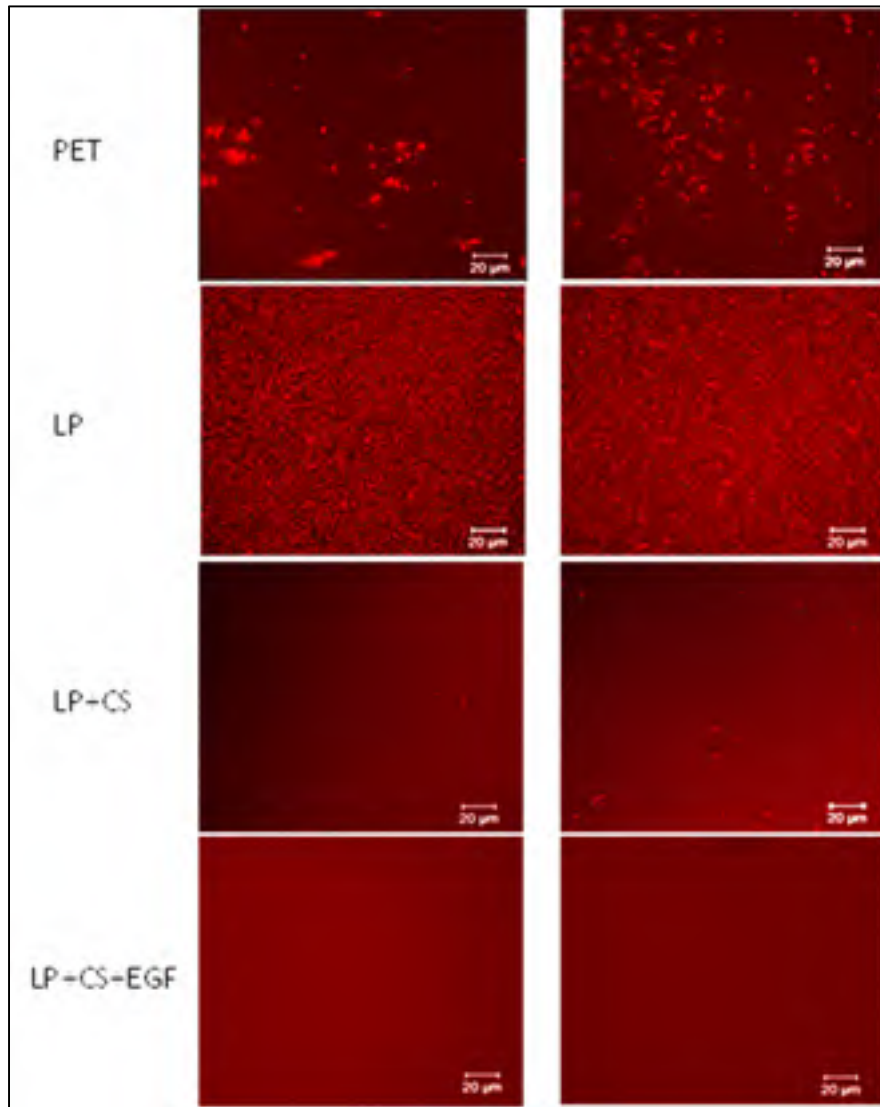


Figure 3.7 Adhésion des plaquettes sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP et greffées avec la CS (LP+CS) sans ou avec EGF (LP+CS+EGF). Perfusion de sang complet marqué avec la rhodamine.

On observe un nombre important des plaquettes à la surface du LP, ce qui correspond bien aux observations lors de la mise au point de la technique (Figure 3.7) et confirme le caractère thrombogène du LP. En comparaison, le PET présente un nombre limité de plaquettes à sa surface après les 15 minutes de perfusion. Ce nombre est encore plus faible pour la CS et la CS après greffage du facteur de croissance EGF.

Ces observations sont confirmées par la quantification du niveau d'adhésion plaquettaire sur les différentes surfaces, obtenu en calculant le pourcentage de recouvrement avec des plaquettes marquées à la rhodamine (Figure 3.8). Moins de 5% de la surface de PET est recouverte de plaquettes tandis que ce taux est de près de 35% sur le LP, ce qui constitue une augmentation très significative ($p < 0.0001$) et confirme que le LP est beaucoup plus thrombogène que le PET. Le greffage de CS diminue l'adhésion plaquettaire à une valeur inférieure à celle observée sur le PET non modifié (0.7%). Le pourcentage de plaquettes est encore plus faible (0.1%; différence non significative avec CS), ce qui indique que la thrombogénicité réduite de la CS a été maintenue suite au greffage de l'EGF sur la CS. Cette expérience confirme le caractère thrombogène du LP par rapport au PET et montre que le greffage de la CS avec ou sans EGF réduit significativement la thrombogénicité du LP.

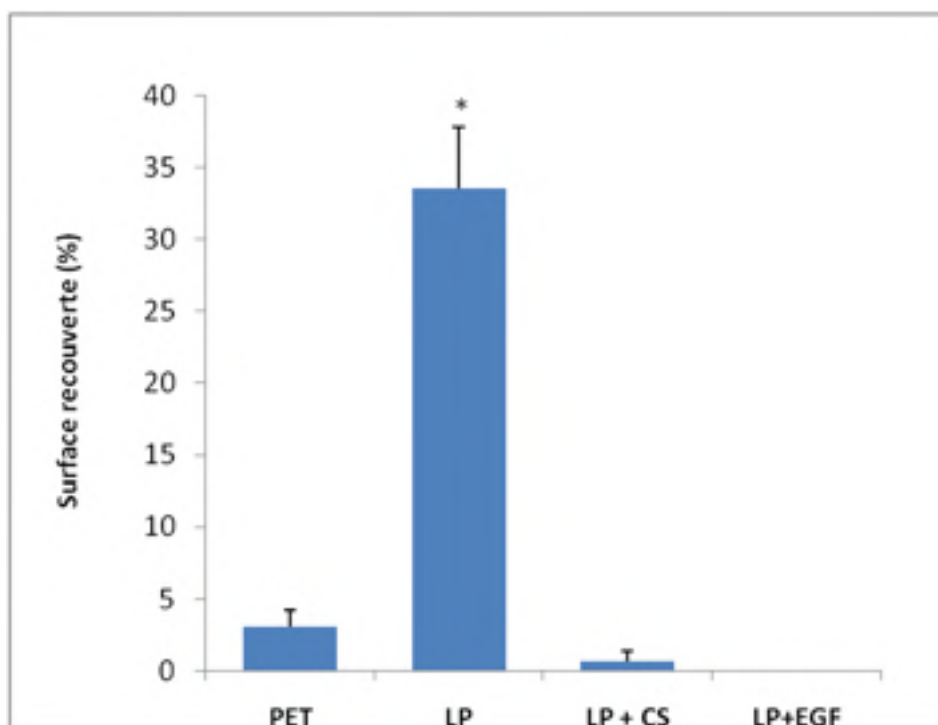


Figure 3.8 Pourcentage de la surface recouverte par des plaquettes après perfusion au sang complet marqué avec la rhodamine, pour les différentes surfaces (PET vierge, et PET avec revêtement de LP, LP+CS et LP+CS+EGF). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm Écart type (n = 5-7, * $p < 0.0001$)

La quantité de plaquettes n'est pas le seul paramètre important. Leur degré d'agrégation et d'activation est un autre paramètre important. C'est pourquoi la morphologie des plaquettes adhérentes aux différentes surfaces modifiées a été observée par MEB. Des images représentatives sont présentées à la Figure 3.9. Sur le PET, malgré une assez faible adhésion plaquettaire et peu de formation d'agrégats, les plaquettes s'avèrent étalées et activées, comme l'atteste la formation de filopodes (Akbar *et al.*, 2011). Sur le LP, les nombreuses plaquettes forment souvent des agrégats plaquettaires accompagnés de filopodes et l'étalement ou la formation des lamellipodes. Par contre, l'adhésion des plaquettes ainsi que le changement morphologique caractéristique de l'activation plaquettaire étaient absents sur les surfaces LP+CS et LP+CS+EGF.

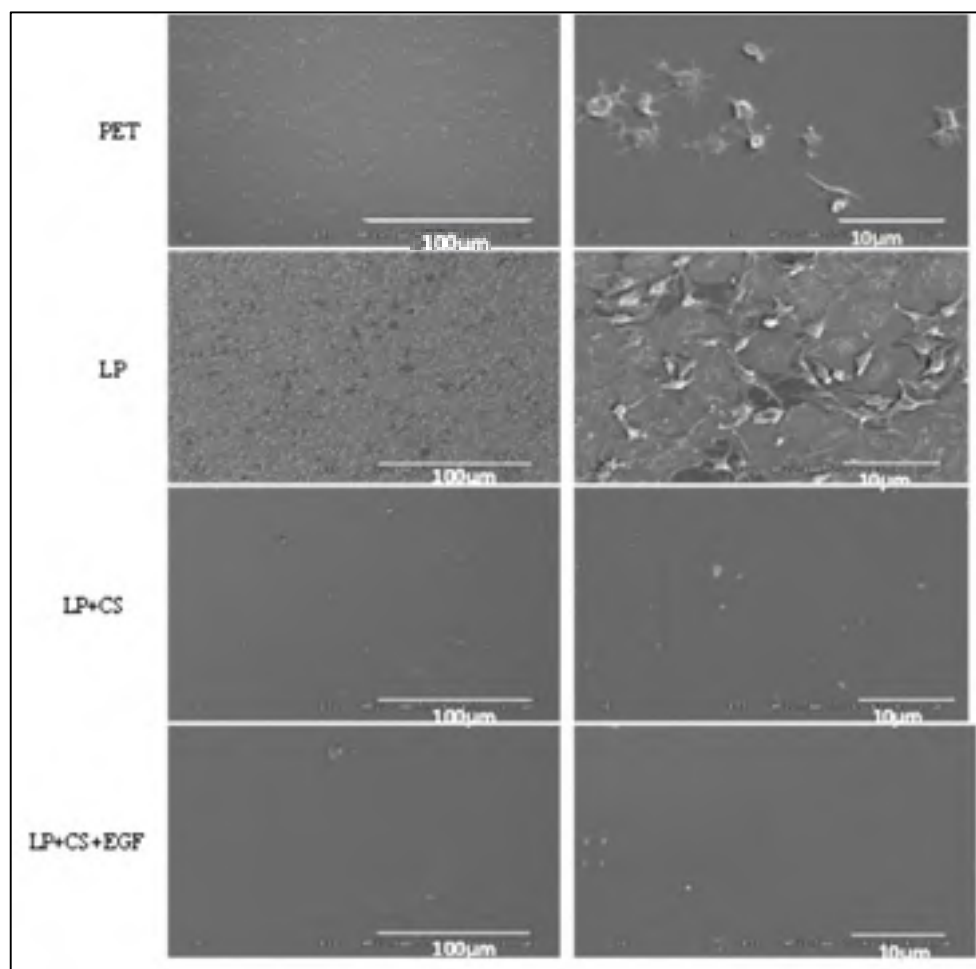


Figure 3.9 Observation par MEB de la morphologie des plaquettes suite à leur adhésion sur différentes surfaces de PET recouvert ou non de LP, et greffées avec la CS (LP+CS) sans ou avec EGF (LP+CS+EGF).

Afin de valider les résultats obtenus par fluorescence et par observation microscopique, un test d'adhésion plus quantitatif, basé sur la quantification des plaquettes marquées à l'indium¹¹¹, tel que déjà mis au point et validé par l'équipe du Pr Merhi (Diener *et al.*, 2009) a été effectué pour mettre en évidence le potentiel thrombogène de différentes surfaces utilisées. La Figure 3.10 présente les résultats de ces expériences.

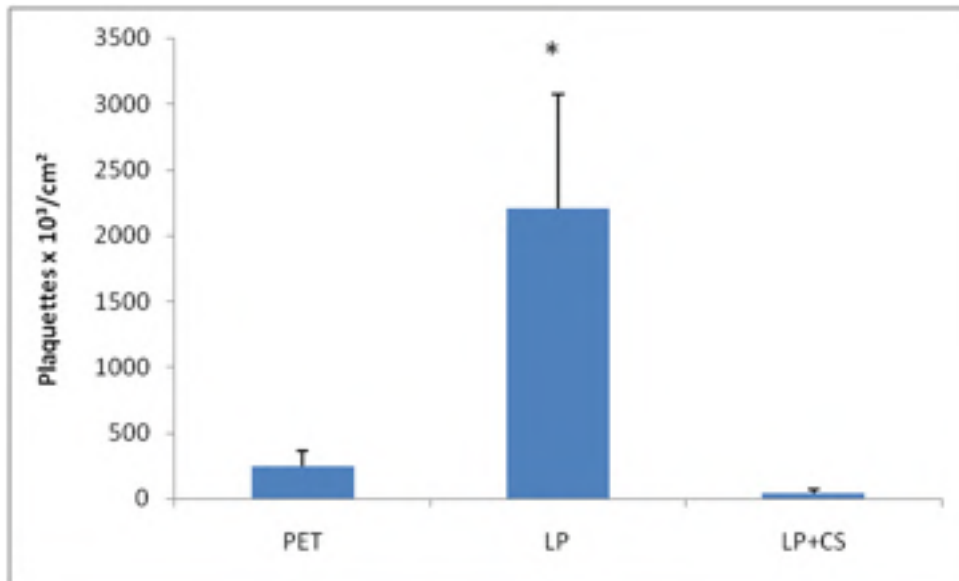


Figure 3.10 Adhésion des plaquettes suite à leur exposition sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP et greffées avec la CS (LP+CS). Cette expérience a été faite avec du sang complet contenant des plaquettes marquées à l'indium¹¹¹. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± Écart type (n = 10, *p<0.0001)

La densité de plaquettes adhérees sur le PET est de $244 \times 10^3 \pm 116$ plaquettes/cm². Cette adhésion est multipliée par environ 10 fois ($2200 \times 10^3 \pm 864$ plaquettes/cm²) sur le LP. Ce rapport entre LP et PET est identique à celui obtenu lors de la mesure du pourcentage de surface recouverte mesurée par rhodamine. Ce résultat valide bien la technique de marquage par fluorescence, qui a l'avantage d'être beaucoup moins chère et plus facile à réaliser. Ces résultats confirment également que la CS permet l'obtention d'une surface non thrombogène, avec une densité de plaquette adhéree encore plus faible que sur le PET (40 ± 30 plaquettes/cm²).

3.3 Effet sur le maintien des HUVECs durant la perfusion et de la thrombogénicité de surfaces après ensemencement cellulaire.

Les surfaces de CS montrant une très faible adhésion plaquettaire et une bonne croissance des HUVECs, elles semblent avoir un potentiel très intéressant pour les applications cardiovasculaires. Il a donc été décidé d'évaluer les surfaces de CS en termes de maintien des

HUVECs durant la perfusion et d'adhésion plaquettaire en présence des HUVECs (comparativement aux surfaces sans HUVECs). Pour cela, le double marquage par Cellvue Marron (cellules) et CD61/FITC (plaquettes) décrit dans la section Matériels et Méthodes a été utilisé.

La Figure 3.11 montre des images typiques d'adhésion plaquettaire obtenue par marquage au CD61/FITC après une série de perfusion de 15 min sur les différentes surfaces, sans culture cellulaire préalable. Elle confirme encore une fois le caractère thrombogène du LP par rapport au PET, tandis que le greffage de la CS réduit très significativement la thrombogénicité du LP. La Figure 3.12 montre quant à elle des images typiques de cellules et plaquettes adhérant sur des surfaces soumises ou non au flux sanguin en perfusion de 15 minutes. Les cellules sont colorées en bleu et les plaquettes en vert.

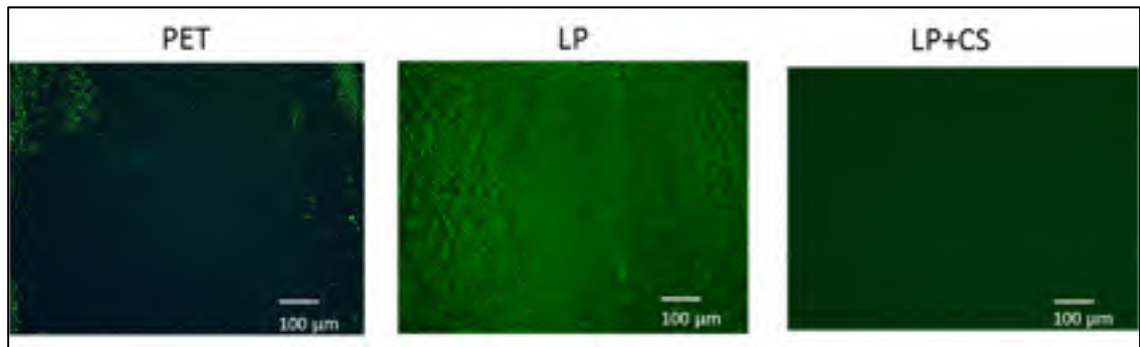


Figure 3.11 Adhésion des plaquettes sur différentes surfaces en PET fonctionnalisées avec le LP (LP) et greffées avec la CS (LP+CS). Cette expérience a été faite avec du sang complet. Les plaquettes adhérentes sur les surfaces après la perfusion ont été marquées au CD61/FITC

On remarque rapidement que, tel qu'attendu, le préensemencement d'HUVEC durant 7 jours modifie la quantité de plaquettes présentes sur les surfaces après perfusion. Le pourcentage de la surface recouverte de plaquettes en absence et en présence de cellules préalablement cultivées est présenté dans le graphique de la Figure 3.13.

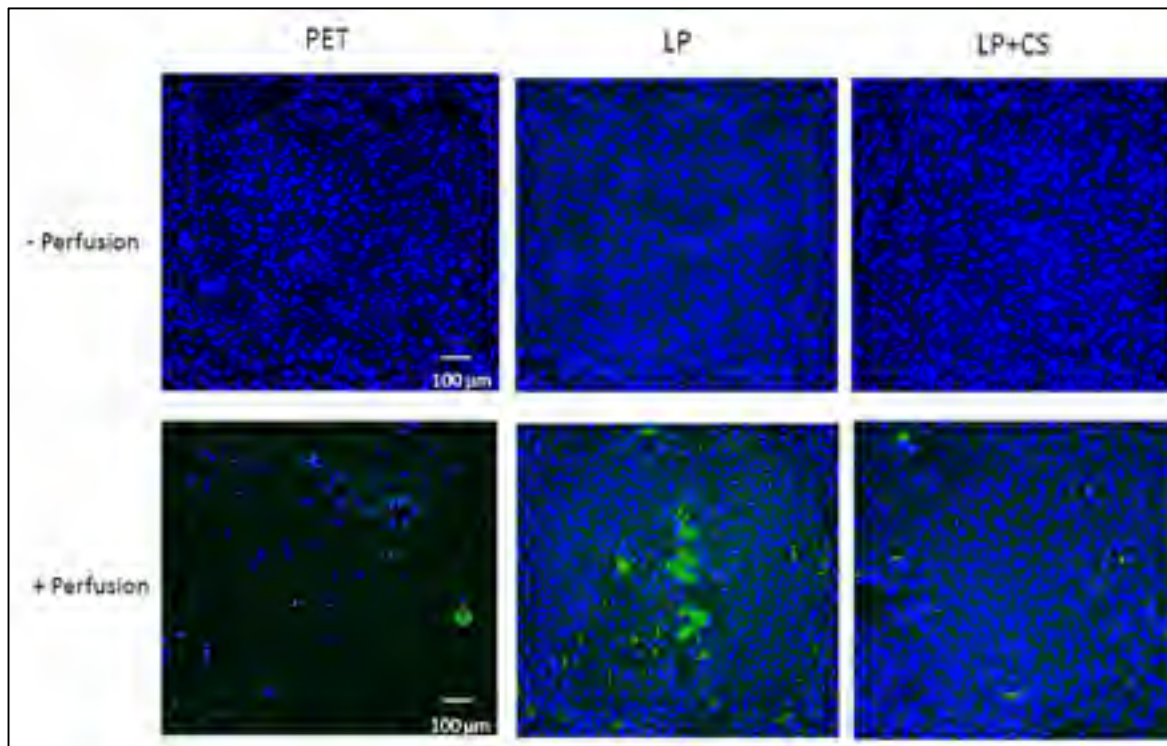


Figure 3.12 Surfaces de PET, LP et LP+CS après croissance des HUVECs (7j) (Marquage au Cellvue Maroon) avant et après perfusion de 15 min au sang complet. Les plaquettes adhérentes sur les surfaces après la perfusion ont été marquées avec CD61/FITC. (microscopie confocale, grossissement 10x).

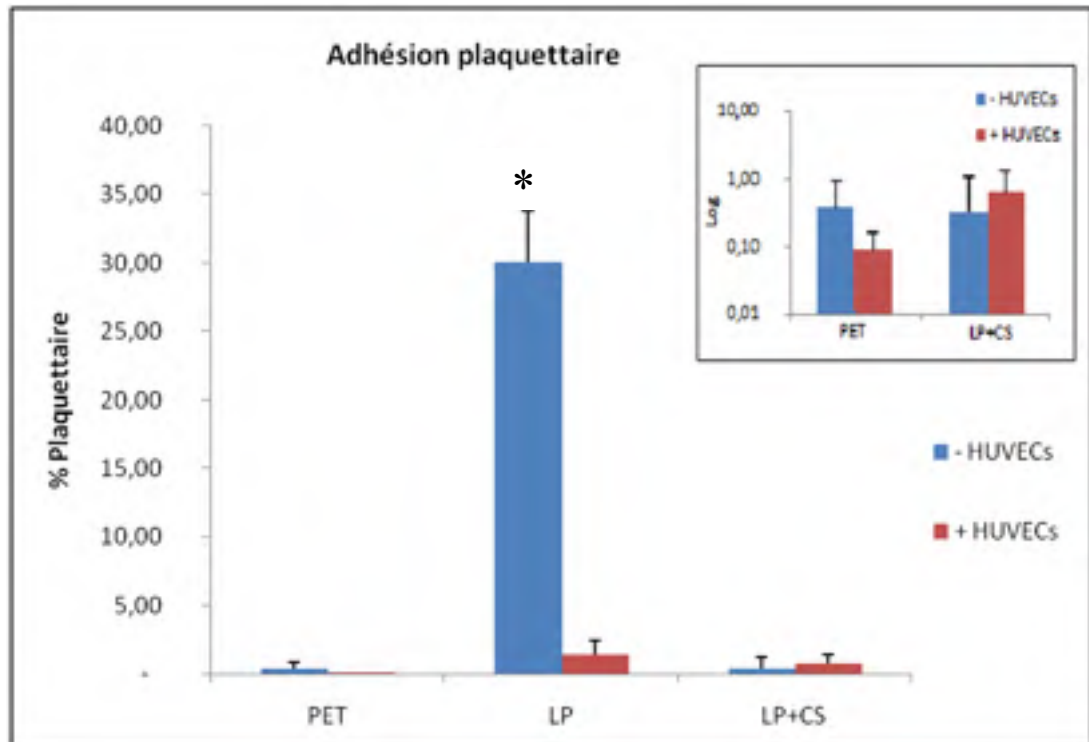


Figure 3.13 Pourcentage de surfaces de PET, LP et LP+CS recouvertes par les plaquettes après perfusion en présence (+HUVEC) et en absence (-HUVEC) de cellules préalablementensemencées. Cette expérience a été faite avec du sang complet. Marquage des plaquettes après la perfusion avec CD61/FITC. Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne \pm Écart type, ($n \geq 7$ * $p < 0.0001$ par rapport à toutes les autres conditions)

On remarque tout d'abord que quelque soit la surface, en présence des HUVECs, l'adhésion plaquettaire est faible. En particulier, les cellules adhérees sur le LP contribue à diminuer très nettement l'adhésion des plaquettes par rapport au LP seul ($p < 0.0001$). On observe également une légère diminution de l'adhésion sur le PET, tandis qu'au contraire, l'adhésion plaquettaire sur la CS tend à augmenter légèrement après culture des HUVEC. Dans ces 2 derniers cas, cependant, la différence n'est pas significative et l'adhésion plaquettaire reste très faible. Qualitativement, on observe sur la Figure 3.14 que l'adhésion plaquettaire tend à avoir lieu dans des zones où il n'y a pas de cellules, soit initialement, soit suite à la perfusion sanguine. On observe en effet un décollement de certaines cellules durant la perfusion, dû au cisaillement induit par le sang. Ce phénomène a été quantifié en calculant la densité cellulaire avant et après perfusion, tel que présenté à la Figure 3.14. On remarque que sur le PET,

même si au départ (après 7 jours de croissance cellulaire) la densité cellulaire était équivalente aux autres surfaces, un pourcentage très important de cellules s'est détaché durant la perfusion ($p < 0.0001$). La densité cellulaire tend à diminuer également sur le LP et LP+CS lors de la perfusion, mais la différence n'est pas significative.

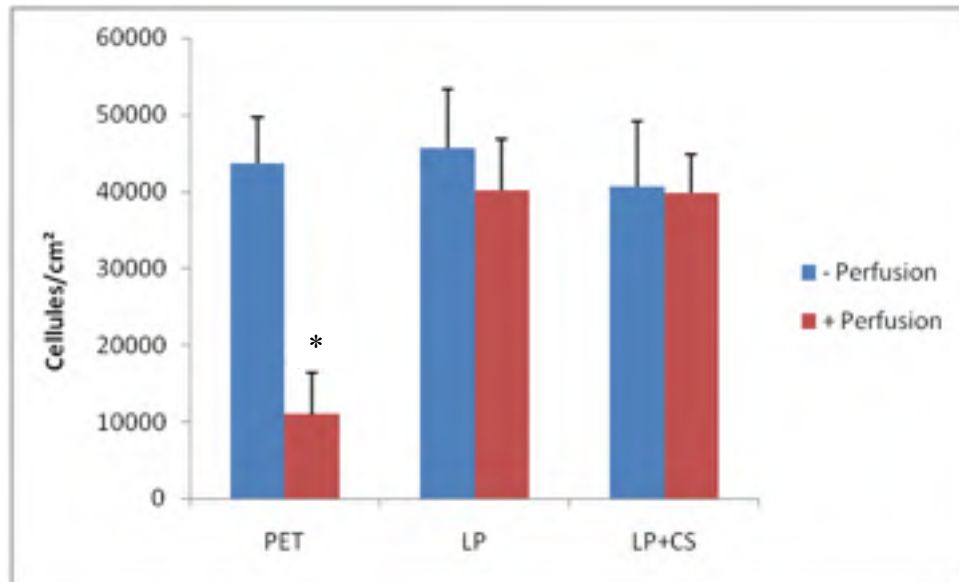


Figure 3.14 Maintien des HUVEC durant la perfusion : densité cellulaire sur différentes surfaces soumises ou non à une perfusion de sang complet. Les HUVECs ont été marquées avec le CellVue maroon. Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne \pm Écart type, $n = 7$ (* $p < 0.0001$ par rapport au PET non perfusé et aux autres surfaces perfusées).

Pour résumer, la résistance au cisaillement des HUVECs cultivées sur les différentes surfaces, la Figure 3.15 montre le pourcentage de la rétention cellulaire après les 15 minutes de perfusion. Le maintien cellulaire sur le PET est faible, d'environ 30% seulement, tandis qu'il est d'environ 80% sur le LP. Il est intéressant de constater que le LP greffé avec la CS montre le taux de rétention cellulaire le plus élevé (supérieur à 90%).

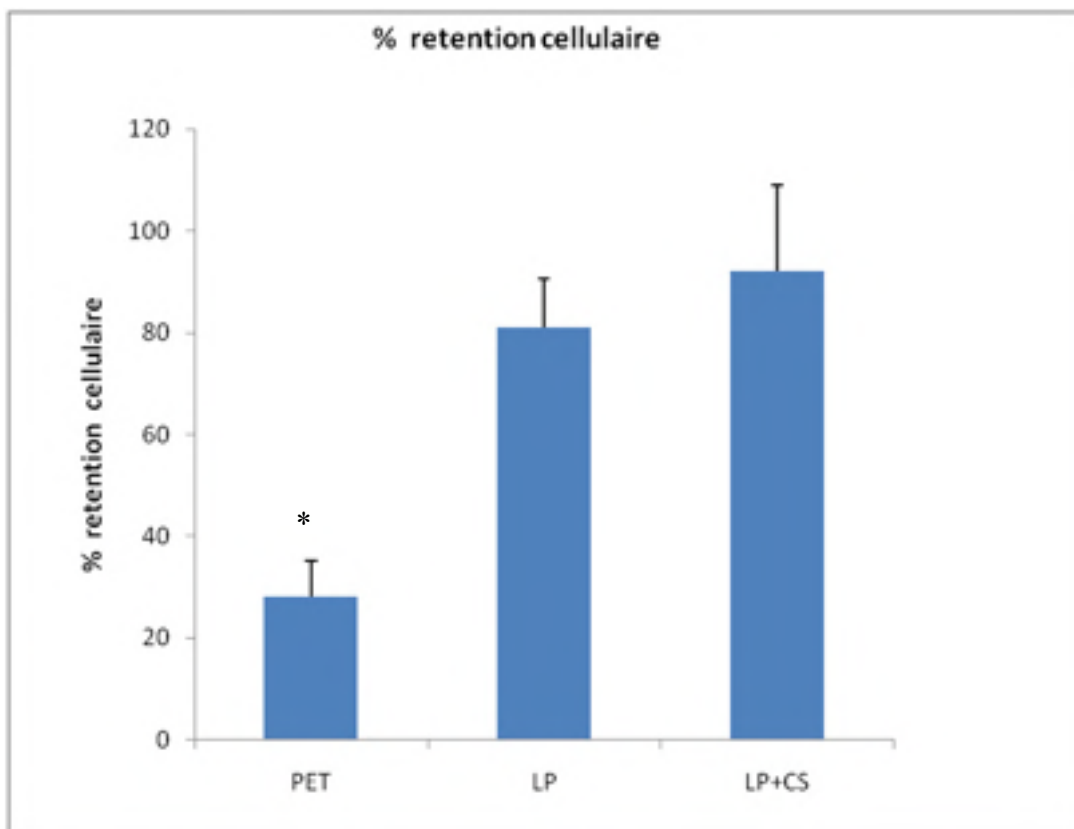


Figure 3.15 Pourcentage de rétention cellulaire sur les différentes surfaces (PET vierge, PET avec LP avec et sans greffage de CS (LP et LP+CS)). Cette expérience a été faite avec du sang complet. Marquage des HUVECs au CellVue maroon. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm Écart type ($n \geq 7$; $*p < 0.0001$ par rapport aux autres surfaces).

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET PERSPECTIVE

4.1 Synthèse des principaux résultats

L'implantation d'une prothèse vasculaire pour substituer des artères pathologiques de petits diamètres est limitée par la problématique de thrombose et le risque d'occlusion de la prothèse à cause des interactions entre les éléments sanguins et la paroi artificielle. L'introduction d'une couche de CEs sur la surface interne est considérée comme une solution prometteuse, puisqu'elle fournit une surface anti-thrombotique entre la circulation sanguine et la surface synthétique. L'utilisation de revêtements bioactifs qui favorisent la croissance, la forte adhésion cellulaire et la résistance au cisaillement des CEs peut donc être une solution à l'échec de la greffe synthétique.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, on a d'abord cherché à optimiser l'adhésion, la croissance et la rétention cellulaire sur le PET par :

- Revêtement plasma LP (riche en amines primaires).
- La FN, élément de la MEC, connue pour favoriser l'adhésion spécifique des cellules via les récepteurs membranaires (intégrines).
- La combinaison des deux.

Le revêtement de LP augmente l'adhésion et la croissance cellulaire des HUVECs à 7 jours sur le PET. Ceci confirme les résultats antérieurs de l'équipe (Gigout *et al.*, 2011) qui illustrent l'importance des groupements amines. Ceux-ci ont un effet important sur l'adhésion et la croissance cellulaire, sans doute en favorisant l'adsorption de certaines protéines adhésives du milieu de culture.

La pré-adsorption de la FN augmente aussi l'adhésion et la croissance des HUVECs sur le PET. Ceci est aussi en accord avec la littérature qui a montré un effet positif de la FN sur la croissance des CEs (Calonder, Matthew et Van Tassel, 2005 ; Sgarioto *et al.*, 2012). Par

contre on n'a pas observé d'effet additif de la FN sur le LP. Le PET+FN et le LP possèdent le même effet sur la croissance cellulaire en comparaison avec le PCP après 7j.

La surface interne des prothèses étant en contact avec le sang circulant, la résistance au cisaillement engendré par le sang sur les HUVECs est également très importante. C'est pourquoi des essais de maintien cellulaire sous perfusion ont été réalisés. Ceux-ci montrent la même tendance, à savoir que le LP et la FN améliorent tous les deux nettement la résistance au cisaillement par rapport au PET vierge, de façon similaire, mais sans bénéfice lorsque l'on combine les deux.

Le décollement des HUVECs reste significatif sur les surfaces de LP, PET+FN et LP+FN par rapport au PET lors des essais de perfusion avec le milieu de culture. Le résultat avec le LP est moins bon que celui obtenu par (Gigout *et al.*, 2011). Il est aussi plus faible que lors des essais de perfusion subséquente avec du sang. Ceci est étonnant puisque la contrainte de cisaillement engendrée par le sang est normalement plus faible que celle engendrée par le milieu de perfusion pour un même taux de cisaillement (840 s⁻¹). Cette différence est sans doute liée à la variabilité des essais ou du LP.

Dans le cadre de ce travail, la FN est simplement adsorbée à la surface et donc peut être dénaturée et mal orientée pour l'interaction avec les cellules. De plus sa stabilité et sa fixation à la surface peuvent être limitées et mener à une désorption sous l'effet du flux sanguin. Il serait possible d'améliorer cela par un greffage covalent avec un bras espaceur de la FN ou simplement d'une séquence peptidique RGD bien connu pour reproduire le site actif responsable de l'adhésion cellulaire sur la FN. Ceci permettrait d'assurer une meilleure stabilité de la FN et la liaison spécifique entre les récepteurs transmembranaires des cellules (Integrines) et leur ligand (RGD) comme l'ont montré de nombreuses équipes (Chen et Hawiger, 1991 ; Tiwari *et al.*, 2003).

Il aurait aussi été intéressant d'étudier l'adhésion et la croissance en milieu sans sérum pour

mieux comprendre le rôle de la couche de protéines qui s'adsorbent et couvre les surfaces du milieu de culture.

Quoi qu'il en soit, la stratégie utilisant la FN est limitée par la thrombogénicité de la surface créée. En effet d'après la revue de littérature, la FN améliore l'adhésion et la croissance cellulaire, mais possède un caractère thrombogène (Birinyi *et al.*, 1987 ; Lambrecht *et al.*, 1986). L'ajout de séquences peptidiques RGD, de plus en plus utilisées à la place de la FN, favorise aussi la thrombogénicité de la surface (Wilson, 2010). On a étudié la thrombogénicité du LP et celui-ci s'avère malheureusement également très thrombogène. Les résultats des tests de perfusion au sang complet montrent une forte adhésion et activation plaquettaire, nettement plus élevée que sur le PET. On observe aussi des petits agrégats plaquettaires, dont le mécanisme de formation est le suivant : lors de l'activation plaquettaire, il se produit des changements membranaires, et cette déformabilité de la membrane plaquettaire rend possible l'agrégation plaquettaire, car lorsque deux plaquettes activées entrent en contact, elles vont s'efforcer d'étendre au maximum cette surface de contact. L'agrégat plaquettaire va croître par apposition successive de nouvelles plaquettes. Au niveau de la membrane plaquettaire, le complexe glycoprotéinique IIb/IIIa est indispensable de cette agrégation. Grâce à ce site, le fibrinogène va se fixer sur la membrane pour former avec le Ca^{++} des ponts interplaquettaires qui permettent la formation de l'agrégat (Martin, 2006).

L'agrégation plaquettaire qui a lieu sur la surface est due aux facteurs agonistes comme le facteur vWF et la thrombine qui stimule l'activation plaquettaire par la granulation des molécules d'adhésion. Celle-ci active les autres plaquettes circulant qui se lient par des ponts de fibrinogène. De plus, ces molécules d'adhésion permettront aux plaquettes d'interagir avec d'autres types cellulaires, dont les globules blancs. Ces interactions entre les plaquettes et les leucocytes jouent un rôle important dans l'inflammation, l'agrégation et la thrombose. Notons que la présence d'adhésion plaquettaire favorise la possibilité de la coagulation sanguine. En effet, le rapport est proportionnel entre l'adhésion plaquettaire et la coagulation, car les plaquettes favorisent l'activation et la synthèse des différentes molécules qui activent

le phénomène de coagulation notamment la thrombine et le facteur tissulaire (Rinder *et al.*, 1991).

La thrombogénicité du LP n'est pas étonnante puisque le LP favorise l'adsorption des protéines notamment le fibrinogène (Thalla *et al.*, 2013). Un autre principe qui peut expliquer que le LP soit thrombogène est que la surface LP riche en amines primaires est donc chargée positivement (NH_3^+) en milieu aqueux; donc, elle peut faire une attraction des plaquettes chargées négativement grâce aux phospholipides membranaires. Enfin, le fait que le LP possède un caractère hydrophile peut favoriser l'adhésion plaquettaire ainsi que cellulaire plus que le PET qui a un caractère hydrophobe. D'ailleurs nos résultats sur le LP semblent similaires à ceux obtenus avec un autre polymère plasma riche en amines primaires, l'allylamine (Chien *et al.*, 2010). Le PET, quant à lui, montre relativement peu de plaquettes adhérentes après le test de perfusion. Pourtant on sait que le PET est loin d'être parfait comme surface non thrombogène. Ceci montre les limites du test *in vitro* utilisé dans le cadre de ce projet. On peut ainsi poser la question de la validité de ces résultats de la thrombogénicité *in vitro* obtenus par notre système de perfusion pour prévoir la réponse réelle et à long terme qui serait obtenue *in vivo*. D'autres tests, notamment chez l'animal, permettraient de confirmer cet effet, notamment à plus long terme.

Le LP seul n'est donc pas plus une solution idéale que la FN, car si la couche des HUVECs n'est pas confluite ou les cellules se décollent, cela expose une surface thrombogène et peut mener à la formation de caillot sanguin et à l'occlusion de la prothèse.

Étant donné les limites de la FN et le LP, il était donc intéressant de chercher une biomolécule à la fois peu thrombogène et capable d'améliorer l'adhésion des HUVECs.

Les résultats antérieurs de notre équipe et quelques données de la littérature suggéraient que la CS était une candidate intéressante pour cette application. En effet, des résultats préliminaires ont montré le caractère low-fouling et pro-adhésif de la CS sur les VSMCs. Ceci a stimulé notre intérêt d'utiliser la CS pour vérifier son caractère non thrombogène et étudier son effet sur la croissance et le maintien des HUVECs.

Les résultats avec la CS montrent que son greffage mène à une adhésion et croissance cellulaire supérieure à celles observées sur le PET vierge, sans différence par rapport au LP. De plus, le greffage de la CS améliore l'attachement et le maintien des cellules sous l'effet du flux sanguin durant les tests de perfusion. En effet, on observe très peu de détachement cellulaire sur le LP et LP+CS alors qu'il reste moins de 25% des cellules dans les mêmes conditions sur le PET. De plus, le test de perfusion nous a permis de démontrer que la CS permet l'obtention d'une surface thromborésistante avec quasiment aucune adhésion plaquettaire, très nettement inférieure à celle observée sur le LP et même tendant à être inférieure au PET (bien que la différence ne soit pas significative).

D'autres équipes ont également montré une faible adhésion plaquettaire sur les surfaces synthétiques en présence de la CS (Keuren *et al.*, 2003). Ceci peut être expliqué par l'effet de charge en milieu aqueux. En effet, les surfaces chargées positivement sont connues pour accélérer le phénomène de thrombose, contrairement aux surfaces chargées négativement qui le ralentissent. C'est le cas du groupement sulfonate de la CS qui est chargée négativement en milieu aqueux (Figure 4.1) (Keuren *et al.*, 2003). Ainsi une modification de surface avec greffage de groupements acide ou d'autres comme l'héparine donnera des surfaces chargées négativement, tandis que la présence de groupements amines (comme ceux sur le LP) donnera une surface chargée positivement. (de Mel *et al.*, 2008).

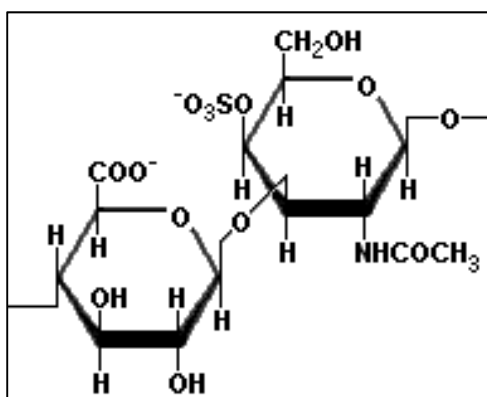


Figure 4.1 Structure chimique de la CS qui présente le groupement sulfonate (SO-O_3^-) chargé négativement

Tirée du site internet <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>

Notons, cependant qu'en présence des HUVECs, les résultats montrent une bonne adhérence des HUVECS avec une diminution très significative de l'adhésion plaquettaire sur le LP après la perfusion, ceci montre que les HUVECs possèdent un caractère non-thrombotique. Bizarrement, on observe au contraire une légère augmentation (non significative) de l'adhésion plaquettaire sur la CS en présence des HUVEC, qui semble se produire là où les cellules ont décollé durant la perfusion. Ceci pourrait être dû à la CS qui se serait détachée avec des cellules durant la perfusion, ou au fait que les HUVECs laissent une matrice extracellulaire thrombogène lorsqu'elles se décollent. Ceci devrait être investigué davantage. La stabilité de la couche de CS durant la perfusion serait notamment à vérifier.

L'utilisation d'un revêtement de CS a donc permis non seulement de diminuer la thrombogénicité de surface, mais aussi de favoriser la présence et le maintien d'une couche de cellules confluentes. Donc le greffage de la CS semble une stratégie intéressante pour créer une surface non thrombogène dans les prothèses vasculaires.

L'introduction de la CS reste cependant limitée par l'obligation de faire un ensemencement des HUVECs avant l'utilisation *in vitro*, puisque la CS favorise aussi l'adhésion et la prolifération des VSMCs (Charbonneau *et al.*, 2011), ce qui peut amener à la progression de la plaque athérosclérotique (Tsaousi *et al.*, 2011). Ceci reste une limite de la CS par rapport à des bio-fonctionnalisations plus spécifiques, comme l'utilisation d'anticorps. Ainsi une méthode d'auto-ensemencement basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques aux CE (anti-CD34) a été mise au point, en les fixant à la surface d'ePTFE afin de capturer les EPC circulantes et de former une monocouche à la surface du matériau implanté en shunt artérioveineux. Cette technique décrite par Rotmans et al (Rotmans, Heyligers et al. 2005) a permis l'endothélisation malgré le développement d'une hyperplasie intimale au niveau des sites d'anastomose. De plus, la stabilité *in vivo* de la CS en tant que surface non thrombogène n'est pas connue. On sait par exemple que le PEG (autre surface anti-fouling) prévient également l'adhésion des plaquettes *in vitro*, mais que son efficacité *in vivo* est limitée (Keuren *et al.*, 2003 ; Thalla *et al.*, 2013)

4.2 Difficultés rencontrées et limites du projet

Ce projet de maîtrise s'est heurté à plusieurs défis techniques. Un des défis a été d'optimiser une méthode de marquage spécifique des plaquettes car la surface LP présente de l'autofluorescence à différentes longueurs d'onde en microscopie confocale. De plus, l'optimisation d'une méthode (simple et peu coûteuse) pour double marquage des cellules et plaquettes en perfusion a été un défi dans ce projet à cause de l'interférence de couleur entre les deux marquages. Ensuite, l'obtention d'une couche de CEs confluyente à 100% sur le LP a été difficile à obtenir.

En ce qui concerne les limites du travail, le caractère laminaire et uniforme du flux sanguin sur les surfaces exposées dans les chambres de perfusion n'a pas été vérifié. On n'a cependant utilisé que les zones centrales des surfaces afin de limiter l'effet possible d'hétérogénéité ou de turbulence dans la zone d'entrée. Aussi, le test de perfusion était limité à un seul temps de perfusion, qui était court (15 minutes) et une seule force de cisaillement. Finalement, le nombre des échantillons testés pour la représentativité des résultats statistiques a été limité (n entre 5 et 12). Ceci dû d'une part à la disponibilité du sang, la longueur des expériences et d'autre part à la disponibilité pour faire le dépôt par plasma de notre revêtement LP sur le PET. Un autre facteur est le problème de fuites cellulaires durant les tests d'adhésion et croissance cellulaire et les fuites sanguines durant la perfusion, ce qui nous a obligés à éliminer certaines expériences de nos analyses.

4.3 Perspectives

Dans la continuité de ce projet, il sera intéressant d'étudier le maintien cellulaire à différentes forces de cisaillement et à différents temps de perfusion en présence de CS ainsi qu'après greffage du facteur de croissance. De plus, l'étude de la morphologie cellulaire, après la perfusion pour déterminer les points d'adhésion focale des HUVECs sur les surfaces et l'interaction cellulaire, sera aussi intéressante, en utilisant des méthodes d'immunomarquage des protéines comme l'actine et la vinculine. L'étude de l'expression protéique, notamment la sur- ou sous-expression de molécules thrombogéniques (TF, tPA, vWF,) ou anti-

thrombogéniques (thrombomoduline, PAI-1) pourrait également être effectuée afin de confirmer le caractère (Anti- ou pro-coagulant) des cellules après perfusion sur les différentes surfaces. Enfin, l'utilisation d'autres types cellulaires comme les CEs progénitrices sera intéressante pour obtenir plus facilement une surface avec une bonne confluence cellulaire chez le patient.

CONCLUSION

En général, si peu de dispositifs ont atteint le stade de l'application clinique, des progrès encourageants ont cependant été réalisés dans le domaine de l'ingénierie vasculaire permettant d'envisager le développement du substitut vasculaire idéal.

L'objectif principal de ce travail de maîtrise était d'évaluer certains revêtements bioactifs pour obtenir des prothèses vasculaires anti-thrombotiques. Ce travail s'inscrit dans une optique thérapeutique afin de réduire, grâce à leur endothélialisation, le caractère thrombogène des prothèses vasculaires.

Dans ce travail, nous avons utilisé le revêtement LP pour améliorer l'adhésion et la croissance des HUVECs, et nous avons optimisé le revêtement LP par l'introduction de la CS pour avoir une surface moins thrombogène. Nous avons également mis au point une méthode simple et relativement peu coûteuse pour étudier simultanément le maintien cellulaire et l'adhésion plaquettaire sur les surfaces mise en contact avec du sang.

L'adsorption de la FN sur le LP n'améliore pas l'adhésion et la croissance des HUVECs par rapport au LP seul. Comme le LP est hautement thrombogène, nous avons appliqué la CS afin de diminuer l'adhérence des plaquettes sur les revêtements et ainsi réduire la thrombogenicité, mais sans affecter l'adhésion des HUVECs. Pour optimiser le revêtement en présence des CEs, les tests de perfusion montrent une diminution de l'adhésion plaquettaire en présence des HUVECS avec un bon maintien de ces cellules en condition de flux sanguin sur le LP+CS par rapport au LP seul. Donc le revêtement LP+CS montre un résultat prometteur pour la conception d'une prothèse vasculaire de diamètre inférieur à 6 mm.

Cette étude ouvre la voie à une nouvelle stratégie de modification des prothèses pour le traitement des maladies vasculaires, mais de nombreuses études complémentaires seront nécessaires afin de valider l'intérêt et son potentiel à long terme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, T., E. Shin, Y. Merhi, P. Thai et L. Bilodeau. 2001. «Influence of stent expansion states on platelet deposition in an extracorporeal porcine arteriovenous shunt model using a multichannel perfusion chamber». *J Korean Med Sci*, vol. 16, no 1, p. 31-38.
- Aird, W. C. 2007. «Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms». *Circ Res*, vol. 100, no 2, p. 158-173.
- Ait-Oufella, H., E. Maury, S. Lehoux, B. Guidet et G. Offenstadt. 2010. «The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis». *Intensive Care Med*, vol. 36, no 8, p. 1286-1298.
- Akbar, H., X. Shang, R. Perveen, M. Berryman, K. Funk, J. F. Johnson, N. N. Tandon et Y. Zheng. 2011. «Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation». *PLoS One*, vol. 6, no 7, p. e22117.
- Alobaid, N., H. J. Salacinski, K. M. Sales, G. Hamilton et A. M. Seifalian. 2005. «Single stage cell seeding of small diameter prosthetic cardiovascular grafts». *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 33, no 3, p. 209-226.
- Aper, T., A. Haverich et O. Teebken. 2009. «New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts». *Vasa*, vol. 38, no 2, p. 99-122.
- Badimon, L., V. Turitto, J. A. Rosemark, J. J. Badimon et V. Fuster. 1987. «Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene». *J Lab Clin Med*, vol. 110, no 6, p. 706-718.
- Berard, X., M. Remy-Zolghadri, C. Bourget, N. Turner, R. Bareille, R. Daculsi et L. Bordenave. 2009. «Capability of human umbilical cord blood progenitor-derived endothelial cells to form an efficient lining on a polyester vascular graft in vitro». *Acta Biomater*, vol. 5, no 4, p. 1147-1157.

- Birinyi, L. K., E. C. Douville, S. A. Lewis, H. S. Bjornson et R. F. Kempczinski. 1987. «Increased resistance to bacteremic graft infection after endothelial cell seeding». *J Vasc Surg*, vol. 5, no 1, p. 193-197.
- Blockmans, D., H. Deckmyn et J. Vermynen. 1995. «Platelet activation». *Blood Rev*, vol. 9, no 3, p. 143-156.
- Bordenave, L., P. Menu et C. Baquey. 2008. «Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes». *Expert Rev Med Devices*, vol. 5, no 3, p. 337-347.
- Budd, J. S., P. R. Bell et R. F. James. 1989. «Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts». *Br J Surg*, vol. 76, no 12, p. 1259-1261.
- Calonder, C., H. W. Matthew et P. R. Van Tassel. 2005. «Adsorbed layers of oriented fibronectin: a strategy to control cell-surface interactions». *J Biomed Mater Res A*, vol. 75, no 2, p. 316-323.
- Canver, C. C. 1995. «Conduit options in coronary artery bypass surgery». *Chest*, vol. 108, no 4, p. 1150-1155.
- Chakfe, N., F. Dieval, F. Thaveau, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand et J. G. Kretz. 2004. «[Vascular graft prosthesis]». *Ann Chir*, vol. 129, no 5, p. 301-309.
- Charbonneau, C., B. Liberelle, M. J. Hebert, G. De Crescenzo et S. Lerouge. 2011. «Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating». *Biomaterials*, vol. 32, no 6, p. 1591-1600.
- Chen, C. S., et J. Hawiger. 1991. «Reactivity of synthetic peptide analogs of adhesive proteins in regard to the interaction of human endothelial cells with extracellular matrix». *Blood*, vol. 77, no 10, p. 2200-2206.
- Chien, H. W., S. P. Wu, W. H. Kuo, M. J. Wang, C. Lee, J. Y. Lai et W. B. Tsai. 2010. «Modulation of hemocompatibility of polysulfone by polyelectrolyte multilayer films». *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 77, no 2, p. 270-278.

- Chien, S. 2008a. «Effects of disturbed flow on endothelial cells». *Ann Biomed Eng*, vol. 36, no 4, p. 554-562.
- Chien, S. 2008b. «Role of shear stress direction in endothelial mechanotransduction». *Mol Cell Biomech*, vol. 5, no 1, p. 1-8.
- Chou, T. C., E. Fu, C. J. Wu et J. H. Yeh. 2003. «Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 302, no 3, p. 480-483.
- Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. 2002. «Plasma-surface modification of biomaterials. ». *Materials Science and Engineering*, vol. 5-6, p. 143-206.
- Chung, T. W., D. Z. Liu, S. Y. Wang et S. S. Wang. 2003. «Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale». *Biomaterials*, vol. 24, no 25, p. 4655-4661.
- Couet, F., N. Rajan et D. Mantovani. 2007. «Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering». *Macromol Biosci*, vol. 7, no 5, p. 701-718.
- Cunningham, K. S., et A. I. Gotlieb. 2005. «The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis». *Lab Invest*, vol. 85, no 1, p. 9-23.
- Davidovic, L., D. Vasic, R. Maksimovic, D. Kostic, D. Markovic et M. Markovic. 2004. «Aortobifemoral grafting: factors influencing long-term results». *Vascular*, vol. 12, no 3, p. 171-178.
- Davies, P. F. 2009. «Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology». *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, vol. 6, no 1, p. 16-26.
- de Mel, A., G. Jell, M. M. Stevens et A. M. Seifalian. 2008. «Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review». *Biomacromolecules*, vol. 9, no 11, p. 2969-2979.
- Dejana, E. 1993. «Endothelial cell adhesive receptors». *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 21 Suppl 1, p. S18-21.
- Dela Paz, N. G., and P. A. D'Amore,. 2008. «Arterial versus venous endothelial cells». *Cell Tissue Res*, vol. 335, p. 5-16.

- Deutsch, M., J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss et P. Zilla. 1999. «Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience». *Surgery*, vol. 126, no 5, p. 847-855.
- Deutsch, M., J. Meinhart, P. Zilla, N. Howanietz, M. Gorlitzer, A. Froeschl, A. Stuempflen, D. Bezuidenhout et M. Grabenwoeger. 2009. «Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts». *J Vasc Surg*, vol. 49, no 2, p. 352-362; discussion 362.
- Diener, J. L., H. A. Daniel Lagasse, D. Duerschmied, Y. Merhi, J. F. Tanguay, R. Hutabarat, J. Gilbert, D. D. Wagner et R. Schaub. 2009. «Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779». *J Thromb Haemost*, vol. 7, no 7, p. 1155-1162.
- Dimitrievska, S., M. Maire, G. A. Diaz-Quijada, L. Robitaille, A. Ajji, L. Yahia, M. Moreno, Y. Merhi et M. N. Bureau. 2011. «Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts». *Macromol Biosci*, vol. 11, no 4, p. 493-502.
- El-Ad, B. 2007. «Insomnia in circadian dysrhythmias». *Rev Neurol Dis*, vol. 4, no 2, p. 64-74.
- Engler, A. J., F. Rehfeldt, S. Sen et D. E. Discher. 2007. «Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation». *Methods Cell Biol*, vol. 83, p. 521-545.
- Fernandez, P., A. Deguet, L. Pothuaud, G. Belleanne, P. Coste et L. Bordenave. 2005. «Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for in vitro endothelial cell seeding». *Biomaterials*, vol. 26, no 24, p. 5042-5047.
- Feugier, P., R. A. Black, J. A. Hunt et T. V. How. 2005. «Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress». *Biomaterials*, vol. 26, no 13, p. 1457-1466.
- FitzGerald, G. A. 1991. «Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists». *Am J Cardiol*, vol. 68, no 7, p. 11B-15B.
- Galley, H. F., et N. R. Webster. 2004. «Physiology of the endothelium». *Br J Anaesth*, vol. 93, no 1, p. 105-113.

- Gigout, A., J. C. Ruiz, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur et S. Lerouge. 2011. «Nitrogen-rich plasma-polymerized coatings on PET and PTFE surfaces improve endothelial cell attachment and resistance to shear flow». *Macromol Biosci*, vol. 11, no 8, p. 1110-1119.
- Goldman, S., K. Zadina, T. Moritz, T. Ovitt, G. Sethi, J. G. Copeland, L. Thottapurathu, B. Krasnicka, N. Ellis, R. J. Anderson et W. Henderson. 2004. «Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study». *J Am Coll Cardiol*, vol. 44, no 11, p. 2149-2156.
- Hahn, C., et M. A. Schwartz. 2009. «Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 10, no 1, p. 53-62.
- Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. 1999. «Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms». *Circulation*, vol. 1, no 99, p. 96-104.
- Hsu, S. H., S. H. Sun et D. C. Chen. 2003. «Improved retention of endothelial cells seeded on polyurethane small-diameter vascular grafts modified by a recombinant RGD-containing protein». *Artif Organs*, vol. 27, no 12, p. 1068-1078.
- Jun, H. W., et J. West. 2004. «Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization». *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 15, no 1, p. 73-94.
- Kaushal, S., 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 et J. E. Mayer, Jr. 2001. «Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo». *Nat Med*, vol. 7, no 9, p. 1035-1040.
- Kent, K. C., A. Oshima, T. Ikemoto et A. D. Whittemore. 1988. «An in vitro model for human endothelial cell seeding of a small diameter vascular graft». *ASAIO Trans*, vol. 34, no 3, p. 578-580.
- Keuren, J. F., S. J. Wielders, G. M. Willems, M. Morra, L. Cahalan, P. Cahalan et T. Lindhout. 2003. «Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces». *Biomaterials*, vol. 24, no 11, p. 1917-1924.

- Kim, M. S., Y. N. Shin, M. H. Cho, S. H. Kim, S. K. Kim, Y. H. Cho, G. Khang, I. W. Lee et H. B. Lee. 2007. «Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces». *Tissue Eng*, vol. 13, no 8, p. 2095-2103.
- Kouvroukoglou, S., K. C. Dee, R. Bizios, L. V. McIntire et K. Zygourakis. 2000. «Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides». *Biomaterials*, vol. 21, no 17, p. 1725-1733.
- Lambrecht, L. K., B. R. Young, R. E. Stafford, K. Park, R. M. Albrecht, D. F. Mosher et S. L. Cooper. 1986. «The influence of preadsorbed canine von Willebrand factor, fibronectin and fibrinogen on ex vivo artificial surface-induced thrombosis». *Thromb Res*, vol. 41, no 1, p. 99-117.
- Langille, B. L. 1993. «Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix». *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 21 Suppl 1, p. S11-17.
- Lee, J. H., G. Khang, J. W. Lee et H. B. Lee. 1998. «Platelet adhesion onto chargeable functional group gradient surfaces». *J Biomed Mater Res*, vol. 40, no 2, p. 180-186.
- Lerouge, S., A. Major, P. L. Girault-Lauriault, M. A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer et M. J. Hebert. 2007. «Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair». *Biomaterials*, vol. 28, no 6, p. 1209-1217.
- Li, Y. S., J. H. Haga et S. Chien. 2005. «Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells». *J Biomech*, vol. 38, no 10, p. 1949-1971.
- Lusis, A. J. 2000. «Atherosclerosis». *Nature*, vol. 407, no 6801, p. 233-241.
- Martin, C. Rio, B. Vallet, B. 2006. *Physiologie Humaine Appliquée*. France: Wolters Kluwer, 324 p.
- Merhi, Y., M. King et R. Guidoin. 1997. «Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: neutrophil, platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions». *J Biomed Mater Res*, vol. 34, no 4, p. 477-485.

- Moon, J. J., et J. L. West. 2008. «Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angio-genesis in biomaterials». *Curr Top Med Chem*, vol. 8, no 4, p. 300-310.
- Nerem, R. M. 1984. «Atherogenesis: hemodynamics, vascular geometry, and the endothelium». *Biorheology*, vol. 21, no 4, p. 565-569.
- Ohashi, T. S. 2005. «Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: experimental and numerical approach». *Fluid Dynamics Research*, vol. 37, no 40-59.
- Papaioannou, T. G., et C. Stefanadis. 2005. «Vascular wall shear stress: basic principles and methods». *Hellenic J Cardiol*, vol. 46, no 1, p. 9-15.
- Peter, K., P. Nawroth, C. Conradt, T. Nordt, T. Weiss, M. Boehme, A. Wunsch, J. Allenberg, W. Kubler et C. Bode. 1997. «Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 17, no 3, p. 505-512.
- Remy, M., R. Bareille, V. Rerat, C. Bourget, J. Marchand-Brynaert et L. Bordenave. 2013. «Polyethylene terephthalate membrane grafted with peptidomimetics: endothelial cell compatibility and retention under shear stress». *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 24, no 3, p. 269-286.
- Rinder, H. M., J. L. Bonan, C. S. Rinder, K. A. Ault et B. R. Smith. 1991. «Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood». *Blood*, vol. 78, no 7, p. 1730-1737.
- Roquer, J., T. Segura, J. Serena et J. Castillo. 2009. «Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study». *Cerebrovasc Dis*, vol. 27 Suppl 1, p. 25-37.
- Ruiz JC, St-Georges-Robillard A, Thérésy C, Lerouge S, Wertheimer MR. 2010. «Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability. ». *Plasma Processes and Polymers*.
- Ruiz, Juan-Carlos, Amelie St-Georges-Robillard, Charles Theresy, Sophie Lerouge et Michael R. Wertheimer. 2010a. «Fabrication and characterisation of amine-rich organic thin films: Focus on stability». *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no Compendex, p. 737-753.

- Ruiz, Juan-Carlos, Amélie St-Georges-Robillard, Charles Thérésy, Sophie Lerouge et Michael R. Wertheimer. 2010b. «Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability». *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no 9-10, p. 737-753.
- Sarkar, S., K. M. Sales, G. Hamilton et A. M. Seifalian. 2007. «Addressing thrombogenicity in vascular graft construction». *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 82, no 1, p. 100-108.
- Schwartz, S. M., et L. Liaw. 1993. «Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries». *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 21 Suppl 1, p. S31-49.
- Sgarioto, M., P. Vigneron, J. Patterson, F. Malherbe, M. D. Nagel et C. Egles. 2012. «Collagen type I together with fibronectin provide a better support for endothelialization». *C R Biol*, vol. 335, no 8, p. 520-528.
- Shireman, P. K., et W. H. Pearce. 1996. «Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease». *AJR Am J Roentgenol*, vol. 166, no 1, p. 7-13.
- Shirota, T., H. He, H. Yasui et T. Matsuda. 2003. «Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing». *Tissue Eng*, vol. 9, no 1, p. 127-136.
- Taubman, M. B., J. T. Fallon, A. D. Schecter, P. Giesen, M. Mendlowitz, B. S. Fyfe, J. D. Marmur et Y. Nemerson. 1997. «Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis». *Thromb Haemost*, vol. 78, no 1, p. 200-204.
- Thalla, P. K., A. Contreras-Garcia, H. Fadlallah, J. Barrette, G. De Crescenzo, Y. Merhi et S. Lerouge. 2013. «A versatile star PEG grafting method for the generation of nonfouling and nonthrombogenic surfaces». *Biomed Res Int*, vol. 2013, p. 962376.
- Tiwari A, Kidane A, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM. 2003. «Extraction of cells for single-stage seeding of vascular-bypass grafts.». *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 38, p. 35-41.
- Tiwari, A., A. Kidane, H. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton et A. M. Seifalian. 2003. «Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate». *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 25, no 4, p. 325-329.

- Tortora, Gerard j. 1988. «Principes d'anatomie et de physiologie. Book.». vol. 1 p. 459-551.
- Truica-Marasescu, Florina, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Andreas Lippitz, Wolfgang E. S. Unger et Michael R. Wertheimer. 2008. «Nitrogen-rich plasma polymers: Comparison of films deposited in atmospheric- and low-pressure plasmas». *Thin Solid Films*, vol. 516, no 21, p. 7406-7417.
- Tsaousi, A., H. Williams, C. A. Lyon, V. Taylor, A. Swain, J. L. Johnson et S. J. George. 2011. «Wnt4/beta-catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening». *Circ Res*, vol. 108, no 4, p. 427-436.
- Vara, D. S., H. J. Salacinski, R. Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton et A. M. Seifalian. 2005. «Cardiovascular tissue engineering: state of the art». *Pathol Biol (Paris)*, vol. 53, no 10, p. 599-612.
- Wang, X., P. Lin, Q. Yao et C. Chen. 2007. «Development of small-diameter vascular grafts». *World J Surg*, vol. 31, no 4, p. 682-689.
- Ward, M. R., D. J. Stewart et M. J. Kutryk. 2007. «Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives». *Catheter Cardiovasc Interv*, vol. 70, no 7, p. 983-998.
- Williams, S. K., B. E. Jarrell, L. Friend, J. S. Radomski, R. A. Carabasi, E. Koolpe, S. N. Mueller, S. C. Thornton, T. Marinucci et E. Levine. 1985. «Adult human endothelial cell compatibility with prosthetic graft material». *J Surg Res*, vol. 38, no 6, p. 618-629.
- Wilson, Samuel E. 2010 *Vascular Access: Principles and Practice*. US: Wolters Kluwer, 317 p.
- Xu, H., R. Deshmukh, R. Timmons et K. T. Nguyen. 2011. «Enhanced endothelialization on surface modified poly(L-lactic acid) substrates». *Tissue Eng Part A*, vol. 17, no 5-6, p. 865-876.
- Xue, L., et H. P. Greisler. 2003. «Biomaterials in the development and future of vascular grafts». *J Vasc Surg*, vol. 37, no 2, p. 472-480.

- Zhang, Z., Z. Wang, S. Liu et M. Kodama. 2004. «Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses». *Biomaterials*, vol. 25, no 1, p. 177-187.
- Zilla, P., R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka et M. Kadletz. 1987. «Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report». *J Vasc Surg*, vol. 6, no 6, p. 535-541.