



HAL
open science

Optimisation de la structure textile des prothèses vasculaires pour un développement en monocouche des cellules endotheliales

Sébastien François

► **To cite this version:**

Sébastien François. Optimisation de la structure textile des prothèses vasculaires pour un développement en monocouche des cellules endotheliales. Autre. Université de Haute Alsace - Mulhouse; Université Laval (Québec, Canada), 2009. Français. NNT : 2009MULH2389 . tel-00590477

HAL Id: tel-00590477

<https://theses.hal.science/tel-00590477>

Submitted on 3 May 2011

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

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

SÉBASTIEN FRANÇOIS

**OPTIMISATION DE LA STRUCTURE TEXTILE DES
PROTHESES VASCULAIRES POUR UN
DEVELOPPEMENT EN MONOCOUCHE DES
CELLULES ENDOTHELIALES**

Cotutelle de Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval (Canada)
dans le cadre du programme de doctorat en **génie des matériaux et de la métallurgie**
pour l'obtention du grade de **philosophiæ doctor (Ph.D.)**
et à l'école doctorale Jean-Henry Lambert de l'Université de Haute-Alsace (France)
dans le cadre du programme de **doctorat en mécanique**
pour l'obtention du grade de **docteur de mécanique**

DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES MINES, DE LA MÉTALLURGIE ET DES
MATÉRIAUX
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC (CANADA)

ÉCOLE DOCTORALE JEAN-HENRY LAMBERT
UNIVERSITÉ DE HAUTE-ALSACE
MULHOUSE (FRANCE)

2010

Résumé

Les prothèses vasculaires textiles en polyéthylène téréphtalate (PET) sont utilisées depuis plus de cinquante ans en chirurgie cardiovasculaire. Elles sont fiables pour les grands diamètres (>8mm), cependant des occlusions se présentent souvent après implantation pour les petits diamètres (6-8mm). L'occlusion survient, car la surface des prothèses est peu hémocompatible. Or, l'hémocompatibilité des prothèses serait largement améliorée si ces dernières se recouvraient d'une couche de cellules endothéliales qui tapissent naturellement les vaisseaux sanguins. Cependant, ce recouvrement n'est pas ou peu observé sur les prothèses implantées. Les matrices protéiniques qui servent avant tout à perméabiliser la prothèse et qui recouvrent les prothèses n'ont pas d'effet positif sur l'endothélialisation. Ce projet vise à mettre en évidence que les textiles bruts ne sont pas un support viable pour le développement de ces cellules endothéliales, puis propose de remplacer les matrices protéiniques par un recouvrement synthétique. Pour ce faire, de l'acide poly-L-lactique solubilisé a été filé sous forme de nanofibres non tissées et déposées sur la surface luminale de la prothèse textile de PET. L'étirage par jet d'air utilisé pour former ces fibres a été d'abord caractérisé selon un modèle plan, puis adapté à la forme tubulaire des prothèses. Les nanofibres ont été évaluées sur le plan de la cytocompatibilité, de l'adhérence et de la prolifération avec un modèle de cellules endothéliales animales. Enfin, ce travail vise à optimiser l'adhérence de ces fibres sur le PET par l'emploi d'une technique de modification de surface par plasma à pression atmosphérique. Les résultats montrent qu'il est possible de produire des nanofibres d'acide polylactique et de contrôler leur diamètre en ajustant la concentration de la solution. Ces nanofibres permettent de sceller la paroi de la prothèse textile et présentent des taux de cristallinité variables en fonction des paramètres de filage. Enfin, les cellules endothéliales prolifèrent en monocouche sur des prothèses recouvertes de nanofibres. Par ailleurs, il est possible d'optimiser l'adhérence des nanofibres sur le PET avec un traitement par plasma à pression atmosphérique. En conclusion nous avons proposé une alternative prometteuse à l'enduction traditionnelle des prothèses pour favoriser la prolifération en monocouche des cellules endothéliales.

Abstract

Textile vascular prostheses are made with polyethylene terephthalate or Dacron™ (PET). For more than fifty years they have represented the gold standard for large diameter replacements (>8mm). Unfortunately, they show poor patency rate for smaller diameter grafts (6-8mm), despite a huge need for that kind of calibre. Mainly due to thrombosis or hyperplasia, graft failures can be explained by meagre hemocompatibility. Among the many factors involved in the complex biological reactions after implantation, lack of neoendothelialization of the inner wall of the graft can be one reason explaining this poor hemocompatibility, and protein coating used today as sealant did not prove to enable any increase of endothelial cell colonization. Therefore, this project aimed to prove that bare textiles are not a good support to stand endothelial cells' proliferation. It was thus proposed to replace protein coating by a synthetic interface, developed to propose an adapted geometry for an optimal endothelial cells development. Porous and flexible, this interface should follow prosthesis movements and biodegrades slowly to be replaced by patient own extracellular matrix. Poly(L-lactic) acid was therefore chosen to be formed as a nanofibres mesh on the PET textile prostheses luminal surface. Air jet spinning process was first evaluated in a basic planar model to determined optimal parameters for nanofibres production. Endothelial cells compatibility, adhesion and proliferation were tested. Then air jet spinning was dedicated to tubular shape of textile vascular prostheses. Nanofibres mesh were analysed for chemical and physical properties, and covered graft were tested for water permeability. Lastly, atmospheric pressure plasma treatment was performed to optimize PLLA nanofibres adhesion on PET. Results showed that nanofibre diameters were controlled by polymer concentration. Nanofibre cristallinities depend of spinning parameters. Air jet spinning allows quick covering of textile surfaces with a dense net of nanofibre scelling the inner wall of the prosthesis, even in tubular samples. Moreover, endothelial cells show monolayer proliferation on these nanofibres. Finally, Polylactic acid adhesion on PET was optimized with atmospheric pressure plasma. In conclusion, we bring a new solution to cover inner wall of prostheses, allowing a monolayer proliferation of endothelial cells.

Avant-propos

Depuis plus de cinquante années, les progrès dans la conception et la réalisation de substituts vasculaires ont permis de sauver un nombre sans cesse grandissant de vies. Cependant, malgré de nombreux efforts, les taux d'échec pour les prothèses de petits diamètres demeurent trop importants, alors que l'utilisation de ces petits substituts augmente continuellement. La communauté scientifique mondiale poursuit la recherche sur la mise au point d'une nouvelle génération de prothèses vasculaires, plus hémocompatibles, plus adaptées et plus fiables. De nombreuses pistes sont explorées, parmi lesquelles l'ingénierie tissulaire, la fonctionnalisation de surface ou encore l'étude de nouveaux matériaux. Ce travail de doctorat s'inscrit donc dans le cadre d'une recherche mondiale et les résultats proposés ajouteront une petite pierre à l'édifice. Si une approche structurelle a été privilégiée dans ce travail, j'ai néanmoins la conviction que c'est par la convergence de toutes les disciplines (biologie, chimie, physique, mécanique) qu'émergera une alternative aux prothèses actuelles. En ce sens, ce travail n'est donc qu'une étape parmi d'autres et dont le but est globalement l'amélioration de la survie des patients atteints de pathologies vasculaires nécessitant le remplacement de certains de leurs vaisseaux sanguins.

Cette thèse se compose d'une introduction visant à établir clairement le contexte du sujet, puis de trois chapitres traitant des travaux visant à résoudre la problématique évoquée. Chacun de ces trois chapitres est constitué d'un article scientifique publié ou soumis à une revue avec comité de lecture.

Tous les articles intégrés dans ce travail ont été rédigés par l'auteur de cette thèse, qui a participé à toutes les étapes de l'élaboration des manuscrits; de la conception des études, à la collecte des données, de l'analyse des résultats à la rédaction des articles. Les co-auteurs ont apporté leur aide pour la réalisation de certaines manipulations, ainsi que pour l'émulation, le questionnement et le débat scientifique, aussi bien que pour la relecture et la correction des manuscrits. Ces co-auteurs sont Antoine Jaffre, stagiaire ingénieur au Laboratoire d'Ingénierie de Surface de l'Université Laval de Québec, Christian Sarra-Bournet, doctorant au Laboratoire d'Ingénierie de Surface de l'Université Laval de Québec, le Professeur Nabil Chakfé, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, le Professeur Bernard Durand, Professeur des

Universités et Directeur du pôle biomecanique du Laboratoire de Physique et Mécanique Textile, Vice Président Recherche de l'Université de Haute Alsace à Mulhouse, ainsi que le Professeur Gaétan Laroche, directeur du Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Professeur titulaire et Directeur du département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux à la Faculté des sciences et de génie de l'Université Laval à Québec.

L'article 1 (Sébastien François, Nabil Chakfé, Bernard Durand, Gaétan Laroche. Effect of Textile Micro-Texture of Polyester Prosthesis on the Adhesion and Proliferation of Endothelial Cells) est publié dans la revue *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* (*Trends Biomat. Artif. Organs* 2008, 22(2): p89-99). Il traite de l'influence de la structure textile sur le comportement des cellules endothéliales, notamment sur leur capacité à proliférer en monocouche sur une structure non adaptée. J'ai conçu et réalisé toutes les expérimentations décrites dans cet article. Je suis l'auteur de toutes les illustrations et j'en ai rédigé la première version au complet. La proportion de mon travail s'élève à 85%. Mes co-auteurs ont contribué au 15% restant par leur conseil, leur suivi et leur aide concernant la correction et la traduction de cet article.

L'article 2 (Sébastien François, Nabil Chakfé, Bernard Durand, Gaétan Laroche. A poly(L-lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses) a été accepté en Mars 2009 pour publication dans la revue *Acta Biomaterialia* (*Acta Biomaterialia* 2009, 5(7): p2418-2428). Cet article porte sur la mise au point d'un nouveau procédé de filage permettant de produire des nanofibres d'acide polylactique. Il propose leur usage afin d'en recouvrir les textiles des prothèses vasculaires dans le but de fournir une surface biodégradable propice au développement en monocouche des cellules endothéliales. Ma contribution à cet article s'élève à 90%. J'ai mis au point le système de filage par jet d'air, testé et optimisé ses performances, effectué les cultures cellulaires et réalisé les illustrations. J'ai également rédigé la première version de cet article. Mes co-auteurs ont permis la réalisation de cet article par leur suivi scientifique, leur correction et par un travail de relecture et de traduction.

L'article 3 (Sébastien François, Christian Sarra-Bournet, Antoine Jaffre, Nabil Chakfé, Bernard Durand, Gaétan Laroche. Characterization of an air-spun poly(L-lactic acid) nanofibre mesh) a été accepté pour publication en Janvier 2010 dans la revue *Journal of*

Biomedical Research Part B. Ce dernier article traite de l'adaptation du système de filage par jet d'air à la forme tubulaire des prothèses, de la caractérisation physico-chimique des nanofibres obtenues ainsi que de l'optimisation de l'adhérence de celles-ci sur une surface modèle de PET. J'ai réalisé tous les travaux d'adaptation du système de filage, ainsi que les tests associés. J'ai élaboré et réalisé les protocoles de caractérisation physico-chimique des nanofibres et j'ai effectué tous les traitements mathématiques et statistiques des données. J'ai rédigé l'intégralité de l'article dans sa première version, sauf la section méthode sur le traitement par plasma. Ma contribution s'élève à 60%. Christian Sarra Bournet a effectué les analyses XPS, a rédigé la section sur le traitement par plasma dans la Méthode et a participé au processus de relecture et de traduction, pour une contribution totale de 15%. Antoine Jaffre a réalisé les modifications par plasma des substrats de PET et leurs revêtements avec des nanofibres de PLLA, ainsi que les tests de pelage. Sa contribution est de 10%. Les autres co-auteurs, les Professeurs Chakfé, Durand et principalement Laroche, ont contribué aux 15% restant par leur questionnement scientifique et leur correction.

Il est également à noter que la bibliographie de chacun des trois articles est intégrée dans la bibliographie globale de la thèse.

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu à mes deux directeurs de thèse. Le Pr. Laroche m'a fait profiter de la pertinence de son questionnement scientifique et de son expertise, de sa disponibilité et de son écoute, de sa gentillesse et de ses éclats de rire ! Sans lui cette thèse n'aurait certainement pas existé. Merci à lui pour l'ambiance de travail si stimulante qu'il sait mettre en œuvre avec son équipe, quelle saine émulation ! Le Pr. Durand, à l'origine de l'épisode québécois de ma vie, a quant à lui su me donner le goût du dépassement de soi, la passion de la science et de cet infini questionnement. Merci donc à tous les deux pour vos conseils et votre soutien dans ce travail. Je n'oublie pas le Pr. Nabil Chakfé, co-auteur de tous mes travaux, que je remercie chaleureusement pour sa présence, ses remarques, sa confiance, la pêche aux p'tits poissons des chenaux, son entrain et surtout son indéfectible soutien.

Je tiens à remercier les membres du comité d'examen doctoral, Pr. Alain Garnier et Pr. Marc-André Fortin, qui m'ont aimablement suivi et aidé à bien cerner ce sujet de thèse.

J'exprime ensuite toute ma gratitude aux membres de ce jury de thèse, qui ont accepté avec enthousiasme de juger ce travail, Pr. Laurence Bordenave et Pr. Martin King.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidé et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Le LIS restera pour moi une des expériences marquantes de ma vie. Merci à Christian, pour toutes ces discussions, ton amour du Québec et cet esprit critique branché au 10 000V. Merci à Karine, pour les bons conseils sur la bio et la glace au nitrogène, à Chewie, le roi du Labo, pour toute l'aide que tu m'as fournie, à Pascale pour tous ces bons moments à papoter. Merci aussi à Marie France, à Jacques et à Jean pour vos conseils et votre aide précieuse. Un petit clin d'œil à Nav, qui a mis tant de joie dans les couloirs et à Matteo pour ses bonnes Pastas ! Merci aussi à l'équipe Biomécanique du LPMT, la bande du Geprovas ! Riaz, merci pour ton accueil et ton soutien ! Merci aussi à Andreï, toujours présent, à Coralie et à Wallid. Un grand merci à Daniel : quoi que tu en dises, ton enseignement de qualité et ton incommensurable savoir ont marqué ma façon de voir la science. Merci aussi à Florence et Fred pour votre aide et vos conseils. Je tiens également à remercier spécialement Christian pour ses conseils au tour et la bonne ambiance dans l'atelier méca !

Merci enfin à M. Nardin, à Mme Anselme ainsi qu'à Loïc Vidal et Fabien Schnell de l'ICSI-CNRS (France) pour leur temps, leurs aides et les riches conseils qu'ils m'ont prodigués.

Sans financement ce travail n'aurait pas pu aboutir, aussi je souhaite remercier le CRSNG (Canada) pour son soutien financier au sein de l'équipe de Gaétan Laroche, le conseil régional d'Alsace (France), les fondations A. V. Wallach et L. Dreyfus (France) pour leurs soutiens au volet français de cette thèse de cotutelle. Je tiens également à remercier le GEPROVAS pour son aide et son soutien.

Merci à tous mes amis, Arnaud, Bruno, Cyril, Gaétan, Lionel, Marc, Mathieu, Nico, Philippe et Yann. Merci de votre soutien, de votre écoute et de tous ces incroyables moments partagés avec vous ! Merci aussi à nos familles d'adoption, celle de la Belle Province, Elaine et Patrice, votre amitié nous donnera toujours un prétexte pour venir vous voir au-delà de l'Atlantique, et celle du Ch'Nord, François, Claude et Michel, votre accueil est tellement chaleureux !

Merci à mes parents, Aimé et Monique, à Sophie et à Pierre, pour votre confiance et votre présence. À ma grand-mère, mamie Tic Tac et à ma Tante Adèle, merci de toujours vous faire du souci pour nous. Merci également à ma belle famille, Patricia, Norbert, Cyrille, Peggy, Olivier, Killian et Solène, pour tous vos encouragements.

Enfin, merci à toi Sandra, ma source de motivation, petite touche d'espièglerie qui rend la vie plus belle. Sans toi, rien de tout cela n'aurait vu le jour, alors merci pour ton amour, ton soutien, ton courage, ta détermination et ta patience face à mon « maudit » caractère. Finalement, merci à toi Ilona, mon petit éclat de soleil, ton sourire est ce qui me pousse à avancer dans cette vie !

À Sandra, à Ilona, à notre petit bout...

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos.....	iii
Remerciements.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvii
1. Introduction.....	1
1.1. Mise en contexte.....	2
1.1.1. Système vasculaire[2].....	2
1.1.2. Endothélium.....	7
1.1.3. Athérosclérose.....	18
1.2. Problématique : inadaptation des substituts vasculaires synthétiques.....	21
1.2.1. Constat clinique.....	21
1.2.2. Causes d'échec d'implantation.....	22
1.3. Optimisation des substituts vasculaires.....	26
1.3.1. Effet de la structure sur l'endothélialisation.....	28
1.3.2. Les nouveaux matériaux.....	30
1.3.3. Mise en forme des nouveaux matériaux.....	32
1.3.4. Surface et endothélialisation.....	33
1.3.5. L'ensemencement cellulaire et ingénierie tissulaire.....	35
1.4. Points clés.....	37
1.5. Objectifs de la thèse.....	38
1.6. Stratégie de travail.....	39
2. Chapitre 1 - Article 1 : Effet de la microtexture des prothèses en polyester textile sur l'adhérence et la prolifération des cellules endothéliales.....	42
2.1. Avant propos.....	44
2.2. Résumé.....	44
2.3. Abstract.....	45
2.4. Introduction.....	46
2.5. Materials and methods.....	47
2.5.1. Materials.....	47
2.5.2. Methods.....	48
2.5.3. Statistical analysis.....	51
2.6. Results.....	52
2.6.1. SEM observations:.....	52
2.6.2. AFM observations:.....	53
2.6.3. Cell adhesion tests.....	54
2.6.4. Proliferation tests.....	55
2.6.5. Fluorescence microscopy.....	56
2.7. Discussion.....	60
2.8. Conclusion.....	63
2.9. Acknowledgments.....	64

3. Chapitre 2 - Article 2 : Un échafaudage de nanofibres d'acide Polylactique pour cellules endothéliales sur les prothèses vasculaires.....	65
3.1. Avant-propos	67
3.2. Résumé.....	67
3.3. Abstract.....	68
3.4. Introduction.....	69
3.5. Materials and methods.....	71
3.5.1. Materials	71
3.5.2. Methods	73
3.5.3. Statistical analyses	75
3.6. Results.....	76
3.6.1. PLLA air spinning	76
3.6.2. SEM observations.....	76
3.6.3. AFM observations.....	78
3.6.4. Chemical analyses.....	79
3.6.5. Water permeability	79
3.6.6. Cell adhesion tests	79
3.6.7. Cell proliferation tests.....	80
3.6.8. SEM cell observations	81
3.6.9. Fluorescence observations	82
3.7. Discussion.....	83
3.8. Conclusion	87
3.9. Acknowledgements.....	88
4. Chapitre 3 - Article 3 : Caractérisation d'un réseau de nanofibres d'acide poly(L-lactique) produit par filage par jet d'air	89
4.1. Avant propos.....	91
4.2. Résumé.....	91
4.3. Abstract.....	92
4.4. Introduction.....	93
4.5. Materials and methods.....	95
4.5.1. PLLA nanofibre deposition	95
4.5.2. PLLA nanofibre characterization.....	96
4.5.3. PET substrate plasma treatment and adhesion characterization	99
4.5.4. Statistical analysis.....	102
4.6. Results.....	102
4.6.1. PLLA nanofibre deposition	102
4.6.2. PLLA nanofibre characterization.....	104
4.6.3. PET substrate plasma treatment and adhesion characterization	107
4.7. Discussion.....	111
4.7.1. PLLA nanofibres deposition and characterization.....	111
4.7.2. PLLA fibres adhesion optimization.....	116
4.8. Conclusion	118
4.9. Acknowledgments	119
5. Discussion générale	121
5.1. Discussion.....	121
5.1.1. Effet de la structure textile.....	121
5.1.2. Création d'une interface biodégradable	122

5.1.3.	Adaptation du filage par jet d'air aux prothèses tubulaires	127
5.1.4.	Optimisation de l'adhésion des nanofibres	128
5.2.	Perspectives	130
	Conclusion générale.....	135
	Bibliographie.....	136
	Appendice 1 : Travaux non publiés.....	150
	Étude de la réponse athérosclérotique des cellules endothéliales sous flux dynamique	150
	Système de culture dynamique	150
	Sélection de facteurs typiques des conditions athérosclérotiques	155
	Résultats.....	156
	Discussion.....	157
	Conclusion	159
	Étude de la cristallinité des nanofibres de PLLA par diffraction des rayons X.....	160
	Appendice 2 : Techniques d'analyses.....	165
	Angle de contact	165
	Analyseur Mécanique Dynamique.....	165
	Calorimétrie à balayage différentiel	165
	Dosage d'immunosorption liée à enzyme (ELISA)	166
	Microscopie à force atomique.....	167
	Microscopie électronique à balayage.....	168
	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X.....	168
	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	169
	Appendice 3 : Protocoles	171
	Protocole de culture des BAECs, adhérence et prolifération.....	171
	Préparation des échantillons	172
	Préparation des produits :	172
	Culture de cellules en préparation des tests :	172
	Test d'adhérence et de prolifération :	172
	Marquage DAPI/rhodamine-phalloïdine	174
	Montage des échantillons sur lamelle de verre :	174
	Tests ELISA.....	175
	Concentration des Anticorps.....	175
	Préparation des substrats :	175
	Disposition des échantillons	175
	Protocole ELISA.....	175

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des abréviations.....	xvii
Table 2: Cell adhesion proportions \pm Standard Error of the Mean (SE) on PET textile and PET control film structures, and cell proliferation proportion (\pm SE) according to adhesion results.....	54
Table 3: PLLA nanofibre GPC results.....	104
Table 4: PLLA nanofibre DSC results (average \pm SEM).....	105
Table 5: PLLA nanofibre DMA results (average \pm SEM).....	106

Liste des figures

Figure 1 : Les éléments figurés du sang. De gauche à droite, hématie (globule rouge), plaquette et leucocyte (globule blanc) [3].....	3
Figure 2 : Cascade de thrombose[4]	4
Figure 3 : Cœur, faces antérieures et postérieures [5]	5
Figure 4 : Système cardiovasculaire [6]	6
Figure 5 : Structure d'une artère et d'une veine [8]	7
Figure 6 : Comme Janus le dieu romain, la cellule endothéliale présente deux faces, l'une en faveur de l'homéostasie, l'autre impliquée dans les processus pathologiques. (D'après Libby, 1987).....	9
Figure 7 : Fonction vasculaire des cellules endothéliales[9]	13
Figure 8 : Évolution de l'athérosclérose[28]	19
Figure 9 : Réaction inflammatoire face à un corps étranger[41]	23
Figure 10 : Hyperplasie intimale sur six prothèses différentes[47]	25
Figure 11: Scanning Electronic Microscopy images (SEM), showing the four textile structures (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). The lines at the bottom of the images correspond to 100 µm for 100X magnification.	53
Figure 12: Tapping mode AFM images (500 x 500 nm) of the PET film surface (A) and the PET fiber surface (B).	54
Figure 13: Proportion of endothelial cells on PET textile structures (BK = Biomateriali Knitted/velour, BW = Biomateriali Woven/velour, CK = Cardial Knitted, CW = Cardial Woven) and PET control film structure, ± Standard Error of the Mean (SE).....	55
Figure 14: Fluorescence micrographs of the PET flat film samples after 1 h of adhesion (A) Endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI showed a typical behaviour after 1 h of adhesion, with cobblestone organization and spindle shape. After 2 days of proliferation: (B) Endothelial cells were organized in a cord-like structure, precursor of angiogenesis. The lack of 3D matrix led to the collapse of the capillary.	56
Figure 15: Fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 1 h of adhesion (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). Seeded with the same number of cells than with the film, the textile structures presented a lower local density due to their higher specific surface.....	57
Figure 16: Fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 5 days of proliferation (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). The black yarns on each of the textile structures clearly show the limited number of endothelial cells after 5 days of proliferation.....	58
Figure 17: Details of fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 5 days of proliferation on the Biomateriali Woven/velour sample. Slide 7A shows a representative plain woven section of the prosthesis, where few cells have proliferated. Slide 7B shows a	

representative velour section where endothelial cells have proliferated only along the fibers, with very few connections between fibers.....	59
Figure 18: Details of fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 15 days of proliferation on the Biomateriali Woven/velour sample.	59
Figure 19: Schematical overview of the air spinning system. (1) Sample holder (horizontal movement), (2) PLLA fibre air spinning cone, (3) Vertical shifting, (4) Atomizer feed with compressed air and PLLA solution, (5) PLLA injection pump (syringe pump), (6) Compressed air vane and manometer, and (7) Compressed air tank.	72
Figure 20: SEM images of PLLA fibres at various experimental air spinning parameters: 0.5 x 10 ⁵ Pa and 10 mL/h for 4% PLLA (A) and 7% PLLA (B), 1.5 x 10 ⁵ Pa and 30 mL/h for 4% PLLA (C) and 7% PLLA (D), 2.5 x 10 ⁵ Pa and 50 mL/h for 4% PLLA (E) and 7% PLLA (F).	76
Figure 21: Effect of air spinning pressure and polymer flow rate on the number of PLLA fibre ruptures (average ± SD) for 4% and 7% w/v polymer concentrations.....	77
Figure 22: SEM micrographs (2000X) of CK textile samples without PLLA fibres (A), and covered with PLLA fibres (B) obtained from a 7% PLLA solution sprayed at a flow rate of 10 mL/h and a pressure of 0.5 x 10 ⁵ Pa.	78
Figure 23: AFM tapping mode images (2 µm x 2 µm) of a PLLA fibre obtained by air spinning, topography data (A) and amplitude data (B).	78
Figure 24: FTIR spectrum of PLLA fibres, without aging, after 5 and 20 days under water.	79
Figure 25: Endothelial cell adhesion and proliferation data on PET (control PET film), CK (Cardial knitted), and CK/PLLA (Cardial Knitted with sprayed PLLA fibres)	81
Figure 26: SEM micrographs (600X) of BAECs fixed on samples after 1 hour of adhesion. From top to bottom: (1) Polyethylene terephthalate film, (2) Cardial Knitted textile prosthesis, and (3) Cardial Knitted coated with PLLA nanofibres.....	81
Figure 27: Fluorescence microscopy of endothelial cells labelled with DAPI (nuclei in blue) and rhodamine-phalloidin (actin filaments in red) after 48 h of proliferation (600X). (1) BAECs showing a typical cobblestone shape and cord-like structure on the polyethylene terephthalate film. (2) BAECs proliferating along fibres on the raw Cardial Knitted textile with no monolayer formation. (3) On Cardial Knitted textile sample coated with PLLA nanofibres, BAECs began to proliferate in a neoendothelium-like shape; green highlights the PLLA fibres and the PET textiles fibres (upper right).	82
Figure 28: Schematical overview of the air spinning system. (1) Prosthesis holder (vertical motion); (2) PLLA fibre pulverization cone; (3) Vascular prosthesis inside the depression chamber; (4) Atomizer feed with compressed air and PLLA solution; (5) PLLA injection pump (syringe pump); (6) Compressed air valve and manometer; (7) Compressed air tank; (8) Depression system.....	95
Figure 29: Schematical overview of the peeling test. (A) 1- pneumatic grips, 2- tape band, 3- sample, 4- aluminum stub) and an example of tearing force curve; (B) Indication where data were collected (red rectangle).	102
Figure 30: SEM image of CK vascular prosthesis covered with air-spun PLLA nanofibres obtained with a 4% PLLA solution.....	103
Figure 31: TEM images. (A) Air-spun PLLA nanofibres obtained with a 4% PLLA solution and (B) Air-spun PLLA nanofibres obtained with a 7% PLLA solution.	104

Figure 32: Contact angles for air- and N ₂ APDBD-treated PET films and aging of contact angle as a function of time.....	107
Figure 33: N/C and O/C ratios of a PET film and a textile surface following air APDBD treatment, and aging of these ratios as a function of time.	108
Figure 34: N/C and O/C ratios of PET film and textile surface after Nitrogen APDBD treatment, and aging of these ratios in function of time.	109
Figure 35: AFM tapping mode images (500 nm x 500 nm, 3D topography data). (A) Virgin PET film; (B) Air APDBD-treated PET film; (C) N ₂ APDBD-treated PET film	109
Figure 36: Average tearing force (\pm SEM) measured to remove PLLA nanofibres from the PET substrates with or without plasma treatment. (* = $p < .001$)	110
Figure 37 : Schéma de montage des échantillons sur les portes-échantillons en PTFE (1- mise en place de l'échantillon sur la tige de PTFE, 2- sertissage avec la bague en PTFE, 3- schéma d'un échantillon monté sur son support, 4- photographie d'un échantillon monté)	151
Figure 38 : Rotation orbitale d'un pétri de culture et mesure de vélocité par échographie Doppler	152
Figure 39 : Système de culture dynamique par rotation disque-plan. (1- Incubateur 100% humidité, 5%CO ₂ à 37°C, 2- Support réglable, 3- Partie commande et actionneur, 4- Tige et disque en acier 316L, 5- Boite de pétri avec couvercle perforé, 6- Milieu de culture, 7- échantillon, 8- Porte-échantillon, 9- Plaque de maintien des échantillons)	154
Figure 40 : Montage avec jauges de contrainte pour mesure de cisaillement réelle. (1- Support réglable, 2- Partie commande et actionneur, 3- Tige et disque en acier 316L, 4- Échantillon, 5- Milieu liquide, 6- Lame métallique avec jauges de déformation).	155
Figure 41 : Représentation tridimensionnelle des facteurs CD142 (A) [239] et CD54 (B) [240].....	156
Figure 42 : Histogramme de l'expression (moyenne \pm SEM, n=12) en émission de fluorescence des facteurs CD142 et CD54, relativisé au nombre de cellules estimées par échantillon (sta= 48h en condition statique, dyn= 48h en condition statique + 6h dynamique) (Film de PET, Tricot de PET et Tricot de PET recouvert de nanofibres de PLLA pour PET, CK et CK PLLA respectivement). *= $p < 0,01$ et **= $p < 0,001$	157
Figure 43 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les petits angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA produits à partir de solution à 4% (courbe noire et rouge) et à 7% (courbe jaune et verte). Nota : Le pic commun aux quatre courbes autour de 800 Å est un artefact de l'appareil de mesure.....	161
Figure 44 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les grands angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA produits à partir de solution à 4% (courbes noire et rouge) et à 7% (courbes jaune et verte).	162
Figure 45 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les petits angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA soumis à un fluage jusqu'à rupture et produits à partir de solution à 4% (mesure sans déformation courbe noire et mesure à la striction courbe rouge) et à 7% ((mesure sans déformation courbe jaune et mesure à la striction courbe verte). Nota : Le pic commun aux deux courbes autour de 800 Å est un artefact de l'appareil de mesure.	163
Figure 46 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les grands angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA soumis à un fluage jusqu'à rupture et produits à partir de solution à 4% (mesure sans déformation courbe noire et mesure à la striction	

courbe rouge) et à 7% ((mesure sans déformation courbe jaune et mesure à la striction courbe verte).	164
Figure 47 : (1) Cellule exprimant le facteur CD54, (2) liage d'un anticorps primaire extrait du mouton au CD142, (3) liage d'un anticorps anti mouton sur les anticorps anti-CD54, greffés avec une enzyme, (4) conversion du substrat par l'enzyme sous forme fluorescente	166
Figure 48 : Schématisation du protocole de culture cellulaire.....	171

Liste des abréviations

Tableau 1 : Liste des abréviations

Abréviation	Nom complet
AFM	Microscopie à force atomique
APGD	Atmospheric Pressure Glow Discharge
BAEC	Cellules endothéliales aortiques bovines
BSA	Bovine Serum Albumin
CBR-RGD	Cellulose binding domain RGD-containing protein
CE	Cellule endothéliale
CEC	Cellules endothéliales circulantes
CK	Cardial Knitted (Textile tricoté en PET fourni par Cardial)
CK PLLA	Cardial Knitted recouvert de nanofibres de PLLA
CPU	Polyuréthane compliant
Dako	Fluorescent mounting medium
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMA	Analyseur Mécanique Dynamique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DSC	Calorimétrie à balayage différentiel
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPC	Cellules endothéliales progénitrices
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FS	Formaldehyde solution
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
HMWK	Kininogen à haut poids moléculaire
HPC	Cellules hématopoïétiques progénitrices
HSC	Cellules hématopoïétiques souches
HUVEC	Cellules endothéliales humaines de cordon ombilical
JNK	Jun Kinase
MAPC	Cellules souches progénitrices adultes
LMWOM	Low Molecular Weight Oxidized Materials
MCP-1	Chemoattractant protein-1
MEB	Microscopie électronique à balayage
NO	Nitric Oxide
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphorylcholine
PCL	Poly capro lactone
PCLA	Poly ϵ -caprolactone-co-L-lactide
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLA	Poly-L-lactique acid
PDLLA	Poly-D-L-lactique acid
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	Poly Éthylène Glycol
PET	Polyéthylène téréphtalate ou Dacron™
PFSP	Polymère peptidique fluorosurfactant
PGA	Poly glycol Acid
PLA	Acide polylactique

Abréviation (suite)	Nom complet (suite)
PLLA	Acide poly-L-lactique
POSS-PCU	Polyhedral oligomeric silsesquioxane-poly(carbonate-urea)uréthane
PTFE	Polytetrafluoroethylene ou Teflon™
ePTFE	Polytetrafluoroéthylène expansé
PU	Polyuréthane
Resazurin	Resazurin sodium salt
RGD	Acide Arginine-Glycine-Aspartic
Rhodamin-Phalloidin	Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
SA	Sodium Azide
SAXS	Small Angle X-Ray Spectrometry
SEM	Standard Error to the Mean (Erreur standard à la moyenne)
TCPS	Tissue culture polystyrene
TF	Tissue Factor
TPS	Tripan Blue staining
Triton	Triton-X-100
Trypsin	Trypsin-EDTA
TXNIP	Protéine thioredoxininteracting
UV	Ultra violet
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VD	Variables dépendantes
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VI	Variables indépendantes
vWF	Von Willebrand Factor
WAXS	Wide Angle X-Ray Spectrometry
XPS	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X
ZO	Zona occluden

1. Introduction

Face au vieillissement de la population et à l'explosion des risques associés aux maladies cardiovasculaires (sédentarité, obésité, diabète, hypertension, hypercholestérolémie, etc.)[1], la communauté médicale rencontre de plus en plus de patients nécessitant le remplacement d'artères pathologiquement atteintes. Compte tenu du nombre limité de substituts autologues, le besoin de substituts synthétiques devient criant, particulièrement pour les petits diamètres. Or, c'est justement pour ces diamètres que les prothèses vasculaires connaissent les plus hauts taux d'échec. Les stratégies d'amélioration des prothèses vasculaires visent donc à répondre à un réel besoin.

Ce travail de doctorat a ainsi pour objectif d'améliorer ces prothèses textiles en polyéthylène téréphtalate (PET) de façon à les rendre plus résistantes à la thrombose et à la sténose (les deux principales causes d'échec) en permettant l'amélioration de leur néoendothélialisation. La néoendothélialisation est la colonisation de la face interne de la prothèse par la couche de cellules endothéliales qui tapisse normalement les vaisseaux sanguins. Ce faisant, l'aboutissement de ce projet permettrait à long terme de produire des prothèses textiles de plus petit diamètre, pour répondre à une très forte attente du marché.

Cette introduction porte dans un premier temps sur la mise en situation du sujet, en décrivant brièvement l'anatomie du système vasculaire et les maladies nécessitant un recours aux implantations. Les résultats cliniques contemporains sont rappelés, ainsi que les principales raisons des échecs survenant suite à l'implantation des prothèses. Un état de l'art permet de considérer les stratégies d'optimisation des prothèses vasculaires dans le monde de la recherche. La problématique ainsi mise en évidence, les objectifs du sujet sont définis, ainsi que la stratégie d'approche du sujet.

L'article 1 décrit les travaux préliminaires concernant l'étude du comportement des cellules endothéliales sur des matrices textiles sans induction. L'article 2 vise à expliquer et à caractériser le procédé d'étirage par jet d'air d'acide poly(L-lactique) (PLLA) et démontre la capacité de ces nanofibres à soutenir un développement en monocouche des cellules endothéliales, à la manière de l'endothélium naturel. L'article 3 expose les travaux

effectués dans le but de caractériser de manière physico-chimique les nanofibres de PLLA, ainsi que ceux portant sur l'optimisation de l'adhérence des fibres de PLLA sur le PET.

La discussion générale (chapitre 5) est une réflexion portant sur l'ensemble des travaux ainsi que sur les perspectives. Enfin, l'appendice 1 permet d'approfondir les travaux non publiés qui traitent des essais de culture de cellules endothéliales en conditions dynamiques dans le but de tester leur réponse athérosclérotique, ainsi que de l'étude de la cristallinité des nanofibres par spectroscopie à rayons X. Les techniques d'analyse sélectionnées pour ces travaux sont brièvement détaillées en appendice 2 et les protocoles établis sont donnés dans l'appendice 3.

1.1. Mise en contexte

1.1.1. Système vasculaire[2]

1.1.1.1. Le sang

Le sang est le seul tissu liquide de l'organisme. Il est composé des éléments figurés (voir Figure 1) et du plasma. Visqueux et légèrement alcalin, il représente environ huit pour cent du poids corporel, avec un volume d'environ cinq litres pour un individu sain. Il assure l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus, ainsi que l'élimination des déchets du métabolisme et la distribution des hormones. Il contribue au maintien de la température corporelle, du pH et d'un volume liquidien adéquat. Les autres fonctions du sang sont l'hémostase et la prévention des infections (voir section ci-après).

Les éléments figurés du sang sont les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. Ils représentent 45% du volume sanguin. Les *érythrocytes* (plus connus sous le nom de globules rouges, ou encore hématies) sont de petites cellules biconcaves renfermant de grandes quantités d'hémoglobine, présentes en grand nombre dans le sang ($4 \text{ à } 6 \times 10^{12}$ par litre de sang). Ils sont dépourvus de noyau et grâce à la spectrine qu'ils contiennent, ils peuvent se déformer pour passer dans les capillaires. Ils servent au transport de l'oxygène. Les *leucocytes* (ou globules blancs) sont quant à eux tous nucléés et jouent un rôle capital dans la lutte de l'organisme contre les maladies. Leur concentration est 800 fois plus faible

de celles des érythrocytes, avec 4 à 11 x 10⁹ par litre de sang. Les *plaquettes* (250 à 500 x 10⁹ par litre de sang) sont des fragments détachés des mégacaryocytes, de grandes cellules formées dans la moelle rouge. Lorsqu'un vaisseau se rompt, les plaquettes forment un bouchon (clou plaquettaire) qui empêche l'effusion de sang. Leur rôle est essentiel à la coagulation.

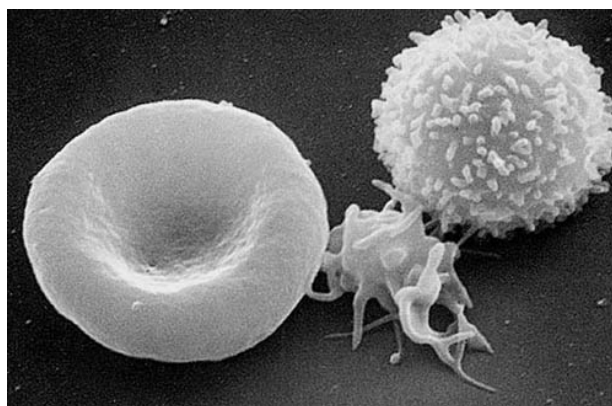


Figure 1 : Les éléments figurés du sang. De gauche à droite, hématie (globule rouge), plaquette et leucocyte (globule blanc) [3]

Le plasma est un liquide visqueux jaunâtre, composé à 90% d'eau et à 10% de soluté, tels des nutriments, des gaz respiratoires, des sels, des hormones et des protéines. Le plasma représente 55% du volume sanguin. Les protéines plasmatiques sont pour la plupart élaborées par le foie et comprennent l'albumine, les globulines et les facteurs de coagulation. L'albumine est un important tampon du sang et contribue à sa pression osmotique.

1.1.1.2. L'hémostase

Brièvement, l'hémostase est la prévention et l'arrêt des hémorragies. Elle est le fruit de l'interaction de trois processus : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse. L'hémostase primaire se déclenche lors de la formation d'une brèche vasculaire. Dans un premier temps, la brèche est réduite par une vasoconstriction locale. Ensuite, le sang entre en contact avec le collagène des vaisseaux sanguins, provoquant la formation du clou plaquettaire. Les plaquettes sont stimulées par deux phénomènes : (i) la

fréquence des collisions les unes aux autres liées à la rhéologie sanguine et (ii) la modification de conformation du facteur Von Willebrand (vWF) s'activant au contact du collagène et qui se lie alors aux plaquettes initiant leur changement de forme. Une fois activées, les plaquettes externalisent des récepteurs au fibrinogène, provoquant alors l'agrégation plaquettaire. Le fibrinogène jusque-là soluble est la cible de la thrombine, qui le transforme en fibrine, insoluble dans le sang. De son côté, la coagulation plasmatique cherche également à prévenir l'hémorragie et déclenche la formation de thrombus. En produisant du facteur tissulaire (*tissue factor*, TF), les cellules endothéliales activent la voie extrinsèque de la cascade de la thrombose. En effet, le TF se lie avec le FVIIa présent dans le sang et s'active par le collagène dénudé de la brèche, pour former un complexe TF-FVIIa activant alors FX et FIX. FXa et FVa se complexent alors pour déclencher la prothrombinase (PT) qui transforme la prothrombine en thrombine. La voie intrinsèque va quant à elle viser une succession d'activation en partant du FXI, jusqu'à celle du FVIII et de la thrombine. Celle-ci va alors activer un grand nombre de facteurs et cliver le fibrinogène en monomères solubles, qui vont se réticuler les uns aux autres sous l'action du FXIIIa (activé par la thrombine)[4]. La fibrinolyse quant à elle va tenter de maintenir la perméabilité du vaisseau en activant la lyse de la fibrine par divers processus visant à la production de plasmine, enzyme qui dégrade la fibrine.

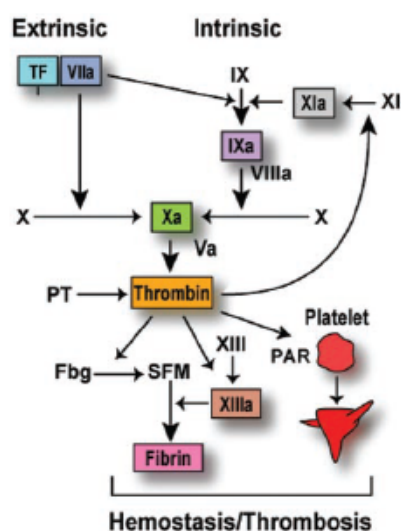


Figure 2 : Cascade de thrombose[4]

1.1.1.3. Le cœur

Le cœur est la pompe qui permet au sang de circuler dans les vaisseaux sanguins (voir Figure 3). Le cœur se compose de deux oreillettes dans sa partie supérieure et deux ventricules dans sa partie inférieure. Le cœur droit est la pompe de la circulation pulmonaire, destinée aux échanges gazeux. Le cœur gauche est la pompe de la circulation systémique. Le sang riche en oxygène provenant des poumons entre dans l'oreillette gauche, s'écoule dans le ventricule gauche et emprunte l'aorte, dont les ramifications le distribuent dans tout l'organisme. Les veines systémiques ramènent le sang pauvre en oxygène dans l'oreillette droite. Le débit cardiaque est typiquement de 5L/min. Il correspond à la quantité de sang éjectée par chaque ventricule en une minute. Le débit systolique est la quantité de sang expulsée dans un ventricule à chaque contraction.

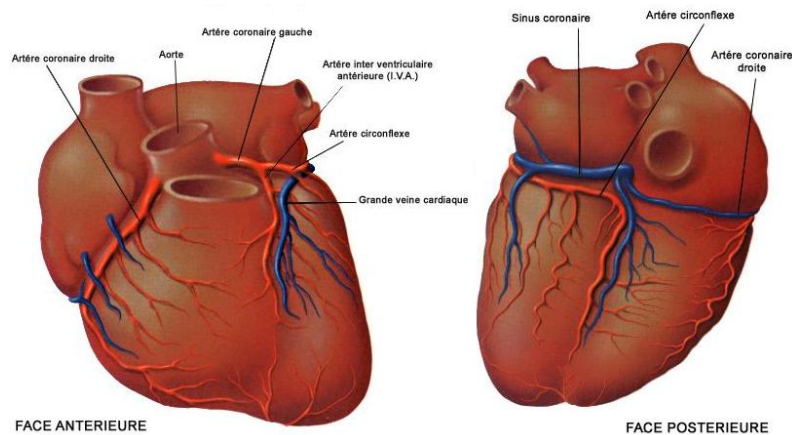


Figure 3 : Cœur, faces antérieures et postérieures [5]

1.1.1.4. Le système circulatoire

Le sang est transporté dans l'organisme par un réseau de vaisseaux sanguins. Les artères expédient le sang hors du cœur alors que les veines l'y ramènent (voir Figure 4). Les artères et les veines sont constituées de trois couches (voir Figure 5) : la tunique interne (intima, ou endothélium, voir section suivante), la tunique moyenne (média) et la tunique externe (adventice). Les artères élastiques sont les grosses artères près du cœur qui se dilatent et se resserrent suivant les variations du volume sanguin. Les artères musculaires apportent le sang aux divers organes et sont moins extensibles que les artères élastiques. Les artérioles régissent l'écoulement du sang dans les lits capillaires par le biais de la vasoconstriction.

Les capillaires quant à eux apportent le sang aux cellules et constituent le lieu d'échange. Les capillaires sont des vaisseaux microscopiques aux parois très minces. Leurs cellules sont séparées par des fentes qui facilitent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel. Une fois les capillaires franchis, le sang est collecté par le réseau veineux pour être acheminé jusqu'au cœur. La lumière des veines est plus grande que dans les artères et des valvules empêchent le reflux du sang. Le mouvement des muscles facilite le retour veineux.

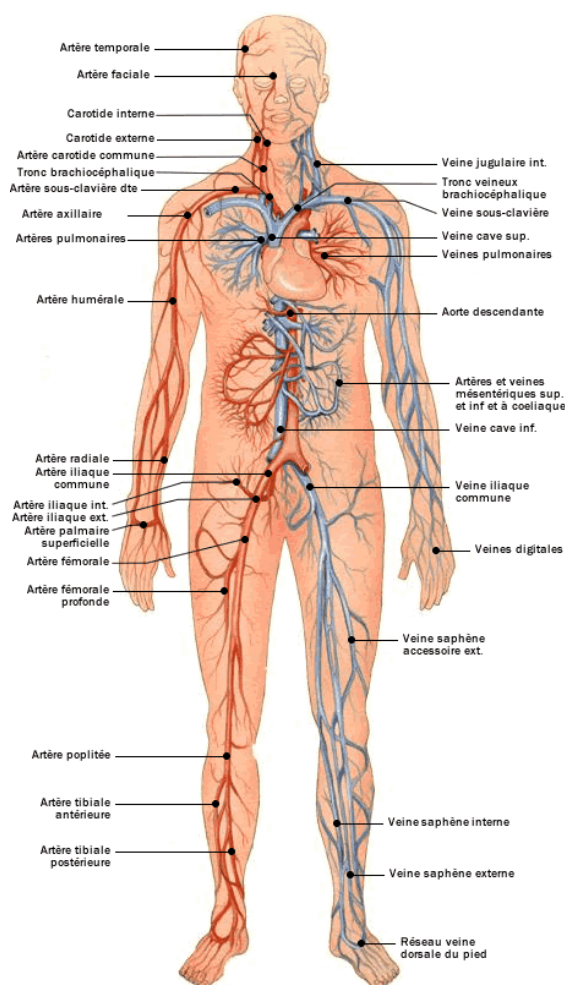


Figure 4 : Système cardiovasculaire [6]

Chez l'adulte, la pression artérielle systolique normale varie de 120 à 160 mmHg et elle atteint son maximum dans l'aorte. Le débit cardiaque, la résistance périphérique et le volume sanguin influent sur la pression artérielle. De manière générale, dans les portions droites des artères de moyen et grand diamètre (ex. artère carotide interne, aorte

abdominale), la circulation du sang est laminaire et parallèle à la paroi du vaisseau. Une impulsion de flux rapide à forte contrainte de cisaillement (1-7 Pa) est suivie d'une décélération pour atteindre un régime de cisaillement plus lent (0-1 Pa), maintenu pendant le reste du cycle cardiaque. Ce flux pulsé est caractéristique de la circulation artérielle et peut engendrer dans certains vaisseaux de brèves circulations rétrogrades. En comparaison, la circulation veineuse est beaucoup plus lente avec un faible contrainte de cisaillement associée (0,1-0,2 Pa). Aux intersections et aux incurvations du réseau, le flux devient turbulent. La détermination précise de ces flux reste aujourd'hui incomplète. Par exemple, la circulation du sang est particulièrement difficile à déterminer dans les artères coronaires de petits diamètres et en mouvement constant. De plus, de par sa composition particulière, le sang ne peut plus être considéré comme un liquide newtonien au niveau des capillaires.[7]

1.1.2. Endothélium

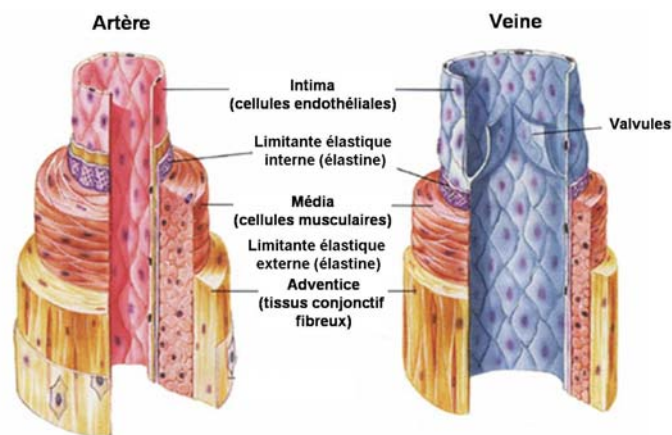


Figure 5 : Structure d'une artère et d'une veine [8]

Dérivé du mésoderme de l'embryon, l'endothélium est un tissu de type épithélial recouvrant la surface intimale des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales qui le composent forment une monocouche de cellules fortement liées entre elles et à la face basale du vaisseau (voir Figure 5).

Ces cellules endothéliales peuvent prendre différentes formes : (i) allongées en situation de haut débit, (ii) prismatiques face à des débits moyens et (iii) tubulaires dans le cas des

capillaires. L'endothélium forme une barrière semi-perméable entre la circulation et l'interstice environnant, dont la fonction principale est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il autorise l'échange des substances nutritives avec le milieu intérieur. L'endothélium contrôle la coagulation sanguine et participe au contrôle de la vasomotricité. Les cellules endothéliales sont donc des cellules réactives, évoluant dans un milieu hautement dynamique, dont le rôle est capital pour le bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, leur dérèglement peut conduire à l'apparition de maladies cardiovasculaires. Dans ces situations, les cellules endothéliales changent de comportement et deviennent actrices du processus dégénératif de la pathologie.

1.1.2.1. Origine

Les cellules endothéliales dérivent des cellules embryonnaires mésenchymateuses. La différenciation de la cellule mésodermique en une cellule endothéliale s'effectue en plusieurs étapes, avec une cellule intermédiaire appelée hémangioblaste, qui a encore la possibilité de se différencier en cellules endothéliales ou en cellules hématopoïétiques. Une meilleure compréhension de ces mécanismes a permis de mettre en évidence l'influence du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), des récepteurs de l'angiopoïétine et du facteur de transcription RunX1.[9]

1.1.2.2. Morphologie

Les cellules endothéliales qui composent l'endothélium sont plates et polarisées. Leurs faces apicales sont en contact avec la lumière du vaisseau et leurs faces basales sont fixées sur la lame basale du vaisseau (voir Figure 5). La lame basale est une structure collagénique synthétisée par l'endothélium qui lui apporte une certaine résistance mécanique. Les liaisons focales se font par le biais des intégrines liant le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ce faisant, l'endothélium est fixé solidement à la surface basale du vaisseau sanguin ce qui lui permet de résister à de fortes sollicitations mécaniques. Les cellules endothéliales sont serrées les unes aux autres, formant ainsi une barrière semi-perméable aux substances dissoutes de petite taille et à l'eau entre la circulation et l'interstice environnant.

1.1.2.3. Fonction

La fonction principale de l'endothélium est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins, tout en autorisant l'échange des substances nutritives avec le milieu intérieur. Ce filtre moléculaire est obtenu par la collaboration des cellules endothéliales et de la lame basale. De plus, l'endothélium contrôle la coagulation sanguine, en l'inhibant avec des cellules endothéliales et en la favorisant avec la lame basale. Une rupture de l'endothélium provoque la formation du clou plaquettaire; limitant les hémorragies (voir section hémostasie). Enfin, en répondant à diverses hormones, l'endothélium génère l'*endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) menant à la production d'oxyde nitrique (NO). Ceci provoque une relaxation de la couche musculaire vasculaire et une vasodilatation.

Si le rôle des cellules endothéliales est capital pour le bon fonctionnement de l'organisme, l'endothélium affecté par certaines maladies, peut promouvoir et amplifier l'état pathologique de l'artère. À l'image du dieu romain Janus (voir Figure 6), les deux faces de l'endothélium sont à prendre en considération dans toute approche visant à comprendre le fonctionnement de cet organe.[10]

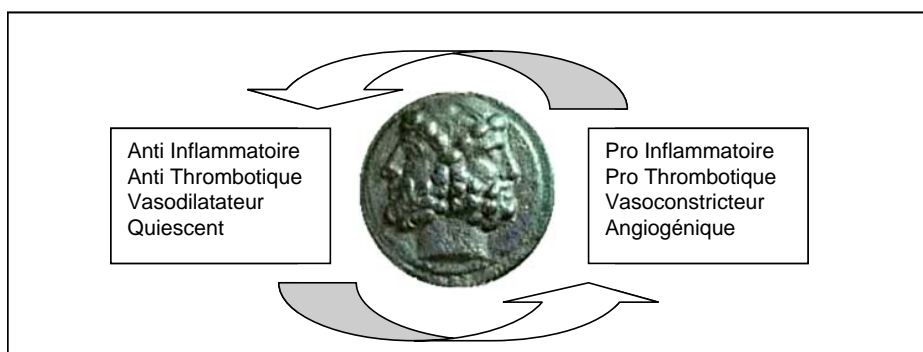


Figure 6 : Comme Janus le dieu romain, la cellule endothéliale présente deux faces, l'une en faveur de l'homéostasie, l'autre impliquée dans les processus pathologiques. (D'après Libby, 1987)

1.1.2.4. Angiogenèse

L'angiogenèse est le phénomène de création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau existant. L'acteur principal de l'angiogenèse est la cellule endothéliale. Plusieurs

facteurs angiogéniques ont été identifiés, dont certains sont pléiotropiques, c'est-à-dire qu'ils concernent plusieurs tissus et/ou plusieurs organes. L'angiogénine, *l'hepatocyte growth factor* (HGF), *l'Acidic and basic fibroblast growth factor* (FGF), l'interleukine (IL)-8, le VEGF, les angiopoïétines Ang-1 et Ang-2, font parti de ces facteurs. Malgré la forte sélectivité des angiopoïétines et des VEGF, ceux-ci sont largement exprimés dans tout l'endothélium, rendant ainsi difficile l'explication du grand nombre de phénotypes endothéliaux avec seulement ces facteurs universels. Ceci laisse supposer une action de plusieurs mécanismes, combinant les facteurs universels avec des signaux plus particuliers. Parmi ces signaux, l'EG-VEGF (peptide n'appartenant pas à la famille des VEGF) semble spécifiquement exprimé dans les glandes stéroïdiennes. Ceci pourrait être une nouvelle voie pour la régénération d'organes, en permettant l'angiogenèse spécifique pour l'organe visé.[11]

1.1.2.5. Cellules endothéliales circulantes

La présence de cellules endothéliales circulantes (CEC) dans le sang est connue depuis quelques années alors que la découverte de cellules endothéliales progénitrices (EPC) est plus récente. Les CEC proviendraient de l'endothélium même, par phénomène de délamination et sont identifiables avec les anticorps P1H12, ainsi que les facteurs von Willebrand (vWF), flk1, l'intrégrine $\alpha_v\beta_3$, la thrombomoduline, le VCAM-1, les E-selctine et l'ICAM-1. La présence d'un nombre élevé de CEC est souvent attribuée à des blessures vasculaires (maladie, inflammation, blessure par instrument, etc.). Leur nombre estimé avoisine les 2.6 cellules par mL avec un écart allant jusqu'à 5, pour des patients sains. Il a été démontré chez l'animal l'existence de variations de phénotype suivant la nature de l'organe où ont été prélevées les CEC.[12] Cela porte à croire que cette hétérogénéité pourrait être observée chez l'humain. L'étude approfondie des CEC ne peut donc être considérée qu'avec le développement de marqueurs spécifiques des tissus de prélèvement.[12]

1.1.2.6. Cellules endothéliales progénitrices

Le rôle biologique des cellules endothéliales progénitrices (EPC) n'est pas encore totalement clair chez l'humain, mais de plus en plus d'évidences tendent à démontrer que

ces cellules interviennent au niveau de l'endothélialisation de zones lésées de l'endothélium.[12] Ceci laisse entrevoir de futures applications dans l'endothélialisation des prothèses vasculaires. En effet, la mobilisation des CE et la néo angiogenèse sont accélérées grâce à la famille des VEGF qui se lie aux récepteurs VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 exprimés sur les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques. Les facteurs vasculaires angiogéniques recrutent les cellules hématopoïétiques souches (HSC) et progénitrices (HPC), ainsi que les cellules endothéliales progénitrices (EPC), facilitant ainsi l'initiation et le maintien des processus de néo angiogenèse postnatale et du modelage vasculaire des organes. Ainsi, au site de vascularisation, les cellules endothéliales proviennent soit des tissus adjacents, soit d'un recrutement provenant du flux circulatoire. Si le rôle des EPC au niveau du renouvellement des CE est longtemps demeuré imprécis,[13] il est désormais clair que les EPC migrent des tissus avoisinant pour se fixer au niveau des zones lésées de l'endothélium. Une fois en place, elles prolifèrent, se différencient, et s'intègrent à la barrière endothéliale. Elles peuvent aussi produire des facteurs vasculaires dans le but d'activer l'angiogenèse.[14] Sous le terme EPC se cache en réalité trois grandes familles de cellules. Les premières, détectées principalement par la conjonction de CD34+ et de VEGFR2, mais pas de CD45, CD14 ou CD115, sont appelées *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC). A ce jour, les ECFC sont les seules cellules qui correspondent totalement à la définition des EPC, à savoir ces cellules circulantes qui ont la capacité de produire des progéniteurs endothéliaux, montrant la capacité à produire des tubes endothéliaux in vitro et contribuant à la ré-endothélialisation et à la néovascularisation in vivo. Les deuxièmes, les *Circulating Angiogenic Cells* (CAC) sont dérivées de la lignée des macrophages monocytes. Bien qu'ayant un taux de prolifération plus faible, elles participent activement à l'homéostasie. Les troisièmes, les *Colony Forming Unit Endothelial Cells* (CFU-EC) sont composées de cellules hématopoïétique et leur nombre in vivo est un marqueur de maladies cardiovasculaires. [14]

Le rôle de ces EPC est donc pro-actif dans le phénomène de maintenance de la fonction endothéliale. Les facteurs de risques vasculaires, ainsi que l'inactivité physique ou encore la mauvaise alimentation sont autant de causes de réduction du nombre ou de la vitalité des EPC. Le déficit d'activité résultant handicape ainsi le processus de régénération de l'endothélium, induisant ainsi un déséquilibre pouvant conduire à des maladies

cardiovasculaires comme l'athérosclérose.[14] Les EPC peuvent donc être aussi exploitées afin de diagnostiquer précocement des dommages de l'endothélium. Utilisées en tant que biomarqueurs, les EPC pourraient même être stimulées pharmaco-chimiquement pour activer les défenses du corps humain face à une dégénérescence vasculaire. [15] Cependant, il est important de mieux identifier ces EPC et de comprendre en profondeur les mécanismes sous-jacents de leur rôle vasculo-protecteur.

1.1.2.7. Hétérogénéité des cellules endothéliales

Longtemps considéré comme un unique organe, l'endothélium présente de nombreuses variations de phénotypes suivant la localisation de celui-ci et le type d'organe desservi.[16] Dans le rein, la lame basale est fenêtrée et comporte des trous qui lui donnent une fonction de filtre moléculaire. Dans le système nerveux, au contraire, les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées empêchant les molécules de passer entre les cellules. L'endothélium est ici responsable des fonctions spécifiques de la barrière hémato-encéphalique. Autre exemple, des cellules endothéliales provenant de la microvascularisation ont une intégrité de barrière dix fois plus élevée que celles provenant de la macrovascularisation.[17]

1.1.2.8. La barrière endothéliale physiologique

1.1.2.8.1. Anticoagulation

La surface luminale de l'endothélium est recouverte par un glycocalix, chargé négativement et composé de protéoglycanes et de glycoprotéines liées à la membrane.[17]

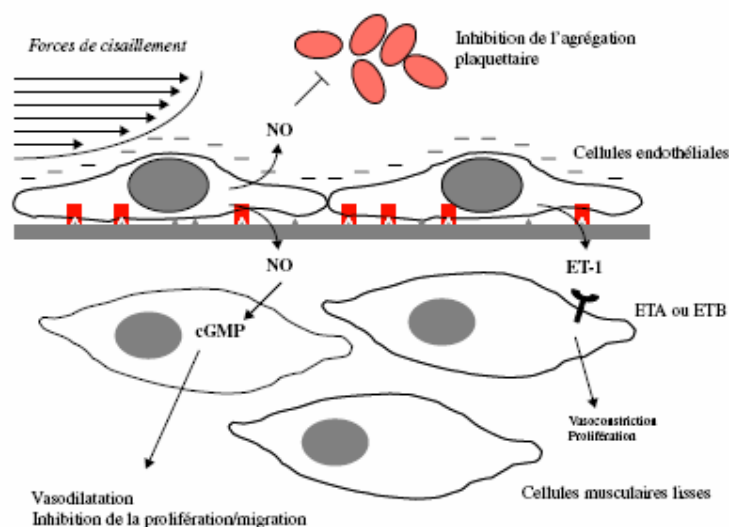


Figure 7 : Fonction vasculaire des cellules endothéliales[9]

Le glycocalix empêche l'adhésion plaquettaire par sa charge négative (voir Figure 7) et inhibe l'adhésion des cellules circulantes (monocytes et granulocytes) grâce à une forte concentration en héparane sulfate sous forme de protéoglycanes. Cet effet anticoagulant est dû à la charge globale de la molécule, mais aussi à la capacité de l'héparine à lier l'antithrombine. Cette dernière a en effet pour rôle de bloquer l'activité de la thrombine et d'autres facteurs impliqués dans la cascade de la coagulation.[9] En exprimant la thrombomoduline, les cellules endothéliales peuvent faire diffuser de faibles concentrations d'anticoagulant de la thrombine ainsi que des profibrinolytiques. Même s'il devait se créer un thrombus, un solide système de dégradation fibrinolytique associé aux cellules endothéliales saines se mettrait en place et dégraderait le thrombus.[10] Une autre fonction anticoagulante de l'endothélium est sa capacité à produire du NO, ainsi que des prostacyclines, deux molécules aux propriétés inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, dont la production, peut aussi être déclenchée par la présence de thrombine, dans un système anticoagulant autorégulé.[9]

1.1.2.8.2. Vasoconstriction et vasodilatation

Afin de provoquer la vasodilatation des cellules musculaires lisses, sous-jacentes à l'endothélium, les cellules endothéliales produisent du NO activant la guanylate cyclase pour produire de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), un messager secondaire

de la vasodilatation.[9] La prostacycline (ou prostaglandine I₂) est également un vasodilatateur connu. Elle est produite par les cellules endothéliales dans le but de contrer la constriction de la macrovascularisation notamment celle de la microvascularisation.[10] Les cellules endothéliales ont également une action contractile, voire proliférative, en synthétisant l'endothéline-1 vers la membrane basale.

Toutes ces actions vasomotrices sont stimulées et déclenchées principalement par les forces mécaniques auxquelles est soumis l'endothélium. Il est à noter que les cellules endothéliales provenant de zones de circulation élevée et unidirectionnelle présentent une expression faible du gène de l'endothéline-1 comparativement aux cellules provenant zones de flux bidirectionnels, régions d'ailleurs fortement prédisposées au développement de l'athérosclérose.[9] De plus, les cellules endothéliales ont la capacité de moduler le caractère des cellules musculaires lisses, soit différenciées à l'aspect allongé et au faible taux de prolifération ; soit dédifférencié à l'aspect rhomboïde et au fort taux de prolifération, typique des zones d'hyperplasie intimale. Ce phénomène semble être là encore dépendant du type de forces mécaniques.

1.1.2.8.3. Anti-inflammatoire

Les cellules endothéliales présentent des propriétés anti-inflammatoires sous des conditions particulières comme la contrainte d'un flux laminaire. Les leucocytes sanguins de toutes classes adhèrent difficilement aux cellules endothéliales soumises au flux laminaire.[10] Le NO limite également l'adhésion des leucocytes.

1.1.2.8.4. Intégrité de la barrière

Longtemps considéré comme un élément passif, l'endothélium est maintenant reconnu comme un organe dynamique et réactif à divers stimulus, dans le but de réguler son rôle de barrière. La perméabilité vasculaire est déterminée par le mouvement des solutés et des fluides entre le lumen et l'espace environnant. Il existe deux voies de régulation. La voie transcellulaire utilise une tyrosine kinase dépendante, gp60-mediated transcytotic albumine comme vecteur et qui ne semble pas avoir un rôle majeur dans le processus inflammatoire vasculaire. La voie paracellulaire est quant à elle reconnue comme le déterminant principal de la perméabilité vasculaire. Elle se caractérise par la formation de passage paracellulaire.

Les jonctions intercellulaires (serrées et adhérentes) se font par diverses protéines et par les filaments d'actine du cytosquelette. Elles participent à la stabilité mécanique et à la transduction des signaux extracellulaires. Les jonctions serrées sont des protéines transmembranaires (occludine, claudine, molécules d'adhérence de jonction -JAM- couplées à des protéines cytoplasmiques comme les zona occluden -ZO-). Les jonctions adhérentes sont composées de cadhérines qui lient les cellules adjacentes par des interactions homotypiques. Ces protéines s'attachent aux caténines (α, β, γ) s'attachant à leur tour à l'actine du cytosquelette. La régulation de ces ouvertures entre les cellules, est comparable à un équilibre entre les forces contractiles intracellulaires et les forces d'amarrage intercellulaire cellules-cellules et cellules-matrice. Au cœur de ces interactions, les microfilaments d'actine jouent un rôle fondamental. Ils font partie des trois principaux composants du cytosquelette de la cellule endothéliale avec les filaments intermédiaires et les microtubules. Le système des microfilaments d'actine a un rôle critique dans la régulation de la perméabilité et dans l'intégrité de la barrière endothéliale, tout en conservant une action majeure dans la contraction intracellulaire.[17]

1.1.2.8.5. Influence de la contrainte mécanique sur les cellules endothéliales

Deux forces mécaniques interviennent principalement dans la fonction de barrière de l'endothélium, à savoir la contrainte de cisaillement et l'étirement cyclique. La première est due au flux sanguin et la seconde est tributaire de la pulsation sanguine. Soumis à ces contraintes, le cytosquelette se réarrange rapidement et durablement.[7]

La contrainte de cisaillement peut influencer directement la fonction des protéines, les activités enzymatiques, ainsi que certaines transcriptions chez les cellules endothéliales cultivées en monocouche, influençant ainsi leurs phénotypes fonctionnels.[18-20] L'activation de diverses cascades de signaux et de facteurs de transcription a permis d'éclairer en partie les mécanismes cellulaires liant les stimuli de la contrainte de cisaillement et la régulation génétique. Il est maintenant admis que les cellules endothéliales ont non seulement la capacité de réagir aux forces mécaniques exercées par un fluide, mais aussi de discriminer celles-ci. Parmi ces forces, la pression, la déformation cyclique s'ajoute à la contrainte de cisaillement souvent évoquée. On peut considérer ces

forces comme des facteurs extrinsèques modifiant les fonctions endothéliales au sein de l'arbre vasculaire. Un des principaux modèles qui tente d'expliquer la sensibilité des cellules endothéliales aux stimuli mécaniques est le modèle de tensegrité, basé sur un concept d'équilibre de tension. Le cytosquelette de la cellule transmet les forces mécaniques par le biais de molécules transmembranaires (intégrines). Ces capteurs mécaniques permettent la transmission du stimulus au noyau ou à des protéines spécifiques qui s'activent après la modification physique de leur conformation.[7] Cependant, la présence de molécules qui agissent indépendamment du cytosquelette n'est pas à exclure et les phénomènes complexes de méchanotransduction des cellules endothéliales demeurent peu connus.[21]

Les pompes à ions sont suspectées d'être en partie responsable de ces phénomènes, après l'observation de dépolarisation rapide suite à des modifications de l'environnement mécanique. Certains récepteurs de croissance sont aussi capables de s'activer sans présence de leur contrepartie chimique. La caveolin-1, qui est la principale protéine structurante des caveolae, semble prévenir la phosphorylation de ERK-1/2, produit normalement par les cellules endothéliales sous flux dynamique. L'augmentation observée du nombre de caveolae sur la membrane de la cellule endothéliales sous flux semble soutenir l'idée que ces organelles aient un rôle de capteur mécanique et que la cellule endothéliale soit capable de répondre à un stimulus en augmentant sa sensibilité. L'héparane sulfate, PECAM-1 et les protéines G font partie des autres molécules candidates en tant que capteur de force.[7]

1.1.2.9. La barrière endothéliale lésée ou agressée

1.1.2.9.1. Coagulation, thrombose et inhibition de la fibrinolyse

Quand les cellules endothéliales sont soumises à des conditions stressantes, elles peuvent avoir un comportement qui promeut la coagulation, la thrombose et le maintien du thrombus formé. Les médiateurs générés durant la phase de thrombose peuvent à leur tour activer les cellules endothéliales ainsi que les cellules musculaires lisses, perpétuant le dérèglement. Les cellules endothéliales expriment des facteurs tissulaires quand elles sont en présence de cytokines pro-inflammatoires ou de sous-produits bactériens comme des

lipopolysaccharides. Ces facteurs se lient au facteur coagulant VIIa, qui déclenche la cascade de la thrombose.[22] Dans les situations athérosclérotiques, la cellule endothéliale altère ses fonctions anticoagulante, antithrombotique et profibrinogène. En effet, la surproduction de PAI-1 joue un rôle dans le dérèglement de l'activité fibrinolytique endothéliale. Le PA-1 est également surproduit par les cellules musculaires lisses dans les conditions athérosclérotiques. Il est à noter que les patients présentant du diabète, un syndrome métabolique, ou encore une obésité morbide ont un taux élevé de PA-1.[10]

1.1.2.9.2. Processus inflammatoire

En cas de situation inflammatoire, ou en présence de cytokines pro-inflammatoires, les cellules endothéliales expriment le VCAM-1, de la famille des immunoglobulines, qui semble être impliqué dans l'adhésion des leucocytes sur la surface endothéliale. Adhérents à la surface de l'endothélium, les leucocytes reçoivent des signaux chimiques afin de favoriser leur migration dans l'intima. Parmi les signaux identifiés, notons le macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) en lien avec le récepteur CCR-2, l'inteleukine-8, l'eotaxine et la factalkine. Une fois en place, les leucocytes sont activés grâce à d'autres cytokines. L'endothélium ne répond pas uniquement à ces stimuli pro-inflammatoires, mais en est également l'architecte en produisant de nombreux facteurs et cytokines. Ainsi, la cellule endothéliale montre clairement qu'elle possède un rôle majeur dans le processus de régulation inflammatoire local, grâce notamment à une position stratégique d'interface entre le sang et les tissus. Parmi les stimuli en phase liquide dans le sang, la thrombine et des lipoprotéines oxydées sont à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire.[10]

Le stress oxydatif, caractérisé par une surproduction d'espèces oxygénées très réactives, aggrave l'aspect inflammatoire de l'athérosclérose. En favorisant l'augmentation de l'activité de NAD(P)H oxydases, des médiatrices comme l'angiotensine II peuvent réguler la production d'espèces oxygénées réactives. Un flux laminaire peut faire décroître l'expression de protéine thioredoxininteracting (TXNIP), activant la thioredoxine, qui à son tour se lie au signal régulateur d'apoptose kinase-1 (ASK1), un stimulateur de Jun Kinase (JNK) et p38. Ultiment, ceci tend à limiter l'expression de VCAM-1 en réponse à des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, les flux perturbés ont tendance à modifier le comportement normal des cellules endothéliales, ce qui interromprait l'expression

endogène d'anti-oxydant, bloquant une des voies de régulation de l'expression de VCAM-1. Par ailleurs, les flux perturbés entraînent une production de pro-inflammatoire comme le NF-kB, un médiateur clé dans la transcription pro-inflammatoire, augmentant ainsi la production de VCAM-1.[10]

1.1.3. Athérosclérose

1.1.3.1. Quelques chiffres

Plus de 17 millions de personnes meurent chaque année des maladies cardiovasculaires dont les $\frac{3}{4}$ sont associées à l'athérosclérose. Ces dernières représentent une des principales causes de décès dans les pays industrialisés.[23] Les campagnes actuelles de prévention ciblent principalement la modification des habitudes de vie afin de réduire les comportements à risque. Le tabagisme, le stress, l'alcoolisme, la sédentarité et les mauvaises habitudes alimentaires, l'hypertension et le diabète sont les principaux facteurs de risque pouvant conduire à l'apparition d'une maladie athérosclérotique.[24] L'athérosclérose est souvent à l'origine d'infarctus, d'ischémie pouvant causer des amputations, des anévrismes, ou encore des embolies.[24] Par ailleurs, l'athérosclérose est un facteur de risque de l'apparition de déficits cognitifs voire de démence en amoindrissant la vitalité cognitive ainsi que la qualité de vie des personnes âgées.[25]

L'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement associé de la population, en corrélation avec de mauvaises habitudes de vie, font ainsi de l'athérosclérose un enjeu de santé publique majeur en particulier dans les pays industrialisés

1.1.3.2. Définition de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaire; le tout s'accompagnant de modifications de la média (Définition de l'OMS, 1958).

De façon générale, le terme "sclérose" désigne toute dégénérescence fibreuse d'un tissu ou d'un organe. Avec l'âge, les tissus qui constituent les artères perdent leur élasticité et deviennent plus rigides. Le vieillissement normal des artères se nomme *artériosclérose*. Il

s'agit d'un terme générique désignant l'épaississement de l'intima artérielle avec amincissement fibreux de la média. L'artériosclérose peut s'accompagner de dépôts lipidiques (cholestérol) sur la paroi interne des artères, ou plaques blanchâtres que l'on nomme athérome. Lorsque l'artériosclérose s'accompagne de plaques d'athérome, on parle alors d'athérosclérose.[26]

L'athérome est une lésion intimale. L'intima épaissie est le siège d'une nécrose comportant des cristaux d'acides gras et de cholestérol lancéolés (« bouillie athéromateuse »). Il s'y associe des cellules spumeuses et une prolifération de myofibroblastes (voir Figure 8). En évoluant, la lésion devient de moins en moins cellulaire, de plus en plus fibreuse et contient des calcifications et même des néovascularisations.[27]

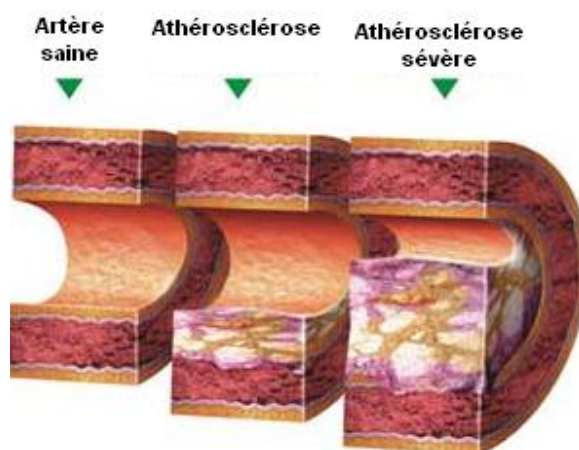


Figure 8 : Évolution de l'athérosclérose[28]

Face à un facteur de risque vasculaire (ex. : hypercholestérolémie), l'endothélium présente des signes de stress oxydatif. Cette modification entraîne une variation dans l'expression chimique de la cellule endothéliale, promouvant l'adhérence et l'infiltration des monocytes. Ceux-ci ingèrent rapidement les lipoprotéines oxydées ou les sous-produits de glycolisation accumulés dans l'espace intimal. Comme l'accumulation ne s'arrête pas, les monocytes se chargent en lipides, formant les stries lipidiques. Ainsi déformé, l'endothélium peut se rompre et ces micro-ulcérations sont le siège d'agrégation plaquettaire. Les plaquettes, les cellules endothéliales lésées et les macrophages libèrent alors de nombreux facteurs de croissance, stimulant les cellules musculaires lisses à migrer et à proliférer sur ces sites. Une capsule fibreuse se forme et l'accumulation de tous ces composants entraîne une

réaction inflammatoire. L'hyperactivité locale résultante conduit à l'hypoxie du centre de l'agglomérat, suivie d'une apoptose et d'une nécrose des tissus. Face à cette nécrose, les cellules avoisinantes produisent des facteurs de croissance tissulaire (TF) afin d'initier l'angiogenèse. La plaque athéromateuse grossit et se rompt en exposant son contenu nécrosé, déclenchant la cascade thrombotique et ainsi l'occlusion possible du vaisseau.[27]

1.1.3.3. Survenue de l'athérosclérose

La distribution non aléatoire des lésions athérosclérotique (principalement à proximité des embranchements et des zones de forte courbure) est intrigante. Ces zones sont toutes soumises à des contraintes de cisaillements moyennement basses. Cela dit elles connaissent de fortes oscillations, avec de forts gradients spatiaux et temporels indiquant que les flux laminaires réguliers, caractéristiques des zones plus protégées, favorisant l'expression « athéroprotective » des gènes des cellules endothéliales. Les contraintes de cisaillement variées des zones prolésionnelles, caractérisées par les flux turbulents, favoriseraient quant à elles l'expression des gènes athéropathogènes.

Si pendant longtemps l'athérosclérose a été considérée comme une cascade pathologique, il a toujours été présumé qu'une intervention pharmacologique efficace au niveau de cette cascade suffirait à entraîner un processus de guérison. Compte tenu du nombre impressionnant de molécules testées et des résultats cliniques mitigés obtenus à ce jour, cette vision de l'athérosclérose s'avère trop limitée. Le rôle des cellules souches et progénitrices dans le processus de guérison apparaît aujourd'hui comme de plus en plus crucial. Et si l'athérosclérose peut être vue comme un échec du processus de guérison endogène, il est important de considérer la disponibilité et la fonction de ces cellules progénitrices.[29]

1.2. Problématique : inadaptation des substituts

vasculaires synthétiques

1.2.1. Constat clinique

L'utilisation des vaisseaux autologues est privilégiée pour des raisons de fiabilité et de biocompatibilité[30] pour le remplacement de vaisseaux atteints d'athérosclérose. Cependant, ces vaisseaux (veine saphène, artère mammaire interne[31]) peuvent être endommagés en raison de la maladie[32] ou être déjà utilisés lors de précédentes opérations chirurgicales. C'est en considérant donc toutes ces données que l'on comprend le besoin énorme d'une alternative fiable pour un substitut vasculaire.

À l'heure actuelle, les prothèses vasculaires synthétiques à base textile en polyéthylène téréphtalate (PET, ou Dacron™) et celles en polytétrafluoroéthylène (PTFE ou Teflon™) constituent les matériaux de prédilection des chirurgiens vasculaires lors du remplacement d'artères pathologiques. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour améliorer ces substituts vasculaires. Les prothèses vasculaires en PET introduites en 1952[33] ont fait l'objet de nombreuses améliorations de leur structure textile, des tissés aux tricots, avec ou sans effet velours. Divers revêtements ont été testés, comme le recouvrement d'argent pour tenter de minimiser le risque d'infection ou le dépôt de carbone pour améliorer l'hémocompatibilité. L'imprégnation protéinique a permis d'éviter la précoagulation sans toutefois améliorer la cicatrisation des prothèses en PET. Enfin, des traitements à l'héparine montrent des résultats encourageant en termes de réduction de la thrombogénicité. Les prothèses en textile de PTFE (1963) ont très vite été remplacées par celles en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE), avec ou sans enrubannage externe en PTFE. Des revêtements carbonés ont aussi été testés pour améliorer l'hémocompatibilité. [34]

Malheureusement, ces prothèses connaissent de faibles taux de réussite lorsqu'il s'agit de remplacer des artères de petits calibres c'est-à-dire inférieurs à six millimètres.[35, 36] En effet, l'incompatibilité mécanique entre la matière synthétique et le segment d'artère sur lequel est greffée la prothèse,[37] la thrombose rapide de la lumière prothétique[22] ainsi

que l'hyperplasie intinale[38] expliqueraient ce faible taux de réussite. Afin de résoudre ces problèmes, il faut se pencher un instant sur les mécanismes de ces réactions.

1.2.2. Causes d'échec d'implantation

1.2.2.1.Réaction inflammatoire

1.2.2.1.1. Réaction inflammatoire normale

Face à une blessure vasculaire, l'homéostasie est perturbée. Pour être rétabli, le corps déclenche le processus inflammatoire qui vise à la cicatrisation de la blessure : c'est l'hémostase. Celle-ci est envahie par le sang et il se forme un caillot de fibrine qui favorise l'adhérence et l'agrégation plaquettaire. D'un point de vue cicatriciel, cette couche de protéine peut être considérée comme une réserve de matrice. Suite à la modification de l'homéostasie, le corps libère des cytokines et des facteurs de croissance qui recrutent des cellules sanguines, principalement des neutrophiles. Des monocytes migrent vers la blessure et se différencient en macrophage. À ce stade, les macrophages se chargent du nettoyage de la plaie et recrutent des cellules comme les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ces cellules se chargent alors de transformer le caillot de protéine en bourgeon charnu, possédant une forte néovascularisation, capitale pour une bonne cicatrisation. Ce bourgeon charnu est progressivement remplacé par la matrice extra cellulaire produite par les fibroblastes. La suite du processus dépend de la taille de la blessure, mais généralement si le tissu ne peut être reconstruit, il est remplacé par du tissu cicatriciel.[39]

1.2.2.1.2. Réaction inflammatoire face à un biomatériau

La réponse face à un biomatériau est très différente (voir Figure 9). En effet, le processus inflammatoire débute par la mise en présence du biomatériau avec le sang. L'interaction entre ces deux substances conduit au dépôt et à l'adsorption de protéines, principalement du fibrinogène[40] sur la surface du biomatériau, mais également toute une série de protéines non spécifiques. Cette adsorption non spécifique qui n'intervient pas dans le processus de cicatrisation normale. Trente minutes à deux jours après la mise en présence du biomatériau et des tissus biologiques, de nombreuses cellules adhèrent à la surface du biomatériau. Ceci

conduit à un dérèglement de la production de cytokines et fait suite à celui de processus inflammatoire. De plus, la taille de l'implant implique que le biomatériau est bien trop grand pour être phagocyté, entraînant la frustration des macrophages. Celle-ci induit alors la libération de nombreux médiateurs dans l'environnement aggravant ainsi la réponse immunitaire.

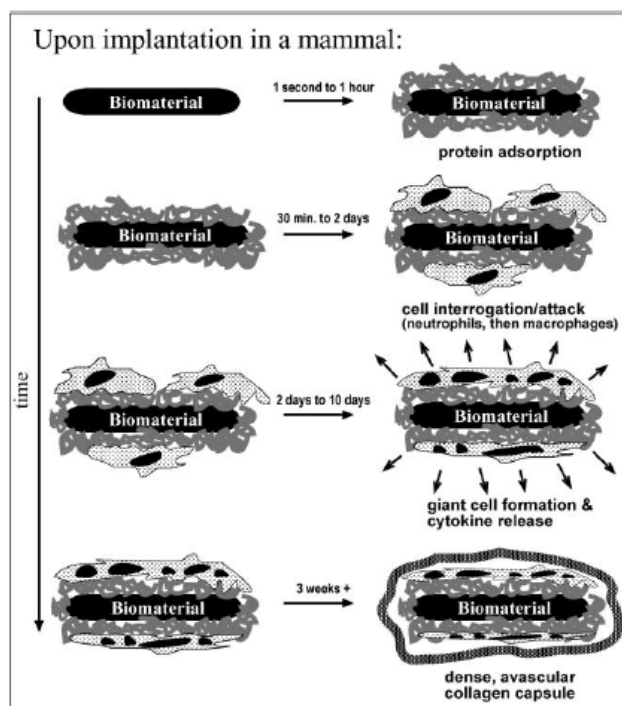


Figure 9 : Réaction inflammatoire face à un corps étranger[41]

L'inflammation devient alors chronique et les macrophages fusionnent pour former des cellules géantes multinucléées typiques de la réaction face à corps étranger. Le dernier stade du processus est complété par une encapsulation du biomatériau par du tissu avascularisé, fibreux, composé essentiellement de collagène, ayant une épaisseur de 50-200 μm . Cette inflammation chronique est à la source de nombreux rejets, car les cellules géantes multinucléées sont responsables de la biodégradation du biomatériau, sans pour autant prévenir le risque d'infection.[41]

1.2.2.2.Thrombose

La biocompatibilité d'un biomatériau destiné à être en contact avec le sang est directement associée avec la réponse thrombotique qu'ils engendrent. Le phénomène de thrombose est encore mal connu, et ce, malgré 50 années de recherche. L'impossibilité actuelle à produire des matériaux non thrombogéniques illustre clairement le manque de compréhension globale de processus de thrombose.

En effet, les matériaux employés pour les prothèses vasculaires synthétiques sont hautement thrombogéniques,[42] en particulier comme nous l'avons déjà mentionné lorsqu'il s'agit de petits diamètres de prothèses. Toutefois, si les grands diamètres de prothèse sont relativement fiables, cela ne veut pas dire que leurs surfaces sont moins thrombogéniques que celles des petits diamètres. C'est simplement que les hauts débits sanguins dispersent les facteurs de coagulation. La thrombose est avant tout un phénomène de cascade, impliquant des facteurs enzymatiques activant d'autres facteurs. La cascade est non linéaire;[22] elle comporte plusieurs boucles de rétro-action et débute par la production de facteur tissulaire (TF) (voir Figure 2). Le facteur déclencheur est la mise en présence du biomatériau avec le sang. Dans les secondes qui suivent, après le dépôt initial de fibrinogène[40, 43] sur le biomatériau, il y a substitution de celles-ci par de la Kininogen à haut poids moléculaire (HMWK) : il s'agit de l'effet Vroman.[44] À ce moment intervient la production de Facteur FXII, qui est suivi par une activation des plaquettes et ensuite des leucocytes. Les facteurs hémodynamiques peuvent aussi entrer en ligne de compte pour l'activation plaquettaire, avec la libération de *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) lorsqu'elles sont soumises à des contraintes de cisaillement. Ceci est souvent le cas à l'entrée des prothèses vasculaires, de par leur manque de compliance,[45] la forme des sutures ou l'inadaptation de la taille de la prothèse à celle de l'artère.[46]

Le processus ainsi enclenché conduit à la production d'un caillot, qui petit à petit vient boucher le vaisseau sanguin. Les risques sont l'ischémie des organes irrigués et le détachement de morceaux de caillot, pouvant provoquer de micro-embolies.

1.2.2.3. Hyperplasie intimale

L'hyperplasie intimale est une autre cause de re-sténose pour des substituts vasculaires.[38, 47] En effet, l'hyperplasie intimale normale est caractérisée histologiquement par des zones de prolifération du muscle lisse de la média. Cette prolifération peut provoquer une sténose. En alternant avec des zones où la média est amincie, la raréfaction des fibres élastiques aboutit parfois à la création de micro-anévrysmes.

Au niveau d'un biomatériau vasculaire, cette prolifération des cellules musculaires lisses se rencontre principalement au niveau de l'anastomose distale. Les perturbations hémodynamiques dues à l'incompatibilité biomécanique entre la prothèse synthétique et l'artère, font subir au sang des contraintes qui provoquent le déclenchement de l'activation plaquettaire.[48] Les plaquettes libèrent alors des facteurs de croissance comme le PDGF qui stimule les cellules musculaires lisses. Cette prolifération en superposition est clairement visible sur la Figure 10.

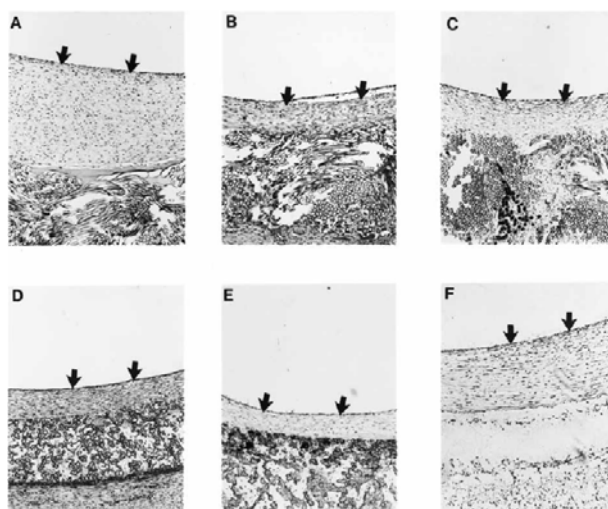


Figure 10 : Hyperplasie intimale sur six prothèses différentes[47]

1.2.2.4. Infection

Une infection est la pénétration dans l'organisme d'un agent étranger pathogène (bactérie, virus, champignon, parasite, levure, prion) capable de s'y multiplier. Les infections concernant les différents types de prothèses vasculaires diffèrent en suivant les taux

d'infection ainsi que leurs complications les plus typiques.[49] Plus de cinq pour cent des substituts artérioveineux s'infectent, nécessitant d'autres moyens d'accès pour permettre la continuité de l'hémodialyse. En ce qui concerne les fémoropoplités, c'est un taux de quatre pour cent d'infection, avec pour conséquence la perte possible d'un membre. Bien que les taux d'infection des prothèses aortiques soient plus faibles, entre deux et trois pour cent, les complications associées sont quant à elles mortelles dans quatre-vingt-dix pour cent des cas.[50]

1.2.2.5. Bris mécanique

Les conséquences d'une dégradation de la structure d'une prothèse vasculaire peuvent entraîner une dilatation de la prothèse, la formation d'un faux anévrisme, ou encore la rupture de celle-ci. La dilatation provoque une perturbation du flux hémodynamique, avec pour conséquence la formation possible de thrombus. Un faux anévrisme quant à lui, met en danger la vie du patient avec une ischémie possible des organes comprimés, le risque de rupture et d'hémorragie. La rupture d'une prothèse entraîne souvent la mort pour le patient. Les causes de rupture mécanique d'une prothèse sont nombreuses. La conception de la prothèse peut être directement mise en cause,[51-54] avec par exemple une altération induite par le moyen de mise en forme.[52, 53] Les techniques d'implantation peuvent aussi être mises en cause (clampage, suture) tout comme les dégradations physico-chimiques (réaction de biodégradation).

Les taux de ces dégradations sont difficiles à évaluer, car il existe réellement une absence de suivi à long terme des patients. De plus, la communauté médicale entretient une peur souvent justifiée des poursuites judiciaires,[55] et communique peu ou pas les cas d'explantation de prothèses défectueuses ayant été retirées du marché. Enfin, le manque d'autopsie pour déterminer les causes exactes d'un décès contribue à la sous-évaluation des cas de ruptures des prothèses vasculaires.

1.3. Optimisation des substituts vasculaires

Les cellules endothéliales peinent à coloniser les prothèses vasculaires après implantation chez l'homme et les prothèses textiles en PET ne font pas exception à cette observation

clinique.[34] Or, cette colonisation endothéliale, souvent appelée néoendothélialisation, permettrait certainement une amélioration importante du caractère hémocompatible des implants vasculaires synthétiques, diminuant de facto les risques liés aux re-sténoses d'origines thrombotiques ou engendrées par hyperplasie intimale. Cette absence de néoendothélialisation chez l'homme est encore mal expliquée. Plusieurs facteurs semblent s'opposer au processus de colonisation de la surface intimale de la prothèse artérielle par les cellules endothéliales du patient. Parmi ces facteurs, il est à noter l'âge et l'état de santé du patient, la différence de diamètre de lumière artérielle entre le substitut synthétique et l'artère native,[46] les imperfections géométriques perturbant l'écoulement des fluides,[38, 56-58] la chimie sanguine,[59] ou encore pour notre compréhension le manque de vraisemblance avec les modèles animaux.[46, 60]

D'après les informations citées dans les précédentes sections, voici certains des paramètres qui pourraient permettre d'atteindre le substitut artériel de petit calibre idéal[61] :

- Résistant à l'infection
- Biocompatible (non inflammatoire, non toxique, non carcinogène, non immunogénique) et stable après implantation
- Étanche et résistant à la thrombose, mais suffisamment poreux pour permettre la cicatrisation et l'angiogenèse. Cette fonction est habituellement remplie par l'endothélium
- Résistant mécaniquement tant du point de vue biologique (compliance, contrainte etc.) que clinique (suture, déformation etc.)
- Vaso-actif (contraction et dilatation en réponse à une stimulation nerveuse ou chimique)
- Fabricable à faible coût et en quantité suffisante

Afin de mieux comprendre le contexte de ce projet doctoral, la section suivante est destinée à faire un état des lieux des diverses stratégies mises en œuvre à ce jour pour améliorer ou

replacer les substituts vasculaires actuels et s'approcher des caractéristiques idéales précédemment décrites. Pour cela, nous approfondirons plus en détail l'influence de la structure sur les cellules endothéliales, les nouveaux matériaux, la chimie de surface ou encore les techniques hybridant le vivant et les biomatériaux.

1.3.1. Effet de la structure sur l'endothélialisation

Depuis la mise en marché des premières prothèses vasculaires il y a plus de cinquante ans, le facteur structurel est de première importance quant à la réussite d'une implantation. La porosité des premières prothèses textiles obligea les chirurgiens à effectuer une imprégnation avec du sang afin de réduire les risques de fuite après anastomoses,[62] et depuis, de nombreux procédés de production ont permis l'élaboration de prothèses aptes à satisfaire les besoins cliniques.[54] Aujourd'hui, pour mettre au point un matériau vasculaire, il est important de comprendre les interactions entre le substrat et les cellules.[63] Par exemple, la porosité d'un biomatériau doit permettre une bonne microvascularisation pour une meilleure intégration au sein des tissus avoisinants.[64] En effet, il a été montré que la taille des pores influe sur le comportement des cellules endothéliales.[65] Des tailles de pores ou d'obstacles trop élevés ($>175\mu\text{m}$) formeraient des géométries trop grandes à franchir pour les cellules, limitant ainsi l'endothélialisation.[66] Cependant, si les cellules endothéliales semblent sensibles préférentiellement à certaines tailles de pores, d'autres cellules intervenant dans le processus cicatriciel peuvent avoir d'autres affinités. Par exemple, la porosité influe sur l'agrégation plaquettaire de manière inversement proportionnelle.[67] Les processus d'infiltration lipidiques font également partie des phénomènes à prendre en compte, car ils modifient in vivo la porosité et peuvent altérer les caractéristiques mécaniques du matériau.[68] La rugosité même du matériau est un paramètre faisant varier l'adhérence ou la prolifération des cellules endothéliales, avec une préférence pour les surfaces plus lisses ($135\pm 17\text{nm Rms}$ vs $287\pm 34\text{nm}$ et $1557\pm 211\text{nm}$).[69] Mais les études in vitro concernant les structures sont à confirmer avec le vivant et plus particulièrement avec l'être humain. En effet, les résultats cliniques peuvent finalement contredire les meilleures performances testées sur animaux. Le PET textile par exemple, est un bon support au développement cellulaire endothélial que ce soit avec des cultures organotypiques,[70] ou bien des études in vivo chez l'animal.[71]

Cependant, ceci n'est pas corrélé avec les observations cliniques et la présence d'un néoendothélium se résume tout au mieux aux parties distales et proximales de la prothèse. L'âge et l'état de santé des sujets d'étude pourraient être des facteurs déterminants pour l'endothélialisation in vivo des prothèses.[60] L'approche de l'expérimentation animale est également biaisée par des facteurs comme la longueur de prothèse, la nature du flux hémodynamique ou encore le mécanisme d'endothélialisation (transanastomotique vs transmural), éloignant ce modèle de la réalité clinique chez l'humain.[46]

Il est évident qu'une fois implantées, les prothèses se trouvent dans un environnement hautement dynamique. Or, les phénomènes de mécano-transduction de la cellule endothéliale semblent peu compris,[21] et l'étude des facteurs hémodynamiques permettrait de mieux saisir ces interactions. Par exemple, la formation d'hyperplasie intimale semble fortement liée aux perturbations hémodynamiques.[37, 38] De plus, celles-ci pourraient jouer un rôle dans la différenciation entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales,[72] et sur le fonctionnement physiologique des cellules.[73] Ceci implique non seulement que la structure est à prendre en considération, mais aussi la géométrie des altérations engendrées par des chirurgies sur le réseau vasculaire, afin de minimiser les contraintes de cisaillement extrêmes (trop hautes ou trop basses). Le cosselage des prothèses textiles est par exemple à l'origine de perturbations hydrodynamiques,[56] tout comme la qualité des anastomoses réalisées par le chirurgien.[37]

De plus, Pratt et al.[74] ont montré que les cellules endothéliales sont affectées par le facteur temporel (temps d'incubation) ainsi qu'un facteur surface (recouvrement protéinique) et qu'une contrainte de cisaillement augmente l'adhérence des cellules. Gulbins et al.[75] ont confirmé l'importance du facteur temporel, car un temps d'adaptation est nécessaire pour permettre aux cellules endothéliales de s'adapter à une contrainte de cisaillement, et de maintenir l'intégrité et la viabilité d'un néo-endothélium. Pour Feugier et al.[76] les cellules endothéliales adhèrent peu sans matrice protéinique, mais celles qui restent s'étalent bien et résistent par la suite très bien à la contrainte cisaillement. Selon Gogova et al.[77], les cellules endothéliales sont plus aptes à cicatrifier une blessure sous contrainte de cisaillement (19dyn/cm²) comparativement à une faible contrainte (3dyn/cm²). Dardik et al.[18] voient également une amélioration de la prolifération des

cellules endothéliales sous des contraintes turbulentes. Selon Fernandez et al.[78] la stimulation sous contrainte de cisaillement des cellules endothéliales conduit à une modification non thrombotique de leur expression génétique. Enfin, la rigidité intrinsèque de la structure semble également avoir une influence sur le développement des cellules endothéliales.[79] Ces exemples illustrent bien la complexité de l'étude des cellules endothéliales, que ce soit par rapport à la structure du matériau ou à la dynamique de son environnement.

1.3.2. Les nouveaux matériaux

1.3.2.1.Polyuréthane

Le PET et le PTFE sont de loin les matériaux synthétiques les plus utilisés en chirurgie vasculaire. Toutefois, le polyuréthane (PU) est un matériau prometteur pour sa flexibilité de mise en forme et ses caractéristiques mécaniques. Tai et al.[45] ont réussi à mettre au point un polyuréthane compliant (CPU) qui, bien qu'isotrope contrairement aux artères, possède des caractéristiques de compliance comparables aux vaisseaux artériels sains. En effet, les résultats de compliance [moyenne(écart-type)] du CPU, [8,1(0,4)] sont proches de ceux de l'artère [8,0(5,9)], contrairement à ceux de la veine saphène [5,0(6,7)], du Dacron [1,8(1,2)] ou du PTFE [1,2(0,3)]. L'approche structurelle de Sonoda et al.[80] est cependant quelque peu différente. Ces auteurs ont mis au point une prothèse vasculaire en polyuréthane à double paroi qui reproduit une courbe de compliance similaire à celle d'une artère. Les résultats in vivo semblent satisfaisants à 12 mois en termes de réussite (86%). Par contre, les caractéristiques mécaniques ont fortement varié principalement à cause de la fatigue à l'usure, la biodégradation et de l'infiltration tissulaire. Pour Matsuda et He,[81, 82] plus de porosité (150 μ m de diamètre, avec une densité de 121 pores/cm² par rapport à 9 pores/cm²) permet à une fine membrane de polyuréthane, simplement suturée autour d'une néointima artérielle formée d'un tube de collagèneensemencé de cellules musculaires lisses et recouvertes de cellules endothéliales, de maintenir la viabilité in vivo de l'échafaudage tissulaire après douze mois d'implantation. Le PU peut ainsi être mis en forme à discrétion, tout en étant ajusté chimiquement afin de favoriser la croissance de cellules endothéliales. L'incorporation de peptides (GGGYIGSRGGGK) favorise l'adhérence des cellules endothéliales,[83] tout comme les oxydes d'azote,[84] qui servent à inhiber l'adhérence

plaquettaire et des cellules musculaires lisses tout en favorisant celles des cellules endothéliales. Hsu et al.[85] ont également amélioré la rétention des cellules endothéliales in vitro sur un PU enduit de gélatine, avec un recouvrement de CBR-RGD (cellulose binding domain RGD-containing protein). La rétention atteint les 100% si les cellules sont incubées statiquement pendant une semaine avant perfusion. Kannan et al.[86] ont choisi de réaliser un nanocomposite, le « polyhedral oligomérique silsesquioxane-poly(carbonate-urea)uréthane » (POSS-PCU) sur qui les cellules adhèrent et prolifèrent de la même manière que sur du polystyrène pour culture cellulaire (TCPS). De manière générale, les résultats concernant les PU sont encourageant, mais il reste à obtenir des performances à long terme plus satisfaisantes, pour éviter la biodégradation et la chute des caractéristiques mécaniques.[80]

1.3.2.2. Matériaux de renfort d'origine naturelle

Les matériaux de renfort d'origine naturelle, comme la soie, démontrent la possibilité de produire des échafaudages pour une reconstruction tissulaire.[87] Cependant, il est important de noter le rôle essentiel des recouvrements protéiniques en complément de ces renforts fibreux,[88] car ils ne peuvent seuls assurer la viabilité cellulaire.

1.3.2.3. Matériaux résorbables

Une autre approche consiste à développer un environnement propice à la colonisation naturelle, mais cette fois-ci in vivo. Ce concept présente l'avantage de fournir des substituts vasculaires utilisables en situation d'urgence, ou encore en chirurgie néonatale et pédiatrique. Afin de créer cet environnement propice au développement cellulaire, le travail se fait principalement sur des matériaux résorbables, en se basant sur l'idée que les cellules, en se développant, substituent progressivement une matrice extracellulaire au matériau dégradé, stimulant la régénérescence tissulaire. Cette approche est très liée aux concepts de l'ingénierie tissulaire. Les matériaux couramment employés sont l'acide polylactique (PLA) et le poly(ϵ -caprolactone),[89, 90] couplés quelquefois avec du collagène,[91, 92]. Ces matériaux présentent de bons potentiels d'endothélialisation avec même, par exemple, l'apparition d'une matrice extracellulaire contenant de l'élastine chez le chien.[91] Les hydrogels tels le Hyaluronan,[93] sont également des matériaux prometteurs, qui ont

notamment permis une rapide endothélialisation chez le rat, un envahissement cellulaire menant à une régénération de la paroi vasculaire, tout en se dégradant progressivement. [94]

La difficulté majeure réside alors dans la résistance mécanique à court et long terme des échafaudages obtenus face aux conditions physiologiques de pression sanguine.[95] Par ailleurs, des réserves s'expriment au niveau du taux de dégradation, la nature des composés dégradés, ainsi que la taille des fragments issus de la dégradation.

1.3.3. Mise en forme des nouveaux matériaux

Dans l'organisme, les cellules sont en contact avec des structures nanométriques comme les fibrilles de collagène. Les cellules devraient donc pouvoir mieux se développer sur des structures synthétiques possédant des dimensions similaires à celles qu'elles ont l'habitude de coloniser. Il existe plusieurs techniques permettant de mettre en forme les matériaux polymères de façon à obtenir des structures nanométriques. Parmi celles-ci, l'électrofilage est un procédé permettant de produire des fibres de très petit diamètre. Des travaux montrent que l'électrofilage de polymères biodégradables permet d'obtenir des fibres de 300nm,[96] ou de 400-800nm de diamètre,[69] qui favorisent la prolifération des cellules endothéliales. Il s'agit d'une technique polyvalente autorisant la production de fibres avec des copolymères, dont les dopants peuvent être du collagène optimisant les performances des cellules.[97] Mais les polymères biodégradables ne sont pas les seuls à être utilisés ainsi. En effet, le PET peut également être mis en forme de cette manière afin de créer un échafaudage permanent, propice au développement cellulaire.[98]

D'autres procédés permettent d'obtenir des structures nanométriques, comme l'attaque chimique,[99] la photolithographie,[100] ou encore le greffage chimique.[101] Toutes ces techniques ont prouvé que la topologie nanométrique présentait certains avantages pour la prolifération des cellules vasculaires, sans toutefois permettre la qualification de l'échelle optimale pour un type particulier de cellule. Effectivement, la comparaison de toutes ces études est difficile compte tenu de la variation des matériaux utilisés, du protocole, du ou des moyen(s) de mise en forme, de ou des l'échelle(s), ou encore des cellules étudiées.

Offrir une structure nano reviendrait ainsi à offrir simplement aux cellules une structure de développement aux dimensions plus ajustées.

1.3.4. Surface et endothélialisation

Le rôle de la surface est capital dans le processus d'intégration d'un biomatériau avec les tissus biologiques avoisinant. Lors de leur implantation; particulièrement dans le cas des implants vasculaires en contact avec le sang, les biomatériaux subissent un dépôt non spécifique de protéines. Ce processus conduit à une réaction inflammatoire et à un dérèglement local et durable de la physiologie des tissus contigus. La modification de la surface d'un biomatériau semblerait être une voie pour contre-carrer ce dépôt non spécifique. Ceci recouvre ainsi un large domaine de connaissance qui ne peut être totalement abordé en quelques pages. Cependant, deux grandes catégories de modification de surface existent et seront brièvement décrites et illustrées ici : la stratégie anti-adhésive et celle des biomolécules actives. S'en suivront alors les techniques associées à la modification physico-chimique proprement dite.

La *stratégie anti-adhésive* consiste à rendre les biomatériaux résistants au dépôt non spécifique de protéines. Pour cela, on utilise des molécules anti-adhésives comme le Poly(éthylène glycol) (PEG),[102, 103] qui prévient l'adsorption des protéines, la phosphorylcholine (PC),[104] qui prévient plutôt le dépôt plaquettaire, ou encore le chitosan,[105] qui semble favoriser le développement des cellules musculaires lisses et endothéliales. Malgré certains avantages, cette stratégie n'a pas réussi à totalement empêcher le dépôt de protéine, sans forcément améliorer l'endothélialisation.

La *stratégie des biomolécules* se base sur des composés biologiquement actifs et reconnus dans les processus de régulation vasculaire. Ainsi, l'imprégnation de prothèses avec de l'héparine,[106, 107] (glycosaminoglycane impliquée dans l'inhibition de la coagulation) empêche notablement la formation de thrombus et améliore la durabilité des implants. Des protéines comme la fibronectine ou la laminine (substrat de la migration cellulaire),[108-110] des facteurs de croissance comme le VEGF,[111] (impliqué dans l'angiogenèse), des peptides comme les RGD,[112-114] (séquence spécifique codant pour la liaison aux

intégrines cellulaires) ou encore le P15,[115] sont de bons promoteurs de l'endothélialisation.

Cependant, la simple adsorption de ces molécules, qu'elles soient anti-adhésives ou bien biologiquement actives, pose le problème de leur dispersion une fois qu'elles sont soumises aux contraintes de cisaillement dues au flux sanguin. Le greffage covalent de ces molécules peut éviter ce délaminage, mais il faut préalablement activer la surface du biomatériau. Pour se faire, le traitement peut être chimique, voire photochimique,(110) en modifiant la surface d'un PTFE avec un traitement UV sous une atmosphère d'ammoniaque.(110) De façon plus générale, il se fait par plasma, en activant la surface avec des fonctionnalisations chimiques dépendantes du type de plasma et de la nature de l'atmosphère de traitement.[116-118] Par exemple, l'incorporation de fonctions amines hydrophiles et hautement réactives,[119, 120] se fait généralement sous atmosphère d'ammoniaque ou d'azote, avec de l'hydrogène.

La conformation des protéines greffées est très importante, car elle détermine souvent leur niveau d'activité. Par exemple, Chevallier et al.[104] ont amélioré les caractéristiques d'hémocompatibilité de prothèses en ePTFE par plasma en greffant et en maintenant active de la phosphorylcholine. Autre exemple, le greffage d'héparine via un PEG améliore sa bioactivité par rapport à une simple immobilisation.[121]

Une autre méthode proposée pour la modification des surfaces est la réalisation de motifs en surface, à la manière d'un imprimé. Gauvreau et Laroche ont en effet montré que la réalisation de motifs peptidiques à l'aide d'un procédé d'impression à jet d'encre, à base de GRGDS et WQPPRARI, améliore l'étalement et la migration de cellules endothéliales. [122] Avec une technique plus flexible de pulvérisation, Gagné et al.[123], ont confirmé ces résultats.

Toutes ces techniques d'immobilisation semblent prometteuses, même si elles ont le désavantage d'augmenter le coût de production en complexifiant le processus de fabrication.

1.3.5. L'ensemencement cellulaire et ingénierie tissulaire

Les solutions abordées jusqu'à présent reposaient sur une endothélialisation in vivo par l'amélioration des biomatériaux. Les techniques d'ensemencement cellulaire et d'ingénierie tissulaire visent quant à elles l'emploi de matériel vivant mis en culture ex vivo, dans le but d'améliorer l'hémocompatibilité des implants. Le but ultime est ainsi de substituer les prothèses synthétiques par des vaisseaux artificiels.

L'ensemencement est une méthode d'amélioration des substituts vasculaires visant à développer de manière artificielle une couche de cellules endothéliales sur la surface luminale de la prothèse. La formation de ce néoendothélium a pour but de réduire la thrombogénicité de la prothèse. De nombreuses revues de la littérature ont été publiées,[32, 124-129] et concluent que l'ensemencement peut se faire en une ou deux étapes.

L'ensemencement en une étape consiste à extraire des cellules endothéliales du patient en quantité suffisante (soit de la veine saphène, soit de la microvascularisation des tissus adipeux), à les déposer sur la surface de la prothèse et à l'implanter directement dans le corps. Cette approche nécessite un faible temps de culture, mais est sensible à la qualité et quantité des cellules endothéliales prélevées chez le patient, ainsi qu'à la capacité faible ou absente des cellules endothéliales déposées à résister au flux sanguin.[124] Les résultats de cette approche en une étape demeurent cependant peu concluants.

L'ensemencement en deux étapes consiste en une culture des cellules endothéliales avec les techniques de culture cellulaire classique, sur la prothèse avant l'implantation. Cette alternative a permis d'obtenir des confluences à partir de densités de cellules plus faibles et de favoriser la maturation des cellules, les rendants ainsi plus aptes à résister à la contrainte de cisaillement provoquée par le flux sanguin. Les méthodes de culture permettant l'ensemencement des cellules endothéliales vont des simples systèmes rotatifs,[130, 131] aux systèmes par attraction électrostatique,[125] voire même magnétique,[132] grâce à des particules superparamagnétiques endocytées. Une adaptation progressive du flux permet de maintenir l'intégrité du néo endothélium.[133] De plus, les cocultures améliorent la rétention de cellules endothéliales.[75, 134] Malgré les améliorations en terme de réussite à l'implantation, cette technique n'est encore qu'en phase d'expérimentation clinique et semble bloquée dans son expansion. En effet, elle nécessite une préopération pour récolter

des tissus sources de cellules endothéliales, des temps de culture de l'ordre d'une trentaine de jours, interdisant de fait l'intervention d'urgence, sans compter les infrastructures et l'expertise nécessaires pour la culture cellulaire, absentes de nombreux hôpitaux. Le coût global est donc très prohibitif. De plus, l'ensemencement est très dépendant de la santé des cellules endothéliales extraites.[59] et donc de l'état du patient. Malgré cela, de nombreuses études sur des prothèses en ePTFE endothélialisées avec des cellules autologues montrent clairement l'impact positif d'une telle procédure sur l'amélioration de la perméabilité au long terme.[135-137]

L'ingénierie tissulaire quant à elle est en pleine effervescence depuis quelques années, tel qu'en attestent les très nombreuses revues de littérature sur le sujet.[42, 138-140] Cette approche permettrait en effet d'obtenir des substituts vasculaires comparables aux vaisseaux autologues en reproduisant un environnement physique et physiologique propice à la coculture de cellules vivantes sur des supports de développement, créant ainsi in vitro ou in vivo, des organes similaires à ceux d'un organisme sain, tant du point de vue anatomique que biomécanique. Les contraintes sont alors les mêmes que celles de l'ensemencement. On exploite alors les techniques d'extraction cellulaires, imposant la mise en place de bioréacteurs permettant la coculture de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses par exemple, dans le but de stimuler la production d'une matrice extracellulaire,[141] et de préparer les cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement des flux hémodynamiques.[142] Les matériaux de base sont variés : il y a ceux d'origine biologique comme le collagène,[143, 144] les substituts d'origine biologique[95, 145], ou encore les hydrogels.[93, 146] Enfin, il convient de noter la technique novatrice mise au point par l'Heureux et Al[147, 148] qui consiste à produire des feuillets de cellules musculaires lisses et de fibroblastes puis de les enrouler sur un mandrin pour leur donner une forme cylindrique. Les tubes ainsi formés sont ensuite ensemencés avec des cellules endothéliales, formant un substitut biologique extrêmement similaire au vaisseau natif.

Hormis les défis scientifiques et techniques liés à l'ingénierie tissulaire et l'ensemencement, la question de la réglementation et des normes de validation pour une autorisation de diffusion à grande échelle de ce type de produit demeure en suspend. En effet, l'origine biologique, la traçabilité, la normalisation et l'accréditation par les

organismes de santé publique peuvent être des freins au développement de ces domaines.[149]

Cette revue de l'art a permis de dresser un portrait de la problématique des implants vasculaires et de l'état d'avancement de la recherche. Avant d'énoncer les objectifs de cette thèse, il est nécessaire de faire le point sur les notions essentielles qui serviront de fil conducteur à ce travail doctoral.

1.4. Points clés

En corroborant les informations extraites de la revue de littérature résumée dans les sections précédentes qui portent sur les cellules endothéliales, les biomatériaux vasculaires et l'expérience acquise jusqu'à ce jour, un certain nombre de points clefs servant de base de travail ont pu être ciblés :

- Les cellules endothéliales sont sensibles à la topologie et à la structure du substrat sur lequel elles sont invitées à proliférer.[63-69] La structure des fibres textiles des prothèses vasculaires peut donc avoir une influence sur le développement en monocouche d'un néoendothélium.
- Dans des conditions cliniques d'implantation, un biomatériau vasculaire mis en contact avec le sang se recouvre pratiquement instantanément par une couche de protéines plasmatiques aboutissant à court terme à une matrice protéinique principalement composée de fibrine. Le biomatériau est donc essentiellement masqué par cette couche. Une cascade d'événements conduit à un dérèglement local de l'homéostasie, déclenchant l'hémostase.[22, 40-44]
- La thrombose et l'hyperplasie intimale prédominent sur l'endothélialisation et peuvent conduire rapidement à l'occlusion de la prothèse.[38, 41, 42, 45, 47, 48]
- Les mécanismes de néo-endothélialisation sont encore mal compris et l'expérimentation animale induit des biais importants concernant l'âge des modèles, la taille des implants et les débits de circulation.[46, 60] Il est fort probable que la

colonisation transmurale (via l'angiogenèse au travers de la paroi de la prothèse) est prédominante par rapport à la colonisation transanastomotique (via l'endothélium de l'artère native depuis l'anastomose). La colonisation par îlot, plus relative aux cellules souches ou progénitrices circulantes, a peu d'influence dans le cas de grandes surfaces à cicatriser, ce qui est le cas lors de l'implantation d'une prothèse.[7, 9, 11-13, 17, 46, 127, 128, 150-152]

- Les prothèses vasculaires textiles offrent une très bonne longévité mécanique, et la nature poreuse du textile maintient une paroi apte à permettre une communication cellulaire entre le sang et le milieu environnant, particulièrement pour les structures tricotées.[34, 46, 70, 153]
- La compliance d'une prothèse est importante dans le cas du remplacement de vaisseaux élastiques, comme l'aorte thoracique par exemple. Cependant, cette compliance est moins cruciale pour des vaisseaux de petits diamètres au flux plus continu et laminaire.[46]
- Les prothèses textiles sont enduites de protéines (collagène, albumine, gélatine) dans le but de réduire la perméabilité. Cependant, ces couches de protéines n'ont pas apporté d'amélioration en terme de néo-endothélialisation.[34]
- Un biomatériau biodégradable permet la substitution progressive de l'interface par la matrice extracellulaire produite par les cellules l'ayant colonisée.[154-156] La nature synthétique d'un matériau permet quant à elle de s'affranchir des problèmes de transmission d'agent infectieux et de variabilité biologique, tout en autorisant une adaptabilité aux besoins à venir, en termes de chimie, de propriétés mécaniques et de dégradation.

1.5. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est de développer une nouvelle stratégie d'optimisation de la surface intimale de la prothèse vasculaire textile afin de favoriser le développement en monocouche de cellules endothéliales, ce qui facilitera la formation d'un néoendothélium.

L'hypothèse générale retenue est que la formation d'un néoendothélium à l'intérieur d'une prothèse vasculaire augmentera sa résistance à la sténose.

Les objectifs plus spécifiques de ce doctorat se résument ainsi :

- Déterminer quelle est la capacité des structures textiles des principales prothèses vasculaires commerciales en PET (tissées, tricotées, avec ou sans effet velours) à soutenir la colonisation des cellules endothéliales. Manifestement, la structure des fibres textiles peut avoir une influence sur le développement en monocouche d'un néoendothélium.
- Fabriquer une interface biodégradable et poreuse permettant la croissance en monocouche des cellules endothéliales, pouvant être déposé sur une structure textile. En effet, une interface dont les dimensions intrinsèques seraient inférieures à la taille des cellules endothéliales (échelle submicrométrique) et dont la position se situe entre le sang et le textile des prothèses, favoriserait une prolifération en monocouche des cellules endothéliales et subséquentement la formation d'un néoendothélium.
- Recouvrir la face interne d'une prothèse vasculaire textile avec cette interface et optimiser l'adhérence de celle-ci en vue d'améliorer la résistance à la délamination. Le caractère tubulaire des prothèses vasculaires induit des contraintes majeures sur la nature du procédé visant à mettre en forme un matériau poreux et cohésif sur sa surface intinale.

1.6. Stratégie de travail

Les structures textiles des principales prothèses vasculaires commercialisées actuellement seront testées pour vérifier si les cellules endothéliales sont à même de proliférer correctement. Des tests d'adhérence et de prolifération seront effectués avec des cellules endothéliales aortiques de bœuf. Ils seront complétés par de l'imagerie microscopique à fluorescence permettant de visualiser les cellules sur les structures textiles. Ces travaux seront décrits dans le chapitre 1.

Nous avons ensuite sélectionné un matériau synthétique biodégradable pour réaliser l'interface sur la structure textile. Les polymères biodégradables sont essentiellement des polyesters aliphatiques (l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), l'acide poly(glycolique co lactique) (PLGA), l'acide poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et ses copolymères...).[157] L'acide poly (L-lactique) (PLLA) est un excellent candidat, tant par son mécanisme de dégradation,[158] ses propriétés physico-chimiques et mécaniques satisfaisantes pour les besoins de notre projet, que par sa facilité à être synthétisé en laboratoire de recherche ou en milieu industriel ainsi que sa disponibilité et son faible coût.[159] C'est enfin un biomatériau biodégradable accrédité par la FDA et couramment employé en chirurgie et en recherche.[69, 96, 160-166] Il est de plus facilement transformable (copolymère, fonctionnalisation de surface, greffage de biomolécule...),[90, 160, 167-170] ce qui autorise à long terme d'éventuelles modifications.

Un nouveau procédé de production de fibres nanométriques capable de déposer ces fibres dans des espaces réduits sera développé : le filage par jet d'air. Ce procédé implique l'utilisation d'un jet d'air en surpression autour d'une fine aiguille de laquelle est éjecté un polymère en solution. L'air emporte le polymère, qui s'étire en même temps que le solvant s'évapore. L'étirage du polymère, rendu de plus en plus visqueux, entraîne la formation de fibres. Celles-ci sont alors recueillies sous forme d'une couche de fibres non orientées. Des prothèses textiles tricotées sans effet velours seront ensuite utilisées et recouvertes de PLLA grâce à cette interface fibrillaire.

Les fibres de PLLA obtenues par le procédé de filage par jet d'air (dans une version plane) seront analysées afin de déterminer l'influence de certains paramètres sur la qualité de production. Les fibres seront ensuite testées afin de vérifier si elles sont capables de soutenir une adhérence et une prolifération de cellules endothéliales en respectant leur phénotype, à savoir une prolifération en monocouche. Des tests de vieillissement seront également effectués pour vérifier le rythme de dégradation à court terme des fibres de PLLA. Ces travaux sont décrits dans la section Chapitre 2.

Le procédé de filage par jet d'air sera ensuite adapté à la forme tubulaire des prothèses vasculaires. Un injecteur sera spécialement conçu pour permettre le dépôt des nanofibres à l'intérieur de la prothèse, sur la paroi intinale de celle-ci. Les propriétés physico-chimiques

des nanofibres obtenues seront ensuite finement caractérisées. Enfin, les moyens pour optimiser l'adhésion des fibres de PLLA sur la surface des prothèses seront étudiés. La section « Chapitre 3 » décrit ces travaux.

Pour finir, la question du comportement des cellules endothéliales sous un flux dynamique sera explorée par le biais de la conception d'un système de stimulation dynamique et par des analyses biologiques. D'autre part, des analyses fines de la cristallisation du PLLA sous sa forme nanofibrillaire seront menées afin d'éclaircir les mécanismes de formation de ces fibres par le procédé de filage par jet d'air. Ces travaux sont décrits dans la section Appendice 1 : Travaux non publiés.

2. Chapitre 1 - Article 1 : Effet de la microtexture des prothèses en polyester textile sur l'adhérence et la prolifération des cellules endothéliales

Effect of Polyester Prosthesis Micro-Texture on Endothelial Cell Adhesion and Proliferation

Sébastien François^{1,2}, Nabil Chakfé³, Bernard Durand⁴, Gaétan Laroche^{1,2*}

¹Surface Engineering Laboratory, Department of Mining, Metallurgical, and Materials Engineering, Université Laval, Quebec, G1K 7P4, Canada, ²University Hospital Research Center, St-Francois d'Assise Hospital, Quebec, G1L 3L5, Canada, ³Department of Vascular Surgery, Les Hôpitaux Universitaires of Strasbourg, BP 426 67091 Strasbourg cedex, France, ⁴GEPROVAS, 11 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse cedex France

Published in

Trends In Biomaterial and Artificial Organs, 2008 22 (2), 89-99

*Corresponding author: Gaétan Laroche, PhD, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Faculté des sciences et de génie, Pavillon Adrien-Pouliot
Université Laval Québec (Québec) Canada G1K 7P4

E-mail address: Gaetan.Laroche@gmn.ulaval.ca

2.1. Avant propos

Les prothèses textiles de faible diamètre sont sujettes à d'importants cas de re-sténose. Ces occlusions, principalement dues à la thrombose et l'hyperplasie intimale peuvent être expliquées en partie par l'absence de formation de néoendothélium à la surface de la prothèse vasculaire. Or comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail doctoral, la géométrie et la topologie d'une surface sont des facteurs non négligeables affectant le comportement des cellules endothéliales. L'objectif de cette thèse étant de permettre une amélioration structurelle de la paroi intimale des prothèses vasculaires textiles afin de promouvoir la néo-endothélialisation, il convient dans un premier temps de déterminer l'influence de ce textile sur le comportement des cellules endothéliales. Dans ce chapitre, qui reprend le premier article réalisé dans le cadre de cette thèse, le comportement en adhérence et en prolifération de cellules endothéliales sur quatre structures textiles en PET a été étudié.

La contribution des auteurs a été mentionnée dans la section avant propos (iv).

2.2. Résumé

Les prothèses textiles en polyethylene terephthalate (PET) de petits diamètres démontrent de faibles taux de perméabilité et parmi les facteurs qui expliquent les taux d'échec élevés pour ce type de prothèse, l'absence de néoendothélium sur la surface intimale du substitut vasculaire joue probablement un rôle majeur dans le mécanisme d'occlusion de la prothèse. Si la structure du matériau a une réelle influence sur les cellules endothéliales qu'il supporte, l'effet de la structure textile est quant à lui méconnu. Dans le but de déterminer l'effet de la chimie de surface et de la microstructure, cette étude compare le comportement des cellules endothéliales aortiques de Bœuf (BAECs) sur des films de PET et sur des textiles de prothèses commerciales de PET non imprégnées (tricot et tissé, avec ou sans velours). Pour cela, nous avons effectué un test d'adhérence après une heure suivie de tests de prolifération à 2, 3, 5, 9 et 15 jours sous des conditions statiques. Les résultats montrent une différence structurelle significative ($p < .001$) entre le film de PET et les textiles, où

l'adhérence des BAECs était favorisée sur les structures textiles. Aucune différence n'a été mesurée entre les quatre types de textiles. Les tests de prolifération montrent quant à eux des différences entre chaque échantillon, avec une meilleure prolifération sur le tricot velours. Les micrographies à immunofluorescence ont permis de confirmer que le textile conduit à une isolation des BAECs, principalement à cause de leur haute surface spécifique. Bien qu'étant de bon promoteur de l'adhérence cellulaire, les textiles sont incompatibles avec la prolifération en monocouche des BAECs. Au vu de ces résultats, la structure de surface des prothèses textiles en PET doit être modifiée pour une meilleure prolifération en monocouche des cellules endothéliales (néoendothélialisation).

Mots clefs : textile, microstructure, cellules endothéliales, prothèses vasculaires

2.3. Abstract

Small-diameter Polyethylene terephthalate (PET) textile prostheses display poor patency rates. Among the many factors which may explain this, the absence of neo-endothelium formation on the inner surface of the graft is one cause of failure. This neo-endothelialization may depend on the material's structure, which clearly influences endothelial cells development. Thus far, little is known regarding the effect of textile structure on cell development. To determine the influence of a material's chemistry and micro-structure on cell adhesion and proliferation, this study compared the behaviour of bovine aortic endothelial cells (BAECs) on a flat PET film and those on non-coated textile structures of knitted and woven commercial prostheses with and without velour. One-hour cell adherence tests were performed followed by cell proliferation tests at 2, 3, 5, 9, and 15 days under static conditions. Results show a significant structural difference ($p < .001$) between the PET film and the PET textile when BAEC adherence was promoted on the textile structures. No differences were measured between the four types of textile. Proliferation tests showed differences between each sample, with better proliferation on the velour knit samples. Immunofluorescence micrographs confirmed that the textile structures enabled the isolation of individual BAECs because of their high specific surface. Although appearing as promising adherence promoters, the textiles were incompatible with

monolayer BAEC proliferation. In light of this finding, prosthetic surface morphology resulting from textile structure must be modified to support monolayer cell proliferation.

Keywords: textile, micro-structure, endothelial cells, vascular prostheses

2.4. Introduction

Autologous vessels constitute the gold standard for small-diameter vessel replacement. However, the lack of quality autologous vessels has forced surgeons to use synthetic vascular prostheses. Since 1952, with the first implanted synthetic vascular prosthesis, as described by Voorhees et al.[33], vascular synthetic substitutes have been improved continuously [34] and are now used worldwide. Although these improvements have led to better patency rates, today's materials of choice, such as polyethylene terephthalate (Dacron™ or PET) or expanded polytetrafluoroethylene (Teflon™ or ePTFE), do not enable implanted prostheses to heal completely, as the inner surfaces of these prostheses are mostly covered by only a fibrin layer or coagulated blood, even after a long implantation period.

Today, PET textile vascular prostheses are the current standard for the replacement of arteries of more than 8 mm in diameter. Based on the latest knowledge of textile materials design and mechanical properties, these vascular prostheses are manufactured to match as closely as possible the natural behaviour of human arteries. Woven or knitted prostheses are chosen according to surgeons' preferences [34] and are most commonly used with gelatin or collagen coating or pre-clotted with the patient's own blood to reduce the porosity of the textile structure at the time of implantation. The PET fibers can even be coated with silver to reduce the risk of infection. Following implantation, the internal surface of these vascular prostheses should be covered by a monolayer of endothelial cells [125, 127] similar to what is observed in healthy arteries, therefore ensuring blood compatibility. The formation of this endothelial cell monolayer is sensitive to many factors such as biomaterial surface chemistry and geometry [70] or the endothelial cells' own biochemical and biomechanical characteristics [79]. In the best achievable clinical scenario, this cell layer is barely limited to the perianastomotic area (approximately 1-2 cm). This

lack of endothelialisation can lead to thrombosis and the ultimate failure of the graft. Moreover, small diameters (6-8 mm) represent an elevated risk of luminal surface hyperplasia and unfortunately, no PET prostheses exist for smaller diameters.

Despite the fact that PET textile vascular prostheses have been in use for over fifty years, little is known regarding the effects of textile micro-texture on endothelial cell adhesion and proliferation. Thus far, studies on endothelial cell interaction with PET have mainly focused on their behaviour under shear stress [74], on plasma-treated PET [117], or with several types of impregnation [171]. Compared to other materials, collagen-coated PET has been shown to improve cell adhesion [172]. To our knowledge, no studies have addressed how cells react to non-coated PET textile structures. Better understanding this effect could lead to an optimization of textile prostheses and a better performance of small-diameter textile prostheses in particular, which are in great demand.

The goal of this study was to compare the behaviour of endothelial cells cultured on commercially available PET knitted and woven textile prostheses (with or without velour) with that of cells cultured on flat PET films to discriminate between the effect of the material's chemistry and its 3D structure on cell adhesion and proliferation. This study therefore provides a clear representation of how endothelial cells behave on a textile structure by providing a comprehensive link between the bidimensional cell culture on tissue culture plates and the 3D structure of vascular prostheses.

2.5. Materials and methods

2.5.1. Materials

Four materials were selected for this study: two non-crimped PET textile tubes with velour (from semi-finished Albograft™ prostheses, Biomateriali S.r.l., Brindisi, Italy), namely, one Biomateriali Woven (BW) and one Biomateriali Knitted (BK), and two without velour (from semi-finished Dialine II and Wovex prostheses, C.R. BARD/Cardial, Saint-Etienne, France), namely, one Cardial Woven (CW), and one Cardial Knitted (CK). Polyethylene terephthalate (PET) films were used as controls. The self-made support frame was made of a PTFE rod holding a PTFE ring.

The cell cultures were conducted using bovine aortic endothelial cells (BAECs). The culture medium was a mixture of 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% Antibiotic-Antimycotic (AA) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), diluted in type I water (Nanopure, Barnstead, Dubuque, IA, USA) and Trypsin-EDTA (Trypsin) was also used for the cells culture. Cell viability was ascertained using Tripan Blue staining (TPS). Fluorescence emissions were recorded using a solution of 20% resazurin sodium salt and 80% DMEM. The cells were fixed with formaldehyde solution (FS, 3.7% solution in PBS from 37% formaldehyde) and stored in 1 mL of PBS containing 20 μ L of sodium azide (SA, 10% solution in water).

The cells were permeabilised in a solution of 0.1% Triton-X-100 (Triton) in PBS, dipped in 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, and labelled with Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (1:500) (Rhodamin-Phalloidin) and DAPI (1:2000) in 3% BSA for fluorescence investigations. Fluorescent mounting medium (Dako) was used for each optical micrograph.

2.5.2. Methods

2.5.2.1. Experimental protocol

The textile prostheses selected for this study were used without any coating in order to study the impact of the textile structure on cell behaviour. Each prosthesis material was analyzed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA) and Fourier transform infrared spectroscopy, (FTIR, Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA). Our results (not shown) confirm the identical chemical composition of each PET textile sample and the absence of any mineral or organic contaminants.

The prosthesis samples were mounted on a self-made frame, luminal face up, then placed on a PTFE rod (diameter 5 mm, height 4 mm) and held with a PTFE ring which maintained the samples in a fixed position. The support frame allowed the manipulation of each sample with no structural deformation. The frame components were washed each time for 5 min in an ultrasonic bath, first with detergent, then with deionised water (Nanopure system), acetone, deionised water, and methanol (70%), and finally air dried.

Control films were cut into circular shapes and positioned on an identical support frame. The film samples were successively cleaned in ultrasonic bath with acetone, deionised water, and methanol (70%). The controls were also analyzed using XPS and FTIR (results not shown) to confirm a chemical composition identical to that of the textile materials as well as the absence of contaminants.

Each sample was sterilized for 20 min in an autoclave (STM-EL Sterilmatic[®], Market Forge Industries Inc., Everett, MA, USA) at 121°C.

To avoid any interaction between the effect of the structure and any binding agent (graft coating, serum proteins), only non-coated textile samples were used. The cell cultures were performed so as to minimize protein deposition from the culture medium (prior wetting of textile with PBS only and short adherence time of 1 h). Due to these harsh cell culture conditions, a large density of cells (425 000 cells/cm²) was seeded on the samples to obtain rapid confluence.

Cell cultures were conducted in triplicate for each PET textile structure to measure cell adhesion after 1 h and cell proliferation after 2, 3, 5, 9, and 15 days. BAECs were first cultivated in a 75 cm² flask (cat. #430641, Corning Inc., Corning, NY, USA) with culture medium in an incubator (E series model 5200, Napco scientific compagny, Tualatin, OR, USA) at 37.5°C with 5% CO₂ to obtain the minimum required amount of cells. After three days, when the BAECs reached confluence, they were washed with 5 mL of PBS and harvested with 2 mL of Trypsin-EDTA (1X) during one minute, then suspended in 10 mL of prepared medium (passage P = 5). The solution was then centrifuged at 1500 RPM during 5 min. The supernatant was then removed, and the collected cells were resuspended in 10 mL of medium. Following a cell count (standard procedure under a microscope with a hemacytometer), we were able to determine the cell concentration of our solution, which was then adjusted with medium to obtain 4 mL of solution with a concentration of 1 700 000 cells/mL.

One drop of 50 µL containing 85,000 BAECs was deposited on each sample (0.2 cm² to obtain a cell density of 425,000 cells/cm²) previously wetted with PBS (to avoid protein deposition) and was placed in a 48-well plate (#3548, Corning). Each sample was incubated

for 25 min at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ to enable cell deposition. Each well was then filled with culture medium and allowed to incubate for one hour. The medium was then removed and the adhesion was measured by washing the samples twice with PBS. All of the samples designated for the adhesion tests were then replaced in the incubator for 4 h with a resazurin solution. Estimated adhesion was obtained by measuring the resorufin fluorescence (resulting from the metabolization of resazurin by the cells) and by comparing the fluorescence level with the calibration curves. The resazurin assay method was used because it is nondestructive and capable of assessing 3D culture, contrary to 2D imaging analyses. Fluorescence measurements were performed on a FL600 luminescence spectrometer (Bio-Tek, Winooski, VT, USA), using excitation and emission wavelengths of 485 nm and 590 nm, and by reading a 48-well plate filled with 0.5 mL of the resazurin solution metabolized on each sample. Prior to transferring to the reading plate, the resazurin solution in the culture well was carefully homogenized to remove metabolized resazurin (resorufin) located in the vicinity of the textile surface. Fluorescence was then compared to the calibration curves performed for each reading. Each experiment was performed in triplicate.

Cell proliferation experiments were done in an incubator at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ with culture medium for 2, 3, 5, 9, and 15 days. Culture medium was replaced every three days. Cell proliferation was measured using the identical fluorescence technique as that used for the adhesion tests, with new calibration curves each time. The proliferation results were normalized to the initial number of cells seeded on the PET textile samples and PET control films.

Following each fluorescence measurement, the samples were washed twice with PBS, fixed with formaldehyde (3.7%) for 20 min, and washed again twice with PBS. The samples and controls were stored in the dark at 4°C, in 1 mL of PBS added with 20 µL of sodium azide (10% solution in water, 19993-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Each sample was analyzed with fluorescence microscopy to determine the geometrical features influencing cell adhesion and proliferation. The samples and controls were first permeabilised in a solution containing 0.1% Triton-X-100 (T9284, Sigma-Aldrich) in PBS for 3 min at room temperature, followed by five washings with PBS to halt the action of the

Triton. The samples and the controls were then dipped for 30 min in a solution containing 3% BSA in PBS for further labelling with fluorescent dyes Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (1:500) (rodamin-phalloidin) and DAPI (1:2000) in BSA 3% for 45 min at room temperature in the dark. Fluorescent phalloidin was used to identify filamentous actin in the cells, while the DAPI detected nucleic acid molecules. Finally, the samples and controls were washed five times with PBS and stored in the dark at 4°C. Each sample was cut from its PTFE frame to be mounted on glass strips with fluorescent mounting medium.

2.5.2.2. Imaging

Dry samples were glued on a stub and sputter-coated with gold. Observations without cells were performed under a Jeol JSM35CF scanning electron microscope (Soquelec, Montréal, QC, Canada) using a 15 kV accelerating voltage.

Tapping mode atomic force microscopy (AFM) was performed under ambient conditions with a Dimension 3100 atomic force microscope (Digital Instruments, Santa-Barbara, CA) using clean PET film and PET textile fibre. Surface topography was determined for areas of 500 x 500 nm using WSxM 4.0 Develop 11.4 software [173]. Surface roughness was estimated by measuring the average root-mean-square of the height deviation taken from the mean data plane.

The cell immunofluorescence micrographs were taken with an Eclipse E800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CCD Hamamatsu ORCA ER cooled (-20 C) digital camera (Photonics Management Corp., Bridgewater, NJ, USA) and using Simple PCI AIC software (Compix Inc., Imaging systems, Sewickley, PA, USA), at various magnifications (10X to 60X).

2.5.3. Statistical analysis

Cell adhesion and proliferation analyses were performed in triplicate for several independent experiments following identical protocols. All recorded data were used together to perform statistical analyses. Cell adhesion results were expressed as the estimated number of adhered cells (based on the respective experiment regressions of the

calibration curves), while proliferation results were normalised according to the respective experiment. When assumptions of normality and variance homogeneity were met (visual inspection of data distribution and Levene test, respectively), analysis of variance (ANOVA and Bonferroni Post Hoc) was performed; otherwise non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) were performed to determine significant group differences (four textile structures BK, BW, CK, CW, and PET film structure) and the various measurements (Adherence as well as proliferation at 2, 3, 5, 9, and 15 days normalized with respect to cell adherence). Statistical analyses were conducted on these data using SPSS (version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.6. Results

2.6.1. SEM observations:

Figure 11 displays the luminal side of the four textile structures investigated in this study. The Biomateriali-knit (BK) and velour graft consisted of a warp-knit structure, mixing both flat and texturized yarns (Figure 11A).

The measured diameter of the PET fibers was approximately 13 μm , with a non-texturized yarn diameter ranging between 80 and 100 μm . In the texturized yarn, the spaces between two fibers came to extreme values of up to 30 μm . The manufacturer's data indicated a water permeability according to ISO 7198 of $\leq 3.720 \text{ ml/cm}^2/\text{min}$ (with a 125 gram force applied). The Biomateriali-woven (BW) and velour graft was composed of a 1/1 plain woven textile, with a mix of both flat and texturized yarns (Figure 11 B). Figure 11 B shows that the flat yarns displayed a width of approximately 150-200 μm , with a fiber diameter of close to 13 μm . The width of the texturized yarns was approximately 270 μm . The manufacturer's data indicated a water permeability according to ISO 7198 of $\leq 331 \text{ ml/cm}^2/\text{min}$ (with a 500 gram force applied). The Cardial-knit (CK) graft presented a warp-knit structure (Figure 11 C). The warp yarn displayed a width of approximately 200 μm , and the knitted yarn had a width of close to 115 μm , with the diameter of the fibers measuring approximately 13 μm . The Cardial-woven (CW) graft was made of a 1/1 plain woven textile with flat yarns (Figure 11 D). Yarn width was approximately 150-

200 μm , with fiber diameter measuring $\pm 13 \mu\text{m}$. The PET film image recorded with the same magnification exhibited a totally flat, smooth surface (image not shown).



Figure 11: Scanning Electronic Microscopy images (SEM), showing the four textile structures (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). The lines at the bottom of the images correspond to 100 μm for 100X magnification.

2.6.2. AFM observations:

Figure 12 shows the AFM observations of 500 nm x 500 nm of PET film (Figure 12 A) and PET textile fibre (Figure 12 B). Both surfaces displayed a topography of almost identical RMS roughness (2.1 nm for both the PET film the PET fiber). The PET film showed mostly a circular geometry, while that of the PET fibre was more elongated. This can be explained by the different manufacturing processes used to obtain films and fibres (biaxial strain versus uniaxial strain, respectively).

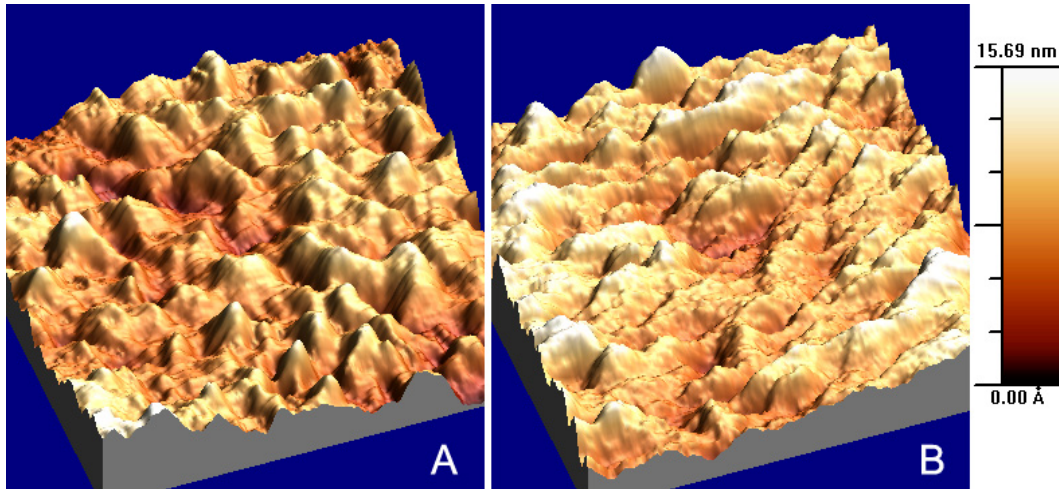


Figure 12: Tapping mode AFM images (500 x 500 nm) of the PET film surface (A) and the PET fiber surface (B).

2.6.3. Cell adhesion tests

Table 2: Cell adhesion proportions \pm Standard Error of the Mean (SE) on PET textile and PET control film structures, and cell proliferation proportion (\pm SE) according to adhesion results

	BK	BW	CK	CW	PET
Adhesion (n=21)	84 \pm 5%*	89 \pm 5%*	86 \pm 5%*	92 \pm 5%*	56 \pm 6%
2 days proliferation (n=24)	[(18 \pm 3) \times 10] $\%$	[(16 \pm 2) \times 10] $\%$	[(17 \pm 2) \times 10] $\%$	[(15 \pm 2) \times 10] $\%$	[(12 \pm 4) \times 10] $\%$
3 days proliferation (n=21)	[(22 \pm 3) \times 10] $\%$	[(22 \pm 3) \times 10] $\%$	[(22 \pm 3) \times 10] $\%$	[(18 \pm 2) \times 10] $\%$	[(16 \pm 3) \times 10] $\%$
5 days proliferation (n=24)	[(35 \pm 4) \times 10] $\%$	[(23 \pm 3) \times 10] $\%$ **	[(27 \pm 3) \times 10] $\%$	[(23 \pm 2) \times 10] $\%$ **	[(28 \pm 8) \times 10] $\%$ **
9 days proliferation (n=9)	[(50 \pm 4) \times 10] $\%$	[(37 \pm 3) \times 10] $\%$ †	[(33 \pm 2) \times 10] $\%$ ‡	[(35 \pm 2) \times 10] $\%$ ‡	[(24 \pm 4) \times 10] $\%$ ‡
15 days proliferation (n=9)	[(85 \pm 7) \times 10] $\%$	[(69 \pm 7) \times 10] $\%$ **	[(69 \pm 5) \times 10] $\%$ **	[(8,3 \pm 1) \times 10 ²] $\%$	[(66 \pm 7) \times 10] $\%$ **

Note: BK=Biomateriali Knitted/velour, BW=Biomateriali Woven/velour, CK=Cardial Knitted, CW=Cardial Woven, PET=Control film.

* $p \leq .001$ compared with PET, ** $p \leq .05$ compared with BK, † $p \leq .05$ compared with PET, ‡ $p \leq .01$ compared with BK

Results of the cell adherence after one hour on the various structures are expressed as the percentage of adhered cells compared to the initial number of cells seeded on the sample

surfaces (85000 on each sample surface). Table 2 shows adherence results as mean \pm Standard Error of the Mean (SE). The cells exhibited a similar behaviour on every textile structure with no significant differences between the four types of prosthesis. However, a clear difference was observed between the textile structures and the flat film, where less adhesion was recorded. Statistical analysis revealed a significant group effect on the adherence variable between all of the samples after a one-hour adherence test ($F(4, 104) = 8,77, p < .001$). Bonferroni Post Hoc analyses revealed that the adherence on the PET film was significantly lower than that found on the BK ($p = .001$), BW ($p < .001$), CK ($p < .001$) and CW ($p < .001$) grafts. No other significant results were found.

2.6.4. Proliferation tests

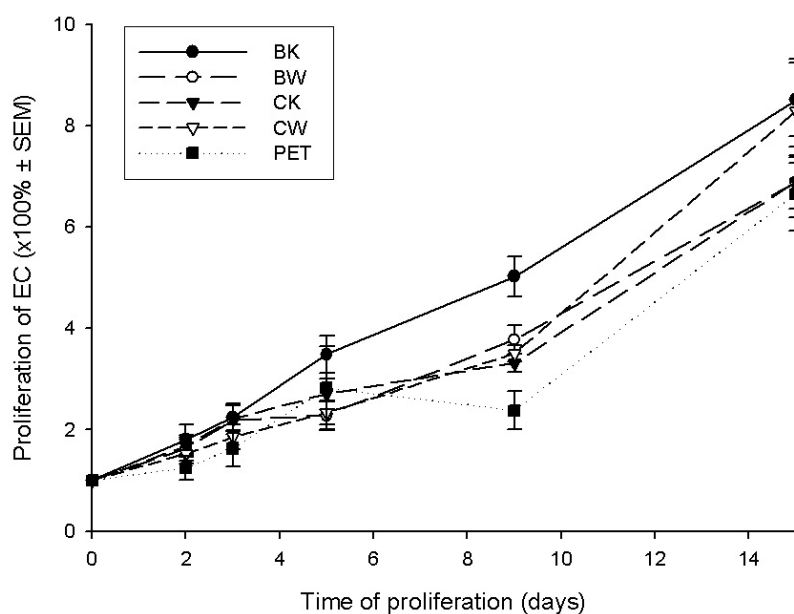


Figure 13: Proportion of endothelial cells on PET textile structures (BK = Biomateriali Knitted/velour, BW = Biomateriali Woven/velour, CK = Cardial Knitted, CW = Cardial Woven) and PET control film structure, \pm Standard Error of the Mean (SE)

Figure 13 illustrates the proliferation rate according to the raw proliferation data normalized with respect to cell adherence. Table 2 shows the proliferation results as mean \pm SE. The BAECs exhibited a similar pattern of proliferation, with a global increase in cell number over time. Results after 2 days and 3 days of proliferation demonstrate an almost similar

behaviour between all of the textile structures and the flat PET film, with no significant differences between the groups. After 5 days, statistical tests revealed a significant group effect of proliferation variable between all of the samples (χ^2 [df = 4] = 12.727, $p < .05$). Mann-Whitney analyses indicated that the proliferation on the BK graft was significantly higher than that found on the BW ($p < .05$) and CW ($p < .05$) grafts, and the PET film ($p < .05$). Another group effect was detected after 9 days of proliferation (χ^2 [df = 4] = 19.081, $p = .001$), and was later confirmed by Mann-Whitney analyses, where the BK graft performed significantly better compared to the others (BW $p < .05$, CK $p < .05$, CW $p < .001$, and PET film $p < .05$) and where proliferation was significantly lower on the PET film than on the BW graft ($p < .05$). After 15 days of proliferation, no more group effect was detected, although, Mann-Whitney analyses did show that the proliferation on the BK graft was significantly higher than that found on the BW ($p < .05$) and CW ($p < .05$) grafts and the PET film ($p < .05$). No other significant differences were found.

2.6.5. Fluorescence microscopy

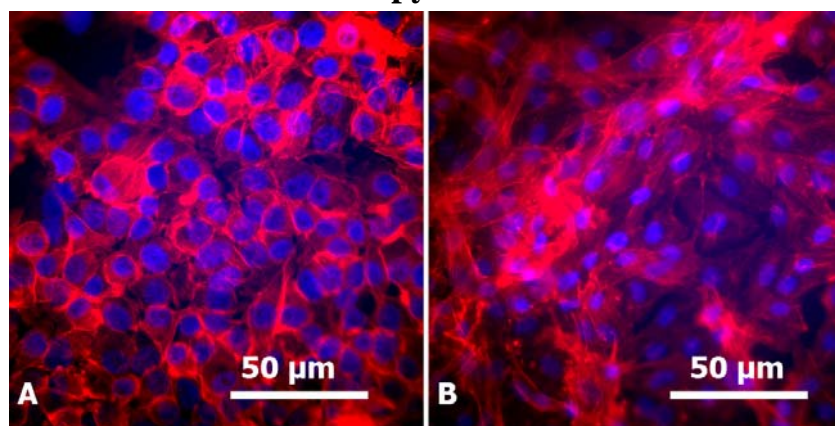


Figure 14: Fluorescence micrographs of the PET flat film samples after 1 h of adhesion (A) Endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI showed a typical behaviour after 1 h of adhesion, with cobblestone organization and spindle shape. After 2 days of proliferation: (B) Endothelial cells were organized in a cord-like structure, precursor of angiogenesis. The lack of 3D matrix led to the collapse of the capillary.

To prevent the effect caused by the halo of brightness made by the white textile fibers, the micrographs of the textiles were taken on the guide line or remeshing line which are the flat or texturized black yarns. The specific cobblestone shapes of the cells on the PET film

samples confirm the endothelial cell phenotype (Figure 14 A). The endothelial cells presented a classic organization after 2 days by beginning to create cord-like structures which are capillary precursors, and by presenting highly characteristic round forms (Figure 14 B). The absence of a 3D scaffold led to the collapse of the tube-like structure into an artificial multilayer of endothelial cells (Figure 14 B).

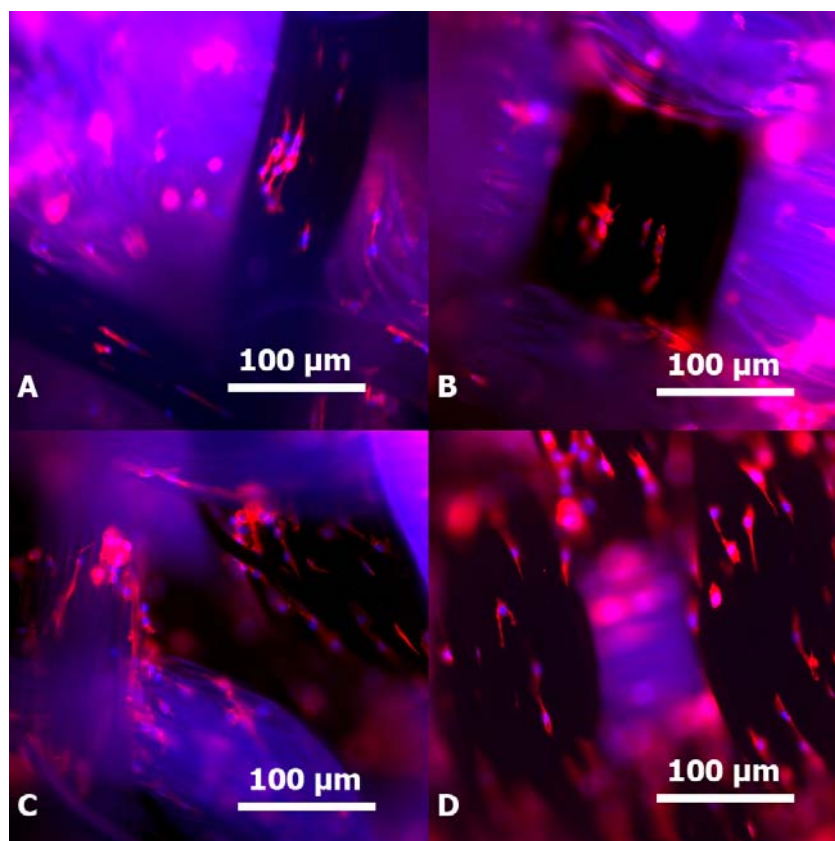


Figure 15: Fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 1 h of adhesion (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). Seeded with the same number of cells than with the film, the textile structures presented a lower local density due to their higher specific surface.

Following one hour of adhesion, the endothelial cells were randomly dispersed onto the textile structures, regardless of textile type. Immunofluorescence micrographs show only a few adhered cells, distanced from one another (Figure 15). Moreover, the cells were dispersed both on the surface and inside the textiles, with most of these located deep inside the yarn between the fibers. After 5 days of proliferation, immunofluorescence micrographs

showed only a few groups of endothelial cells (Figure 16) displaying the typical spindle shape, although oriented along the fibers of the textile yarns.

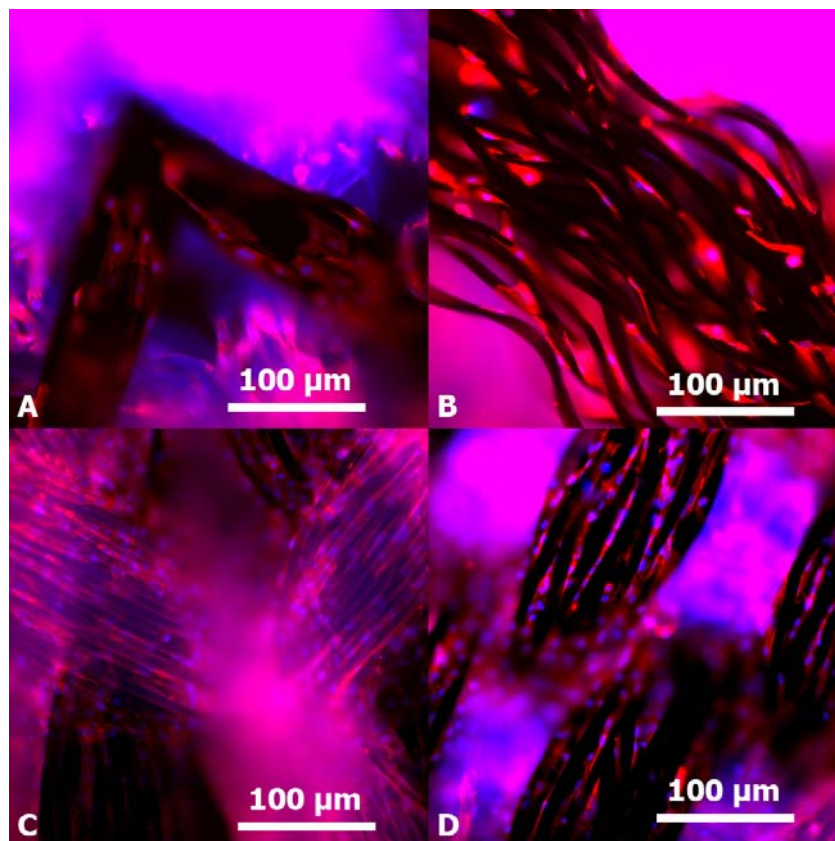


Figure 16: Fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 5 days of proliferation (A: Biomateriali Knitted/velour, B: Biomateriali Woven/velour, C: Cardial Knitted and D: Cardial Woven). The black yarns on each of the textile structures clearly show the limited number of endothelial cells after 5 days of proliferation.

Cells appeared as small, isolated clusters on the flat yarns (Figure 17 A). Texturized yarns offered single fibers; the cells therefore proliferated along isolated fibers, with very few connections between aggregates (Figure 17 B). Following 5 days of proliferation, none of the textile structures displayed a continuous endothelial cell monolayer or typical angiogenic capillary-like structures.

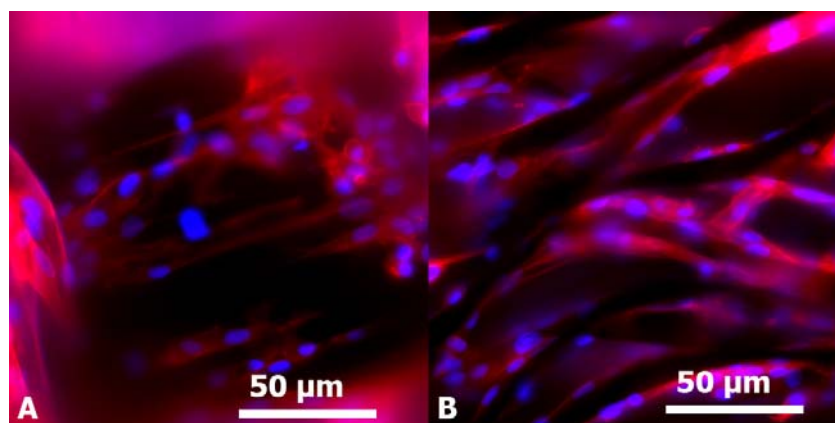


Figure 17: Details of fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 5 days of proliferation on the Biomateriali Woven/velour sample. Slide 7A shows a representative plain woven section of the prosthesis, where few cells have proliferated. Slide 7B shows a representative velour section where endothelial cells have proliferated only along the fibers, with very few connections between fibers.

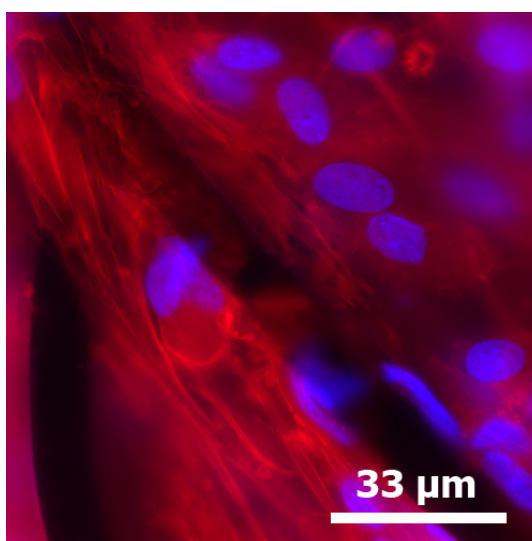


Figure 18: Details of fluorescence micrographs of the textile samples with endothelial cells dyed with Rhodamin-Phalloidin and DAPI, after 15 days of proliferation on the Biomateriali Woven/velour sample.

After 9 days and 15 days of proliferation, endothelial cells continued to proliferate anarchically along the yarns, filling the gaps and increasing the size of the aggregates. After 15 days, every textile structure was almost totally colonized by endothelial cells. While this colonization did cover the textile surface, the endothelial cells were observed as cell aggregates, which is far removed from a typical endothelial cell monolayer (Figure 18).

2.7. Discussion

The choice of textile prostheses is encouraged by their good mechanical resistance properties and their excellent adaptability in surgical procedures. Unfortunately, poor endothelialization is observed with these textile structures. Among the many factors to possibly explain this poor patency rate is the absence of formation of a neoendothelium on the inner surface of the grafts which has been identified as one cause of failure, even after long-term implantation. Structure has a direct influence on cell development, and many studies tend to show that porosity and roughness have a significant impact on the endothelial cells' ability to adhere and proliferate [65, 67, 69, 82]. Interestingly, to our knowledge, endothelial cell behaviour on textile structures has not been investigated in depth. This article therefore provides a better understanding of the influence of various textile structures on endothelial cells. We focus our study on the textile structure, so we deliberately choose to select non coated structures for our tests to begin with.

Interestingly, the PET film and PET yarns used to manufacture the various textile structures investigated here displayed almost identical surface roughness at the nanoscopic level. This important observation therefore enabled us to rule out any possible influence of surface nanoscale structure on cell adhesion and proliferation, such as the interaction with focal cell adhesion points.

Cell adhesion results show a significant difference between endothelial cell behaviour on film and that on textile structures. PET textiles appeared to promote cell adhesion, up to 84% after one hour, whereas PET film enabled only 56% cell adhesion. This could be explained by the huge difference of actual surface between all of the textile structures under study and a flat film (same projected surface for both, but greater actual surface for the textiles over the films). However, considering the finite number of elements in a specific volume of blood (for example, endothelial progenitor cells), the various experiments were performed with an identical number of cells, with no adjustment of this quantity relative to the structural shape of the studied samples. Moreover, the nanoscopic topography of the PET film and fibers was investigated by means of AFM microscopy, as endothelial cells are known to be sensitive to surface roughness [174]. Despite tiny differences in the shape

of the features observed on both the films and the textile fibers, their relative dimensions were almost identical, thereby ruling out any preferential size-dependent cell interaction. Therefore, our data allows us to conclude that PET textiles are better promoters of BAEC adherence when compared to a flat PET film. Fluorescence micrographs showed a random distribution of endothelial cells both on and inside the textiles, with no relationship to the nature of their structure. These initial cell adhesion data probably resulted from the possibility of the BAECs to move within the textile's 3D structure, therefore preventing cells from being washed away and increasing the actual number of measured cells.

The absence of difference between the four types of textile structures, in terms of cell adhesion, may be explained by the static nature of the assays. Indeed, gravitation was the only force in action to disperse cells within the textile structure. In this context, specific textile features (such as the velour) had no real influence and in these circumstances, the cells appeared to behave identically to when they came in contact with the textile fibers. Further studies should be conducted under shear stress conditions.

Proliferation results after 2 and 3 days reveal no significant differences between all of the samples under study. Proliferation remained moderate (approximately 200%) and showed a tendency to be slower on the flat PET film than on the textile structures. After day 3, the flat PET film supported only a minor proliferation until day 9, with an increase at day 15. Despite this, endothelial cells displayed a significantly lower proliferation rate on the flat PET film compared to the BK ($p \leq .05$) at day 5, the BK ($p \leq .01$) and the BW ($p \leq .05$) at day 9, and finally, the BK ($p \leq .05$) at day 15. Our results clearly show that compared to the other grafts, the BK sample promoted the greatest proliferation of endothelial cells after 3 days of proliferation. Indeed, the BK graft produced a significantly higher proliferation rate compared to the BW and CW ($p < .05$) at 5 days, the CK and CW ($p \leq .01$) at 9 days, and the BW and CK ($p \leq .05$) at 15 days of proliferation.

Micrographs of the PET films show that the endothelial cells reached confluence after 48 h of proliferation (despite the fact that no binding agents were used). They even began to create cord-like structures, which are the precursors of capillary-like structures [175]. On the PET films, the cells had the opportunity to express their angiogenic phenotype, which was obviously not observed on the textile structures, as shown by the 2 days and 5 days

proliferation micrographs which showed no confluence of any kind, or any cord-like structure (Figure 16 and Figure 17). The 15-day proliferation micrograph shows that endothelial cells practically colonized the entire textile structure with a chaotic organization which could not be assimilated to an endothelial cell monolayer (Figure 18)

Simon et al. [66] demonstrated that endothelial cells are unable to cross obstacles between 175 and 250 μm on flat PET. Palmaz et al. [176] also showed that endothelial cells follow the topographical geometry of a surface. On textiles, cells encounter gaps and fibers which act as obstacles and/or guides, leading the cells to alter their migration and preventing endothelial cells from expressing typical phenotype with monolayer proliferation. Therefore, despite a better proliferation rate, it can be concluded that the PET textile structures studied here failed to provide an appropriate proliferation environment for BAECs, when compared to the PET films. Indeed, compared to a flat surface, the isolated fibers and yarns in the different textile structures were unsuitable for endothelial cell monolayer growth.

The differences between the 2D (film) and 3D (textile) environments can definitely be taken into account to explain nuances in cell adhesion and proliferation. On one hand, the two-dimensional structure of the flat PET film, coupled with the ability of endothelial cells to rapidly reach confluence, promoted a slow endothelial cell proliferation rate on the film. On the other hand, the large available area of the textile structure enabled continuous endothelial cell proliferation during the 15 days of testing. Indeed, despite having the same projected surface area (19.6 mm^2) as the PET film, the 3D network of the textile yarns and fibers provided a greater actual surface area, resulting in lower cell density on their structure than on their two-dimensional counterpart. Endothelial cells therefore had more room to proliferate, yet needed more time to reach confluence. In fact, two days were needed to obtain a monolayer on the flat PET film, whereas 15 days were barely enough to fill the textile yarns.

The greater cell proliferation observed on the BK textile structure can be explained by the fact that this textile is thicker, more porous, and displays a surface totally covered by a texturized yarn created by the velour effect. All of these elements therefore result in an

actual surface area that is greater than that offered by the other textile structures investigated, which signifies more space for endothelial cell colonization.

Interestingly, compared to the flat film, the surface increase on the textile structures may be at the origin of the host's enhanced response due to high hemodynamic fluctuations and the adsorption of various blood elements, which in turn led to a coagulation cascade and subsequent thrombosis, or hyperplasia [22]. Moreover, PET is known to have an influence on protein adsorption by modifying endothelial cell adhesion receptor expression which subsequently may lead to differentiation [177].

From a purely mechanical standpoint, textile prostheses are very reliable. Unfortunately, they are not adapted to support monolayer endothelial cell development. Non-coated textile prosthesis surfaces must therefore be modified to provide a better environment for endothelial cell growth. This modified environment should enable monolayer proliferation by preventing cells from sinking inside the yarns, while maintaining an appropriate porosity for biological communication. Despite its limitations (no shear stress testing or phenotype expression measurements), this study constitutes a first step in elucidating the interaction between endothelial cells and textile structures

2.8. Conclusion

Our results demonstrate that non-coated PET prosthesis textile structures fail to support typical monolayer endothelial cell proliferation under static culture conditions. Each textile structure investigated in this study (knitted, woven, with or without velour) produced almost identical BAEC adhesion data which were shown to be higher than those of endothelial cells on the flat PET film. Proliferation results indicate that the BK textile structure performed significantly better than the other structures, and that the flat PET film was the least efficient structure to support endothelial cell proliferation. Immunofluorescence data show that despite good proliferation results, none of the textile structures promoted endothelial monolayer development, contrary to the PET flat film. This monolayer formation is therefore surface dependent, and it is concluded that under static conditions *in vitro*, non-coated textile structures of polyester prostheses are incompatible

with monolayer endothelial cell proliferation. In light of these findings, textiles should be redesigned to optimize endothelium development while retaining their excellent mechanical properties, strain resistance, and adaptability during surgical procedures. To overcome the necessity of using biological coatings, synthetic polymer coverings bound either physically or chemically to the PET surface may be a viable solution in the modification of these textiles. Dynamic cell culture experiments are ongoing to study cell behaviour under shear stress conditions to confirm these results.

2.9. Acknowledgments

The authors thank Cardial and Biomateriali for providing prosthesis samples. They also express their gratitude to K. Vallières, N. Rajan, M.-F. Côté, P. Chevallier, and S. Wiederkehr for their technical assistance. This research was supported by NSERC-Canada. S. François acknowledges GEPROVAS for its financial support.

3. Chapitre 2 - Article 2 : Un échafaudage de nanofibres d'acide Polylactique pour cellules endothéliales sur les prothèses vasculaires

A poly(L-lactic acid) nanofibres mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses

Sébastien François^{1,2,3}, Nabil Chakfé^{4, 5}, Bernard Durand^{3,5}, Gaétan Laroche^{1,2 *}

¹Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de Génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux, 1065 avenue de la Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6 ²Centre de Recherche du CHUQ, Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec, Canada, G1L 3L5 ³ Université de Haute Alsace, 68093 Mulhouse cedex France, Laboratoire de Physique et Mécanique Textile UMR CNRS 7189, ⁴Département de Chirurgie Vasculaire, Les Hôpitaux Universitaires of Strasbourg, BP 426 67091 Strasbourg cedex, France, ⁵GEPROVAS, 11 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse cedex France

Published in

Acta Biomaterialia 2009, 5(7): p2418-2428

*Corresponding author: Gaétan Laroche, Ph.D., Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Faculté des sciences et de génie, Pavillon Adrien-Pouliot, 1065 avenue de la Médecine, Université Laval Québec (Québec) Canada G1V 0A6

E-mail address: Gaetan.Laroche@gmn.ulaval.ca

Phone: +418 656-7983 Fax: +418 656-5343

3.1. Avant-propos

Il a été vu en chapitre I que la surface textile brute n'est pas une structure appropriée pour le développement en monocouche des cellules endothéliales. C'est donc pour poursuivre l'objectif de cette thèse, à savoir l'amélioration du potentiel d'endothélialisation des structures textiles, que les travaux se sont orientés vers le développement d'une interface alternative au recouvrement protéinique. Ce deuxième article décrit donc la conception et la mise au point d'une nouvelle technique de fabrication de nanofibres de PLLA. Une fois les paramètres de production maîtrisés, le potentiel d'endothélialisation de ces nanofibres a été évalué *in vitro* par le biais de cultures de cellules endothéliales.

La contribution de chacun des auteurs a été décrite dans la section avant-propos (iv)

3.2. Résumé

L'absence de néoendothélium recouvrant la surface intime des prothèses vasculaires de PET de petit calibre est connue pour être une des causes d'échec implantatoire. Les recouvrements protéiniques utilisés aujourd'hui servent essentiellement à rendre étanches les parois de la prothèse pour éviter la précoagulation de celle-ci, sans toutefois avoir amélioré la néoendothélialisation *in vivo*. Dans cette étude, nous recouvrons la face interne de textiles issus de prothèses vasculaires avec un échafaudage biodégradable synthétique de nanofibres d'acide poly(L-lactique) (PLLA) obtenues par un procédé de filage par jet d'air. Ce procédé a été spécialement conçu pour produire un échafaudage capable de promouvoir une prolifération de cellules endothéliales optimale. En effet, notre procédé innovant permet de rapidement recouvrir les échantillons de textiles avec des nanofibres et nous a permis de déterminer l'influence de la pression d'air, du débit de polymère et de la concentration de celui-ci sur la qualité des nanofibres obtenues. Les hautes pressions d'air ont une incidence significative sur le nombre de ruptures de fibre. De fortes concentrations de polymère augmentent la formation de gouttelettes ainsi que le diamètre moyen des fibres produites. Des cellules endothéliales ont été mises en présence de ces échafaudages de PLLA et l'adhérence des cellules a été testée sur ces structures nanofibrillaires, sur des

échantillons de textile dans PLLA et sur des films de PET en tant que contrôle. La prolifération des cellules endothéliales a été significativement supérieure sur les échantillons de textile recouverts de nanofibres de PLLA et cette prolifération s'est faite en monocouches. Notre approche ouvre donc les portes au développement de prothèses vasculaires textiles synthétiques partiellement résorbables ayant une surface intime permettant le développement en monocouche des cellules endothéliales.

Mots clefs : PLLA, nanofibres, filage par jet d'air, soufflage, pulvérisation, cellules endothéliales, échafaudage, prothèses vasculaires

3.3. Abstract

The absence of neoendothelium covering the intimal surface of small-diameter PET vascular prostheses is known to be one cause of failure following human implantation. Protein coatings used today to seal porous textile structures have not shown evidence of in vivo neoendothelium formation. In this study, we covered the inner wall of textile prostheses with a biodegradable synthetic scaffold made of poly L-lactic acid (PLLA) nanofibres obtained by an air spinning process we developed that produces nanofibres by stretching a solution of polymer with a high-speed compressed air jet. The air spinning was designed to process a scaffold that would support good endothelial cell proliferation. Our innovative process enabled us to very rapidly cover textile samples with PLLA nanofibres to determine the influence of air pressure, polymer solution flow rate, and polymer concentration on fibre quality. High air pressure was shown to induce a significant number of ruptures. High polymer flow rate stimulated the formation of polymer droplets, and the fibre diameter mean increased for the 4% and 7% polymer concentrations. The adherence and proliferation of bovine aortic endothelial cells was assessed to compare prosthesis samples with or without the PLLA nanofibres scaffold and PET film. The PLLA nanofibres displayed a significantly better proliferation rate, and enabled endothelial cells to proliferate in the monolayer. Our novel approach therefore opens the door to the development of partially degradable textile prostheses with a blood/textile interface that supports endothelial cell proliferation.

Keywords: PLLA, nanofibres, air spinning, air spray, blow spinning, endothelial cells, scaffold, vascular prostheses

3.4. Introduction

The gold standard for small-diameter vessel replacement is autologous vessels; however, these are often unavailable or are of poor quality, thereby forcing surgeons to use synthetic vascular prostheses. Expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts are currently the conduits of choice in small-diameter applications[178]. Currently available textile vascular prostheses are made of polyethylene terephthalate (Dacron™ or PET) and are clinically used to replace thoracic, abdominal, or lower limb arteries[178]. They are usually coated with gelatine or collagen to prevent blood loss through the prosthesis wall at the time of implantation. Although their patency rate is acceptable for large-diameter prostheses, it decreases dramatically with smaller diameters [35, 36], which explains why PET textile prostheses are not used under 8 mm of diameter, despite the enormous clinical need for such small arterial substitutes.

The absence of neo-endothelialization with luminal textile prostheses is known as one cause of failure. Good results (partial to total endothelialization) have been observed with coated prostheses in animal models; unfortunately, the same cannot be said with regard to human implantations [46]. Moreover, with the increasing longevity of populations in industrial countries, vascular prostheses will have to last longer and show better patency rates accordingly. In light of this context, we focused on developing a new approach to optimize textile vascular prostheses and to promote neoendothelium development.

Textile vascular prostheses display good mechanical properties to resist cyclic stresses over a long period, and can still be found working after a lengthy implantation [31]. Their textile structure is porous, therefore without the proper coating (collagen, albumin, gelatin, or even pre-clotting), implantation is followed by dramatic blood loss [62] through the prosthesis wall. Moreover, previous investigations by our laboratory have demonstrated that bare textiles do not provide adequate support for endothelial cells to proliferate due to oversized threads [179]. Currently available coating solutions have shown interesting results by

helping to prevent blood loss through the prosthesis wall; however, they are not designed to promote *in vivo* endothelium formation [34]. Studies on explanted prostheses have shown that endothelialization is limited to perianastomotic areas [46]. This may be due, in part, to the fact that collagen or gelatine is composed of fragmented biological tissue that is not specifically created to optimize endothelial cell migration and proliferation.

The approach presented in this study centers on designing a partially biodegradable vascular substitute to increase the patency rate of small-diameter PET textile prostheses. To achieve this goal, we proposed to cover the intimal surface of textile vascular prostheses with a biodegradable scaffold that could be successfully processed through the tubular shape of the prostheses, adhere to the textile and move with it, and be flat enough to enable surface endothelialization. We therefore applied a nanofibre scaffold made of poly(L-lactic) acid (PLLA) onto the PET textile surface. PLLA is a biodegradable polymer that is widely used for biomaterial applications [160-163]. Its *in vivo* degradation is related to PLLA ester link hydrolysis, thereby creating metabolizable lactic acid by-products. This FDA-approved polymer can be dissolved and is thus easily processed.

Electrospinning is a common technique used in laboratories to produce high-quality nanofibres [160, 163]. Although well adapted to the research setting, this approach is both time-consuming and hardly acceptable for industrial scale-up. Moreover, due to the high electric tension involved in the process, electrospinning cannot be used to treat inner wall of tubular shapes (e.g. vascular prostheses) because of the small space between needle and surface. An alternative method consists in obtaining PLLA nanofibre meshes through air spinning. Known also as air spinning or blow spinning, this technique enables us to very rapidly cover surfaces with a non-woven polymer fibre matrix. It basically uses an air jet to stretch a solution of polymer into fibres with a simultaneous vaporisation of solvent.

The goal was to examine the potential of air spinning as a method of producing biomaterial scaffolds. To our knowledge, no other research has addressed this application. We focused our investigation on an air spinning technique, with emphasis on its capability to process solubilized PLLA into nanofibres and its potential to produce a scaffold that would enable good endothelial cell proliferation. Our hypothesis was that endothelial cells would proliferate in a monolayer when encountering a structure whose dimensions were at the

proper scale to retain cells at the surface of the graft. If composed of biodegradable material, this scaffold would slowly yield to the developing biological tissue produced by cells stimulated by the resorption of their scaffold. Moreover, this process would subsequently make room for capillary ingrowth, which would then stimulate transmural neo-endothelialization. Finally, the mechanical properties of the graft are preserved by the remaining PET textile structure within our partially biodegradable vascular graft.

3.5. Materials and methods

3.5.1. Materials

PLLA was obtained from Hycail-Finland Oy (Turku, Finland, $M_n = 126239$, $M_n/M_w = 1.78$) and was solubilized in chloroform (Laboratoire MAT Inc., Montréal, QC, Canada) at concentrations of 1%, 4%, and 7% (w/v). Following total dissolution of the polymer, the solution was injected into a compressed air spray apparatus designed in our laboratory (Figure 19).

Basically, this apparatus consists of a customized atomizer plugged into compressed medical-grade air and filled with PLLA solution through a glass syringe (Becton-Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with a stainless steel needle. The air spray apparatus enabled the atomizer to translate vertically for air spinning distance adjustments. A computer-controlled carriage moved the sample under the spray. PLLA was injected through the atomizer (Spraying Systems, Wheaton, IL, USA) with a computerized syringe pump (74900-00, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Polymer solution was ejected through the needle and stretched by high speed air flow. During this stretching process, solvent was vaporized (with a simultaneous increase of the PLLA solution's viscosity) and polymer droplets were elongated to form fibres under air flow stress. Air pressure and polymer flow were precisely monitored to avoid fibre fragmentation and uncontrolled droplet production.

Samples were taken from non-crimped PET textile tubes (semi-finished Dialine II prostheses, C. R. BARD/Cardial, Saint-Etienne, France), hereto referred to as Cardial Knitted (CK). Polyethylene terephthalate (PET) films (Goodfellow, Oakdale, PA USA)

were used as controls. The PLLA nanofibre samples collected on the CK were named CK/PLLA. Each sample was mounted on our specially designed support frame which consisted of a PTFE rod holding a PTFE ring for endothelial cell culture.

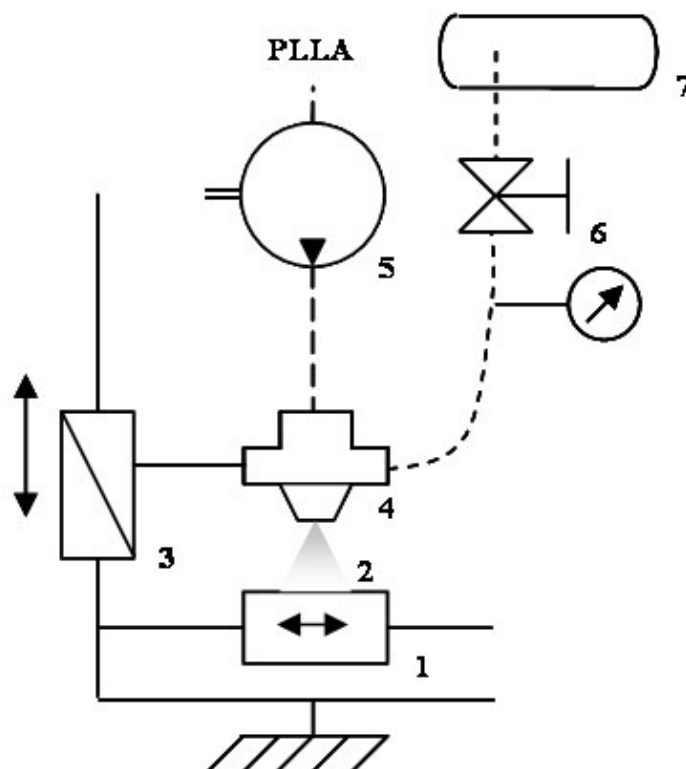


Figure 19: Schematical overview of the air spinning system. (1) Sample holder (horizontal movement), (2) PLLA fibre air spinning cone, (3) Vertical shifting, (4) Atomizer feed with compressed air and PLLA solution, (5) PLLA injection pump (syringe pump), (6) Compressed air vane and manometer, and (7) Compressed air tank.

Cell cultures were performed using bovine aortic endothelial cells (BAECs). The culture medium was a mixture of 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic (AA) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) diluted in Type I water (Nanopure, Barnstead, Dubuque, IA, USA) and Trypsin-EDTA (Trypsin) was also used for adherence testing, while cell viability was ascertained by means of Tripian Blue staining (TPS). Fluorescence emissions were recorded using a solution of 20% resazurin sodium salt mixed with 80% DMEM.

The cells were fixed with formaldehyde solution (3.7% or 1% solution in PBS from 37% formaldehyde) and stored in 1 mL of PBS containing 20 μ L of sodium azide (10% solution in water). The cells were then permeabilized in a solution of 0.1% Triton-X-100 (Triton) in PBS, dipped in 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, and labelled with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (1:500) (rhodamine-phalloidin) and DAPI (1:2000) in 3% BSA for fluorescence assays. Fluorescent mounting medium (S3023, Dako, Glostrup, Denmark) was used for each optical micrograph.

3.5.2. Methods

3.5.2.1. Experimental protocol

We investigated three PLLA solution concentrations (1%, 4%, and 7% w/v) at air pressure values of 0.5×10^5 , 1.5×10^5 , and 2.5×10^5 Pa and with PLLA flow rates of 10, 30, and 50 mL/h. Samples of sprayed PLLA were collected on glass slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for structural analysis, while other samples were projected onto CK textile prostheses for cell cultures and on PET film for XPS and FTIR analyses. No differences were observed between the fibres sprayed on glass slides and those sprayed on PET film. Prior to analysis or cell culture, the samples were kept for 24 h at room temperature under vacuum to remove any traces of solvent. Samples of PET sprayed with PLLA nanofibres were kept under deionized water added with 0.01% of sodium azide (10% solution in water, 19993-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in an incubator at 37°C containing 5% CO₂ for up to 20 days. Samples were dry under medical vacuum for 24h at 37°C before analysis.

3.5.2.2. Chemical analyses

Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy was used to characterize the PLLA sprayed onto the PET. The PLLA fibres were probed in various areas using a Nicolet Magna 550-FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and a germanium-coated KBr beam splitter (Thermo Nicolet, Madison, WI, USA). Spectra were recorded in the attenuated total reflectance mode (ATR) and the surface characterization was targeted by means of a Split Pea attachment equipped with a 3 mm-diameter hemispherical silicon crystal (Harrick Co., Ossining, NY, USA) to

collect 100 scans that were subsequently coadded, apodized by means of the Happ-Genzel function, and Fourier-transformed to yield a 4 cm^{-1} spectral resolution.

3.5.2.3. Cell culture tests

The cell culture protocol is described elsewhere [179]. Briefly, each sample (CK, CK/PLLA, and PET) was mounted on our original PTFE holding support frame. BAECs were seeded at 42500 cells/cm^2 . Cultures were performed in triplicate for each structure to measure cell adhesion after 1 h and cell proliferation after 2, 3, 5, 9, and 15 days. Adherence tests were done by evaluating the number of cells remaining on the surface after two PBS washes. Data were thus obtained by recording the fluorescence emission level of resorufin resulting from the metabolization of resazurin by the cells, and by comparing the fluorescence level with the calibration curves. A resazurin assay rendered a non-destructive measurement which enabled us to measure cellular activity within the 3D scaffolds. Cell proliferation experiments were conducted using an incubator at 37°C containing $5\%\text{ CO}_2$. Culture medium was replaced every three days. We also used the resazurin assay to measure cell proliferation, with new calibration curves determined prior to each experiment. The proliferation results were normalized to the initial number of adhered cells. Each experiment and each cell count was conducted three times.

3.5.2.4. Imaging

Cell immunofluorescence micrographs were taken with an Eclipse E800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CCD Hamamatsu ORCA ER cooled (-20°C) digital camera (Photonics Management Corp., Bridgewater, NJ, USA) at different magnifications (100 to 600X). Image analyses were performed using Simple PCI AIC software (Compix Inc., Imaging Systems, Sewickley, PA, USA). For the SEM micrographs, the cells were dehydrated by successive dipping in baths containing increasing concentrations (50 to 100%) of ethanol solution. Dry samples were glued on a stub and sputter-coated with gold. Observations were made using either a Jeol JSM35CF (Soquelec, Montréal, QC, Canada), a Jeol JSM-840A (Soquelec), or a Philips SEM 525 (Eindhoven, Netherlands) scanning electron microscope, at a 15 kV accelerating voltage.

Fibre diameter were measured and counted on SEM micrograph parameters by means of Simple PCI AIC image analysis software (Compix Inc.) to determine optimal air spinning parameters. Fibres were considered ruptured when two segments were visible between 100 nm and a few microns apart.

Tapping mode atomic force microscopy (AFM) of the PLLA fibres sprayed onto PET film was performed under ambient conditions using a Dimension 3100 atomic force microscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA). Surface images were analyzed using WSxM 4.0 Develop 11.4 software [173].

3.5.2.5. Water permeability

We assessed the water permeability of a 1 cm² sample surface under a 120 mm Hg constant pressure by measuring the amount of water passing through this sample during 1 minute. Both CK and CK PLLA were tested using this method.

3.5.3. Statistical analyses

A *t* test was used to compare water permeability as well as the fibre diameter means of the 4% and the 7% PLLA sprayed fibres collected on glass slides and measured by SEM. Cell adhesion and proliferation analyses were performed in triplicate for several independent experiments following identical protocols, and all of the recorded data were used for statistical analysis. The cell adhesion data were expressed as the estimated number of adhering cells (based on the respective experiment regressions of the calibration curves), while the proliferation results were normalized according to the initial number of adhering cells. Analyses of variance (ANOVA and Bonferroni) were performed where assumptions of normality and variance homogeneity were met (visual inspection of data distribution, Shapiro-Wilk normality test, and Levene homogeneity of variance test, respectively); otherwise, non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) were done to determine any significant differences between the groups (CK, CK/PLLA, and PET film structure) in terms of the various measurements (adherence and proliferation at 2, 3, 5, 9, and 15 days normalized with respect to cell adherence). Statistical analyses were conducted on these data using SPSS (version 13.0, SPPS Inc., Chicago, IL, USA).

3.6. Results

3.6.1. PLLA air spinning

Injection of the polymer through our air spinning system created an ejection cone of PLLA nanofibres collected on samples with a computer-controlled carriage that translated several times through the ejection cone. The entire process thus provided complete coverage of each sample in less than one minute.

3.6.2. SEM observations

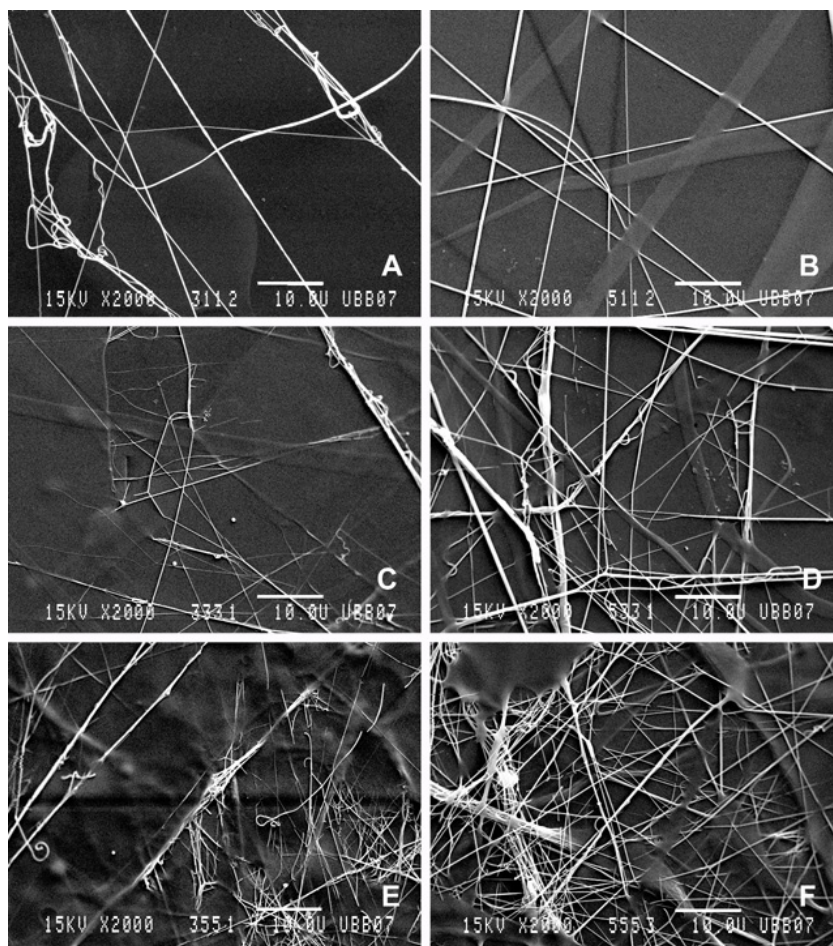


Figure 20: SEM images of PLLA fibres at various experimental air spinning parameters: 0.5×10^5 Pa and 10 mL/h for 4% PLLA (A) and 7% PLLA (B), 1.5×10^5 Pa and 30 mL/h for 4% PLLA (C) and 7% PLLA (D), 2.5×10^5 Pa and 50 mL/h for 4% PLLA (E) and 7% PLLA (F).

Our results confirm that the spray technique enabled us to obtain fibres ($0.2 \mu\text{m} < \varnothing < 0.4 \mu\text{m}$) with random orientations. No fibres were observed with 1% PLLA w/v sprayed onto a glass slide. PLLA at 4% and 7% facilitated the development of fibrous structures (Figure 20).

To determine the ideal air spinning conditions, we performed image analyses on SEM micrographs at 2000X magnification. Fibre diameter was measured with image analysis software. In each of the experimental conditions investigated, the PLLA fibres displayed an average diameter distribution ranging between $0.21 \pm 0.11 \mu\text{m}$ and $0.39 \pm 0.32 \mu\text{m}$. Four percent PLLA solution enabled the formation of smaller-diameter fibres ($0.258 \pm 0.146 \mu\text{m}$), compared to the 7% PLLA solution ($0.328 \pm 0.238 \mu\text{m}$) ($F(1.7500) = 197.910$, $p < .001$). A count of the ruptures was done to determine which concentration minimized fibre fractures. Figure 21 shows that low air pressure ($0.5 \times 10^5 \text{ Pa}$) and low flow rate (10 mL/h) decreased the number of fibre ruptures.

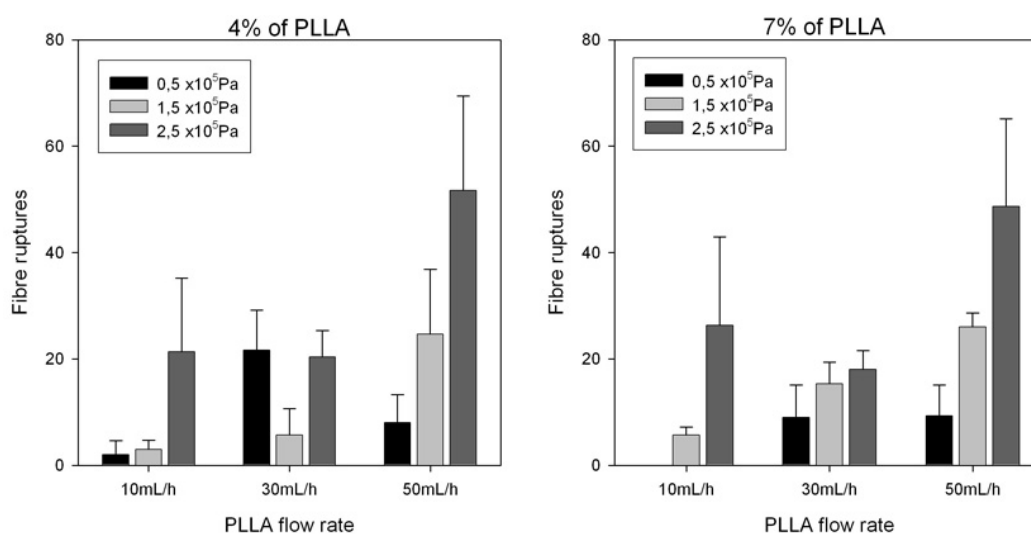


Figure 21: Effect of air spinning pressure and polymer flow rate on the number of PLLA fibre ruptures (average \pm SD) for 4% and 7% w/v polymer concentrations.

PLLA fibres were sprayed onto CK textile samples. In less than one minute, each textile structure was totally covered by PLLA fibres, creating a scaffold dense enough to retain cells on the surface of the textile (Figure 22).

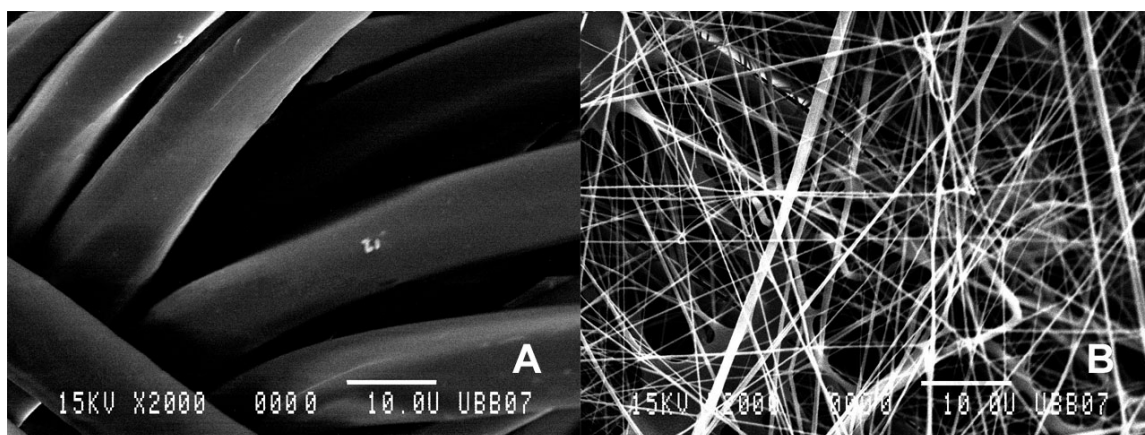


Figure 22: SEM micrographs (2000X) of CK textile samples without PLLA fibres (A), and covered with PLLA fibres (B) obtained from a 7% PLLA solution sprayed at a flow rate of 10 mL/h and a pressure of 0.5×10^5 Pa.

3.6.3. AFM observations

The PLLA fibres displayed nanofeatures, as observed with AFM imaging. Small depressions, seen elongating in the direction of the fibres (Figure 23), were probably related to the solvent evaporation traces during the stretching process of these fibres.

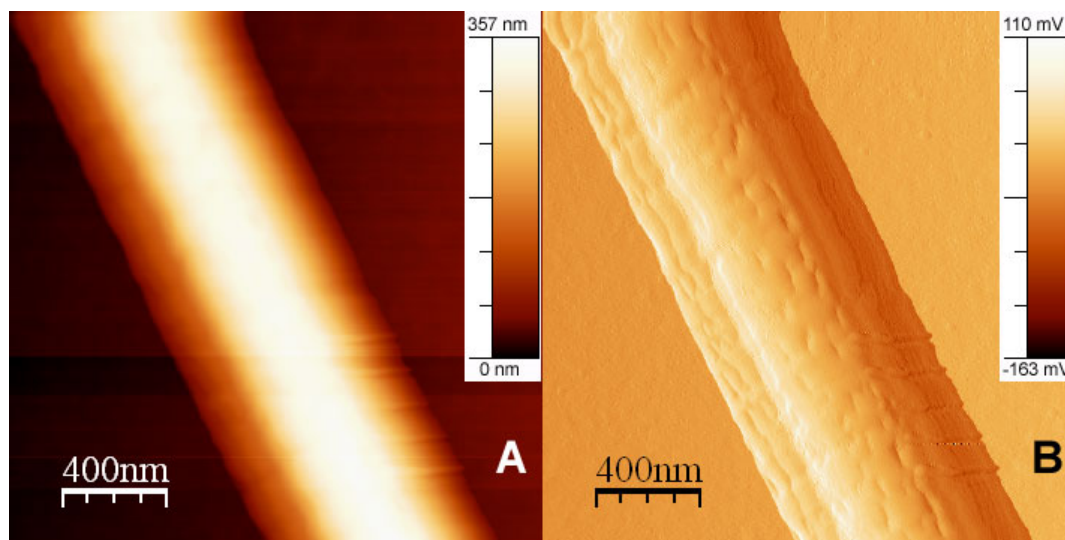


Figure 23: AFM tapping mode images ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) of a PLLA fibre obtained by air spinning, topography data (A) and amplitude data (B).

3.6.4. Chemical analyses

XPS and FTIR analyses of PLLA fibres sprayed onto either glass slides or PET films confirmed the absence of inorganic contamination. FTIR and XPS analysis assessed the absence of solvent traces in our PLLA fibres (results not shown).

FTIR analyses show no evidence of ester links hydrolysis after aging, even after 20 days in water (Figure 24).

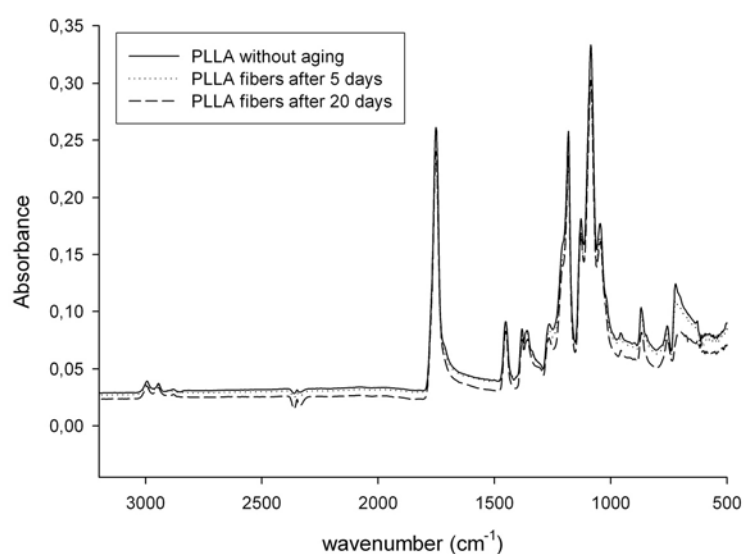


Figure 24: FTIR spectrum of PLLA fibres, without aging, after 5 and 20 days under water.

3.6.5. Water permeability

The CK textile sample, a semi-finished knitted structure without protein coating, showed a higher permeability average (\pm SD) than did the CK PLLA ($p < .001$): $1.26 \cdot 10^3 \pm 0.13 \cdot 10^3$ mL/min.cm², ($n = 10$) and $8.2 \cdot 10^2 \pm 0.9 \cdot 10^2$ mL/min.cm² ($n = 7$), respectively.

3.6.6. Cell adhesion tests

Cell adhesion results after one hour were expressed as the percentage of adhered cells compared to the initial number of cells seeded on the sample surfaces (85,000 on each sample surface).

The endothelial cells adhered better on the bare textile samples than on the other structures under study ($85 \pm 4\%$, $64 \pm 8\%$ and $58 \pm 7\%$ as mean \pm SE for CK, PET and CK/PLLA respectively). Statistical analyses revealed a significant group effect on the adherence variable between all of the samples following a one-hour adherence test ($F(2, 33) = 4.801$, $p < .05$). Bonferroni post hoc analyses showed that adherence was significantly higher on the CK than on the CK/PLLA ($p < .05$) surfaces. No other significant results were found.

3.6.7. Cell proliferation tests

Figure 25 illustrates the proliferation rate according to the raw proliferation data. After 2 days of proliferation, our statistical analysis revealed a significant group effect on the proliferation variable ($F(3, 60) = 22.757$, $p < .001$). Bonferroni post hoc analyses revealed that proliferation was significantly lower on the PET film than on the other two structures (CK, $p < .001$; CK/PLLA, $p < .001$). Despite positive normality results, homogeneity of variance was not met for 3 days and 5 days of proliferation. The values were therefore compared using non-parametric tests. After 3 days, statistical analyses revealed a significant group effect on the proliferation variable between all of the samples ($\chi^2 [df = 2] = 11.368$, $p < .05$). Mann-Whitney analyses indicated a significantly lower proliferation on the PET than on the CK ($p < .005$) and the CK/PLLA ($p < .005$). Similar results were found after 5 days of proliferation, with a significant group effect between all of the samples ($\chi^2 [df = 2] = 18.698$, $p < .001$), with significantly lower results for PET than for CK ($p < .001$) and CK/PLLA ($p < .001$). Another group effect was detected by Anova at 9 days of proliferation ($F(2, 24) = 12.357$, $p < .001$), and was later confirmed by Bonferroni post hoc analysis, showing that the CK/PLLA performed significantly better than did the CK ($p < .05$) and the PET ($p < .001$) surfaces. No other significant differences were found.

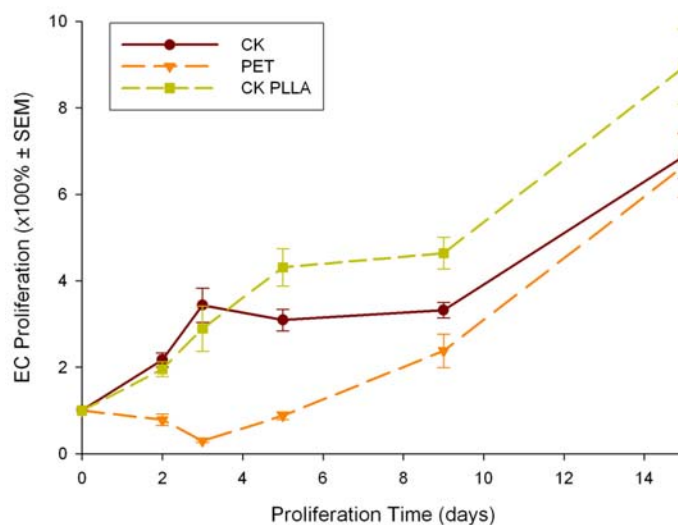


Figure 25: Endothelial cell adhesion and proliferation data on PET (control PET film), CK (Cardial knitted), and CK/PLLA (Cardial Knitted with sprayed PLLA fibres)

3.6.8. SEM cell observations

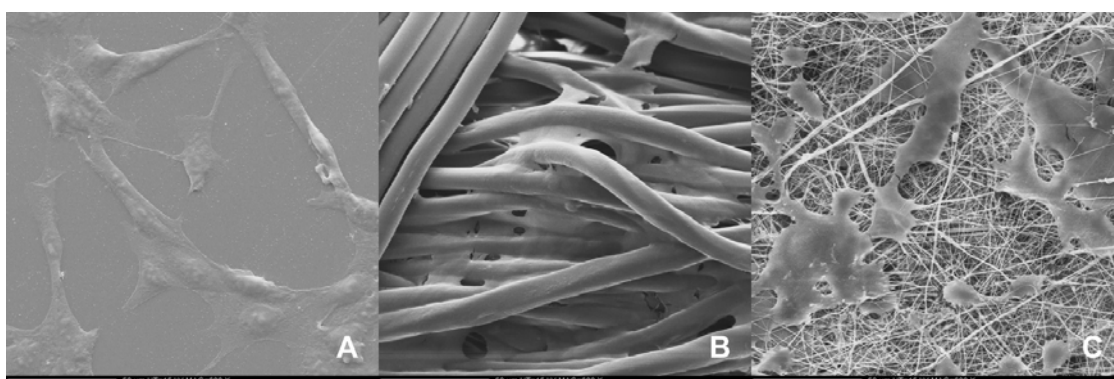


Figure 26: SEM micrographs (600X) of BAECs fixed on samples after 1 hour of adhesion. From top to bottom: (1) Polyethylene terephthalate film, (2) Cardial Knitted textile prosthesis, and (3) Cardial Knitted coated with PLLA nanofibres.

SEM observations of the BAECs after one hour of adhesion revealed different behaviors (Figure 26) for the three types of surfaces under investigation. On the flat-surface PET films, the endothelial cells quickly began to flatten, generally spreading in one or two directions toward other cells (Figure 26 A). On the CK textile surface, the cells spread along the fibres, with 3D connections to other cells and fibres (Figure 26 B). The topology of the textile structure induced a morphological state in the endothelial cells which was

quite different from the usual spindle or cobblestone shape. The PLLA-sprayed CK surface provided a suitable 2D environment for the ECs to flatten and to spread (Figure 26 C). Indeed, the cells appeared to anchor themselves to the interconnected PLLA fibres, spreading easily on the surface of the PLLA fibre net scaffold.

3.6.9. Fluorescence observations

White PET textile fibres created a halo of brightness under fluorescent microscopy; pictures were therefore been taken on the black yarn guideline of the textile prostheses. Cells were labelled with DAPI (nucleus in blue) and rhodamine-phalloidin (actin filaments in red) after 48 h of proliferation.

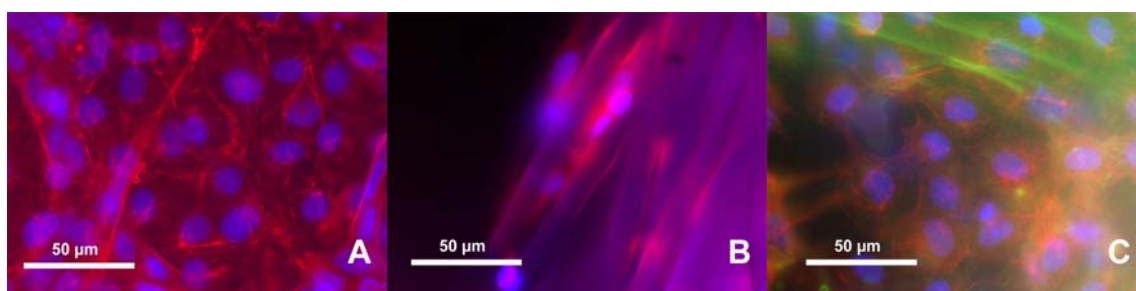


Figure 27: *Fluorescence microscopy of endothelial cells labelled with DAPI (nuclei in blue) and rhodamine-phalloidin (actin filaments in red) after 48 h of proliferation (600X). (1) BAECs showing a typical cobblestone shape and cord-like structure on the polyethylene terephthalate film. (2) BAECs proliferating along fibres on the raw Cardial Knitted textile with no monolayer formation. (3) On Cardial Knitted textile sample coated with PLLA nanofibres, BAECs began to proliferate in a neoendothelium-like shape; green highlights the PLLA fibres and the PET textiles fibres (upper right).*

Endothelial cells observed on a flat PET film after 48 h of proliferation displayed the typical cobblestone shape in a monolayer (Figure 27 A), and even began to create cord-like structures, a precursor of angiogenesis[175], when confluence was reached.

Contrary to that observed on the PET film, the endothelial cells were dispersed within the CK textile structure, with no evidence of neoendothelium monolayer formation (Figure 27 B). The cells proliferated along the textile's fibres, creating only aggregates after a few days of proliferation.

The PLLA-sprayed CK textile surface provided a continuous surface scaffold that enabled typical cobblestone-shaped endothelial cells to quickly cover the sample in a monolayer (Figure 27 C). Rhodamine-phalloidin-labelled actin filaments, in red, clearly show focal contacts between cells as well as with the PLLA fibres.

3.7. Discussion

The poor patency rate of small-diameter PET textile prostheses prevents their successful use in an increasing number of surgical procedures involving small vessels. Among many factors leading to prosthesis failure may be the absence of neo-endothelialization on the inner surface of the implant which leads to occlusion. Bare textiles cannot support endothelial cell proliferation in a monolayer[179], and standard coatings, such as collagen, albumin, and gelatin have not been shown to support neo-endothelialization[34].

We proposed an innovative approach by covering vascular prostheses with a synthetic material by means of an air spinning process with the goal of developing a partially biodegradable vascular substitute. We chose PLLA, a well-known biodegradable polymer, to create a scaffold able to retain endothelial cells on the inner surface of vascular textile prostheses and to support monolayer cell proliferation.

Our choice of a biodegradable polymer is driven by the fact that through its own degradation, this PLLA scaffold will be replaced with biological media. However, PLLA degradation occurs through ester link hydrolysis which creates break-down products which in turn increases local environment acidity [165]. Nevertheless, the dynamic conditions of this novel vascular environment will wash out these break-down products and reduce the negative effects of PLLA degradation. The goal is therefore to promote the re-colonization of the lumen with a natural biological structure and to maintain the mechanical characteristics of the remaining PET textile fibres that are isolated from the blood by the neo-endothelium barrier.

Addressing the tubular shape of the prostheses, we designed our ultra-fast air spinning process to cover the inner surface of the textile structure with PLLA fibres and to be

adaptable to multiple configurations for either plane or tubular air spinning. The apparatus described in this publication was initially designed for planar surfaces.

Our results show that it was possible to obtain PLLA fibres with a mean diameter of approximately 300 nm using an air spinning system. An air spray accelerated the polymer ejected through a needle, stretching it to form nanostructured fibres (Figure 23). Several factors having an impact on PLLA fibre quality were investigated, including air pressure, polymer solution flow rate, and polymer concentration. High air pressure induced many fibre ruptures (Figure 21), with the resulting scaffolds consisting mainly of fibre fragments. High polymer flow rate stimulated the formation of polymer droplets that smashed the fibrous scaffold. This undesirable effect was alleviated by maintaining the polymer at the lower selected flow rate values (i.e. 10 mL/min). Fibre diameter was influenced by polymer concentration. Indeed, no fibres were obtained with 1% of PLLA diluted in chloroform, and the mean fibre diameter increased from $0.258 \pm 0.146 \mu\text{m}$ to $0.328 \pm 0.238 \mu\text{m}$ ($p < .001$) for the 4% and 7% polymer concentrations, respectively. A concentration higher than 7% resulted in jamming problems with the air spinning system. Surprisingly, polymer flow rate and air pressure did not influence fibre diameter and no obvious trends related to fibre diameter were observed while varying these parameters (Figure 21). We therefore concluded that fibre formation under air flow was related to other parameters, such as polymer concentration, needle diameter, or polymer solution surface tension.

PLLA fibres sprayed onto the textile surface significantly reduced the water permeability compared to the bare textile ($8.2 \cdot 10^2 \pm 0.9 \cdot 10^2 \text{ mL/min.cm}^2$ ($n = 7$) and $1.26 \cdot 10^3 \pm 0.13 \cdot 10^3 \text{ mL/min.cm}^2$ ($n = 10$) as the average \pm SD for CK PLLA and CK, respectively). Bearing in mind that this nanofibre mesh is only a few microns thick, these results confirm that air-spun PLLA nanofibres are able to reduce water permeability of bare textile. A thicker mesh would probably lower water permeability to acceptable levels for clinical use.

No residual solvent was detected in the PLLA-pulverized samples after 24 h under vacuum at room temperature, under the limits of detection of XPS and FTIR.

Endothelial cell cultures were performed to evaluate the cytocompatibility of the various investigated samples and to determine the influence, if any, of PLLA on endothelial cell behaviour. A one-hour adhesion test was conducted, followed by proliferation assays for 2, 3, 5, 9, and 15 days. Our results show that a bare textile structure (such as CK) promoted good cell adhesion. This behaviour has already been demonstrated[179], and was attributed to the 3D aspect of the textile matrix which enabled the endothelial cells to sink deep inside the yarns and be protected from adhesion test washing. Because the flat surface of the PET and the CK/PLLA failed to provide this kind of protection, the endothelial cells recorded lower adhesion results. Although not statistically significant, the lower cell adhesion initially observed on the CK PLLA, compared to that on the PET, could be attributed to the anchoring behaviour of endothelial cells. By probing surfaces with pseudopodia, endothelial cells may have a better chance of adhering to continuous PET than to a porous PLLA scaffold. Nevertheless, surface chemistry differences between the PET and the PLLA cannot be ruled out in explaining these differences in adhesion.

The proliferation results confirm the importance of the structural effect on endothelial cell behaviour. Indeed, after 9 days of proliferation, the PET film's smooth, flat surface recorded proliferation results that were statistically lower than those obtained with the CK and CK/PLLA samples. PLLA fibres sprayed onto the CK textile enabled good and continuous endothelial cell proliferation. Up to the third day of proliferation, the cells cultured on both the CK and the CK/PLLA surfaces exhibited similar behaviours. However, by day 5, proliferation did slow down on the CK sample. This behaviour may be explained by cell clustering within the textile matrix and subsequent decreased amplification of the cell colony. On the other hand, the PLLA-sprayed CK sample showed a continuous proliferation rate, with better results over the other groups after five days of proliferation. Endothelial cells are known to be sensitive to topological features on structured surfaces [65, 66, 174, 180]; our cell proliferation experiments confirm this behaviour, as a better proliferation rate was obtained on the PLLA fibres than on either the smooth Flat PET surface or the textile matrix. Endothelial cells are also known to proliferate better on nanofeatured surfaces [99, 101]. Our AFM results show nanofeatures on the PLLA fibres which could also participate in enhancing cell proliferation. As

aforementioned, the different surface chemistries of both PET and PLLA cannot be totally ignored to explain these significant differences in cell proliferation.

Morphological analyses of endothelial cells under SEM after one hour of adhesion showed that the endothelial cells flattened on flat surfaces (PET and CK/PLLA, Figure 26 A and Figure 26 C, respectively), whereas in the CK samples, the BAECs spread along the textile fibres to match its 3D conformation (Figure 26 B). The cells displayed pseudopodia probing the PET surface, a phenomenon not observed in the other samples under study. Despite the specific care taken during the fixation and preparation for SEM analysis, a possible shrinkage of the cell membrane due to the dehydration process cannot be ruled out.

Fluorescence micrographs also confirm the effect of the surface structure on cell behaviour. The endothelial cells flattened and spread easily on the flat surfaces (Figure 27 A and B). Consequently, this condition was necessary to promote neoendothelium development, and the PLLA fibres sprayed onto the textile provided just such a surface.

Cell cultures were conducted with BAECs. Additional experiments should be performed on human endothelial cells (i.e. HUVECs) to confirm these results.

Our approach in developing a novel interface between textile prostheses and endothelial cells is driven by the poor patency rate of small-diameter PET models. Common biological coatings do not influence endothelialization, as their functions are limited to reducing the textile's porosity. In our innovative method, we replaced these biological coatings with a synthetic interface.

We chose PLLA because of its biocompatibility and its current clinical use. We processed this polymer in our air spinning system to rapidly produce nanofibres. This innovative approach proved successfully covered a textile with a PLLA fibre interface to act as a scaffold for endothelial cell monolayer development. By preventing the textile matrix from filling with protein coating, PLLA nanofibres sprayed onto the graft's intimal surface will also help maintain the transmural porosity continuity of PET prostheses. This transmural porosity, primarily observed in knitted as opposed to woven structures, is a key parameter that allows transmural capillary ingrowth [46]. By the time this capillary reaches the

intimal surface, the biodegradation of the PLLA nanofibre mesh will have occurred. Further studies should nevertheless be performed to evaluate the thrombotic response of the new surface and the potential capability of PLLA nanofibre mesh to inhibit fibrin invasion of a PET textile matrix at the time of implantation. Clinically, this natural fibrin deposit forms a thick, compact layer both on and through the PET graft, thereby inhibiting transmural endothelialization as well as any capillary ingrowth through the textile. By blocking this initial fibrin deposition on the graft's luminal surface, the transmural route would then be open to capillary ingrowth. This, in turn, would enable the invasion of the intimal fibrin layer, formed following PLLA degradation, therefore creating a gate through neo-endothelialization.

This research therefore constitutes a breakthrough in the development of vascular prostheses by proposing a very rapid and versatile process that produces an efficient interface to optimize cell behaviour. Improvements to this novel air spinning system are currently ongoing to adapt the process to the tubular shape of PET vascular prostheses. ePTFE prostheses may also benefit from air spinning, but because of the high hydrophobic properties of ePTFE, a surface treatment would be required prior to PLLA deposition[181]. Further research will characterize the textile matrix in terms of the mechanical anchorage of PLLA fibres, its permeability, its resistance to delamination under flow, and its degradation kinetics.

3.8. Conclusion

Our results show that air spinning can be used to obtain PLLA fibres ranging from 200 to 400 nanometres in diameter. Our system used an air flow to eject PLLA solution in the form of fibres. These fibres were sprayed onto textile prosthesis samples, rapidly covering the latter in less than one minute, which is much faster than with other available methods such as electrospinning. Polymer concentration appeared to exert the most significant influence in controlling fibre diameter. Air pressure and polymer flow rate influenced the quality of the resulting scaffold, as an appropriate control of these parameters enabled us to minimize fibre fractures. PLLA nanofibre mesh reduces the water permeability of bare textile. Cell cultures results prove that compared to the flat PET film and bare CK textile,

the PLLA fibre interface on the CK textiles was superior in supporting endothelial cell proliferation. These highly significant findings will thus lead to promising innovations in the area of partially biodegradable vascular textile prostheses, with the arrival of new synthetic scaffolds that are sprayed onto textile matrices to optimize endothelial cell proliferation. This process also shows potential in the design of scaffolds for other kinds of tissue engineering applications.

3.9. Acknowledgements

The authors thank Cardial for providing the prosthesis samples. This research was supported by NSERC-Canada. Sébastien François acknowledges the Groupe Européen de Recherche sur les Prothèses appliquées à la Chirurgie Vasculaire (GEPROVAS), A. V. Wallach and the L. Dreyfus Foundation (Mulhouse, France), and the Alsace Region (France) for their financial support. Funding provided by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ) and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) is also greatly appreciated.

4. Chapitre 3 - Article 3 : Caractérisation d'un réseau de nanofibres d'acide poly(L-lactique) produit par filage par jet d'air

Characterization of an air-spun poly(L-lactic acid) nanofibre mesh

Sébastien François^{1,2}, Christian Sarra-Bournet¹, Antoine Jaffre¹, Nabil Chakfé³,
Bernard Durand⁴, Gaétan Laroche^{1,2*}

¹Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche sur les matériaux avancés,
Département de Génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, 1065 avenue de la
médecine, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6, ²Centre de recherche du CHUQ,
Axe Métabolisme, Santé Vasculaire et Rénale, Hôpital Saint-François d'Assise, 10 rue de
l'Espinay, Québec, Canada G1L 3L5, Canada, ³Department of Vascular Surgery, Les
Hôpitaux Universitaires of Strasbourg, BP 426 67091 Strasbourg cedex, France,
⁴GEPROVAS, 11 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse cedex France

In press in Journal of Biomedical Research Part B, Jan 2010

*Corresponding author: Gaétan Laroche, PhD, Département de génie des mines, de la
métallurgie et des matériaux, Faculté des sciences et de génie, Pavillon Adrien-Pouliot

Université Laval Québec (Québec) Canada G1K 7P4

E-mail address: Gaetan.Laroche@gmn.ulaval.ca

4.1. Avant propos

Le chapitre I établit que le textile n'est pas une structure propice au bon développement des cellules endothéliales. Le chapitre II démontre quant à lui qu'un réseau de nanofibres d'acide polylactique permet la formation d'une monocouche de cellules endothéliales. Ce troisième article montre qu'il est possible d'utiliser la technique de filage par jet d'air afin de recouvrir la face interne d'une prothèse textile et cherche également à caractériser le substrat obtenu.

La contribution de chacun des auteurs est présentée en section avant propos (iv)

4.2. Résumé

Les polymères biodégradables comme l'acide poly(L-Lactique) peuvent être utilisés pour le remplacement des recouvrements protéiniques habituellement utilisés pour sceller les prothèses vasculaires afin de promouvoir l'endothélialisation. Des travaux précédents ont démontré qu'une interface de nanofibres de PLLA permettait une bonne prolifération des cellules endothéliales. Ce manuscrit décrit une nouvelle technique pour produire des nanofibres par filage par jet d'air à l'intérieur d'une prothèse vasculaire de forme tubulaire et cherche à caractériser les nanofibres obtenues. La stabilité du PLLA avant et après filage a été testée par chromatographie d'exclusion stérique (GPC). Les analyses thermiques ont été faites par analyse enthalpique différentielle (DSC) et analyse mécanique dynamique (DMA) sur des nanofibres obtenues à partir d'une solution à 4% et à 7% (w/v). Afin d'optimiser l'adhérence des nanofibres de PLLA sur le polyéthylène terephthalate (PET), un film de PET a été traité par plasma à pression atmosphérique à barrière diélectrique (APDBD) sous air ou sous azote. L'adhérence a été évaluée grâce à un test de pelage.

Le filage par jet d'air induit une réduction de la masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) pour une solution à 7% mais pas pour une solution à 4%. Les nanofibres sont plus cristallines et plus stables quand elles sont produites depuis la solution à 4%. Le chloroforme utilisé comme solvant reste piégé dans les nanofibres de PLLA et agit en tant que plastifiant, cependant un cycle de chauffage à 80°C suffit à le supprimer. Le traitement

APDBD modifie chimiquement le film ou le textile de PET de manière identique, de façon stable et permet d'améliorer significativement l'adhérence des nanofibres de PLLA. De plus, une meilleure adhésion est obtenue quand le traitement est fait sous atmosphère d'azote. Ces travaux démontrent donc qu'il est possible de recouvrir la surface interne d'une prothèse vasculaire de forme tubulaire avec des nanofibres de PLLA et apporte une meilleure compréhension du processus de filage par jet d'air ainsi qu'une solution nouvelle pour la réalisation d'applications biomédicales.

Mots clefs: PLLA, nanofibres, filage par jet d'air, DSC, DMA, traitement plasma à pression atmosphérique, adhérence, prothèses vasculaires textiles

4.3. Abstract

It was previously showed that PLLA nanofibre mesh promoted good endothelial cell proliferation. A new technique was developed to produce nanofibres by air jet spinning inside the tubular shape of vascular prostheses and to characterize this nanofibre mesh. Polymer macromolecule stability was assessed by gel permeation chromatography. Thermal analyses were conducted with differential scanning calorimetry and dynamic mechanical analysis on PLLA nanofibres obtained with 4% and 7% solutions (w/v) in chloroform. Polyethylene terephthalate (PET) was also treated with atmospheric pressure dielectric barrier discharge under air or nitrogen atmosphere to optimize PLLA nanofibre adherence, assessed by peel tests.

Air spinning induced a reduction of number-average molecular weight (M_n) for the 7% PLLA solution but not for the 4% solution. The nanofibres were more crystalline and less sensible to viscoelastic relaxation as a function of aging in the 4% solution than in the 7% solution. Discharge treatment of the PET promoted identical surface modification on PET film and PET textile surfaces. Moreover, the best PLLA nanofibres adhesion results were obtained under nitrogen atmosphere. This study demonstrates that it is possible to coat the internal side of tubular vascular prostheses with PLLA nanofibres, and provides a better understanding of the air spinning process as well as optimizing nanofibres adhesion.

Keywords: PLLA, nanofibres, air spinning, atmospheric pressure plasma treatment, vascular prostheses

4.4. Introduction

Poly(L-lactic) acid (PLLA) is a biodegradable polymer[159] widely used in industry for a wide range of textile, packaging, and biomaterial applications[159, 182]. PLLA degradation involves the hydrolysis of ester links, thus leading to the formation of lactic acid which may be metabolized by the human body[165]. Commonly used for suturing, this FDA-approved polymer is usually introduced as a tissue engineering scaffold[183] in drug eluding systems[161], as well as bone regeneration[160], vascular[154, 163, 184], and endovascular[162] applications.

To obtain a final product that is flexible, porous, and able to support cell proliferation, electrospinning is often used to produce PLLA nanofibres[160, 163, 185]. In this process, a polymer solution is ejected under a high-tension electrical field to enable the formation of mesh with a fibre diameter below the micrometer range. Although this technique is very well adapted to research applications, it is unfortunately time-consuming and scarcely transferable to industrial applications. Furthermore, high voltage requires a space between the needle-ejected polymer and the surface-receiving nanofibre, thus avoiding a closed area for electrospun deposition.

A novel system is proposed to produce randomly oriented nanofibres for use in vascular applications. Textile vascular prostheses are currently manufactured with either knitted or woven polyethylene terephthalate (PET) and are implanted once impregnated with proteins (collagen, albumin, or gelatine). The goal of the protein impregnation is to reduce textile porosity in order to prevent blood leakage during implantation.

The problem today with small-diameter textile prostheses is their high rate of occlusion, after a short period of implantation, due to thrombosis or hyperplasia development[186]. This could be alleviated with the formation of a neo-endothelium, which is the graft's colonization by the natural monolayer of cells that covers veins and arteries in humans[34].

Indeed, endothelium provides perfect hemocompatibility, and its development on the inner wall of vascular prostheses would not only improve patency rate but also enable to use prostheses of smaller diameter. Unfortunately, despite promising results in animal trials, none of the commercial prostheses available today show complete neo-endothelialization in humans[46]. In addition, because of their oversized threads[179], bare textile prostheses (i.e. with no protein coating) fail to show any ability to support endothelium formation.

As coating with proteins does not improve the endothelialization capability of textile prostheses, it was sought to replace the traditional protein coating with a PLLA nanofibre mesh obtained by an innovative air spinning system. The ultimate goal of this fine-tuned interface between blood and textile threads will be to provide a safe scaffold for endothelial cells to proliferate into a monolayer. Thereafter, the PLLA's biodegradable properties will enable this synthetic matrix to be slowly replaced by the natural extracellular matrix. PLLA nanofibre mesh sprayed onto textile prostheses has already been shown to be a good environment for endothelial cell proliferation in a monolayer *in vitro*[187].

Aside from the many questions remain to be addressed from both a biological and a clinical standpoint, three aspects of the air spinning method should be examined from a technical angle. A priori, to avoid dead-end research technology is the need to assess the ability of the air spinning technique to cover the tubular inner surface of commercial textile prostheses. The physico-chemical properties of PLLA in nanofibre form must then be investigated. Finally, the adherence of PLLA nanofibres on PET threads must be optimized. PLLA nanofibre mesh may delaminate under blood shear stress and intrinsic graft movements and have lethal consequences by occluding narrowing vessels downstream. This study therefore sought to respond to these challenges.

A specific air spinning apparatus was designed to spray PLLA nanofibres inside textile prostheses. To confirm the nature of the PLLA fibres, analyses were performed to control their morphological properties, as well as their physico-chemical characteristics. As for the adhesion properties, a promising solution is proposed with an atmospheric pressure plasma treatment to modify the PET substrate surface properties to optimize the adherence of the PLLA nanofibres.

4.5. Materials and methods

4.5.1. PLLA nanofibre deposition

PLLA obtained from Hycail-Finland Oy (Turku, Finland, $M_n = 126239$, $M_n/M_w = 1.78$) was solubilized in chloroform (99.99%, Carl Roth, Strasbourg, France) at 4% and 7% concentrations (w/v). Following total polymer dissolution, each solution was injected into an air spray apparatus designed in the laboratory (Figure 28). This apparatus consists of a customized atomizer plugged into compressed medical-grade air and filled with PLLA solution through a glass syringe equipped with a long customized stainless steel needle.

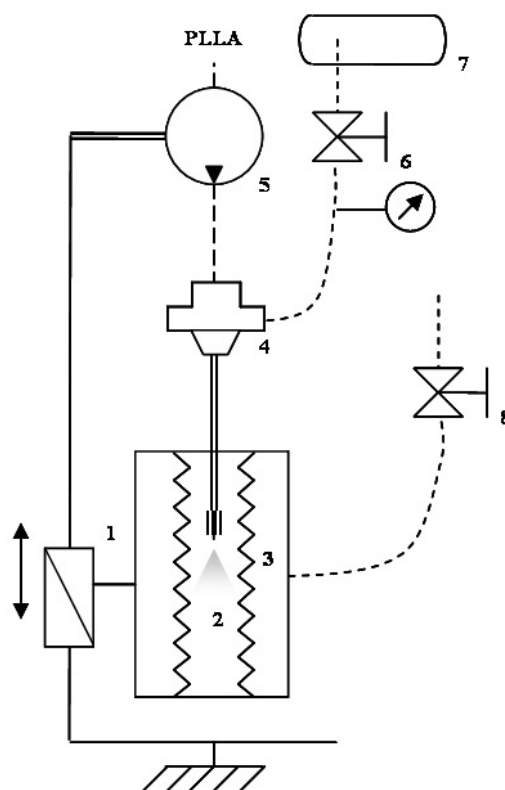


Figure 28: Schematical overview of the air spinning system. (1) Prosthesis holder (vertical motion); (2) PLLA fibre pulverization cone; (3) Vascular prosthesis inside the depression chamber; (4) Atomizer feed with compressed air and PLLA solution; (5) PLLA injection pump (syringe pump); (6) Compressed air valve and manometer; (7) Compressed air tank; (8) Depression system.

PLLA was injected with a computerized syringe pump (VIT-FIT, Lambda, Zurich, Switzerland) at a controlled rate. Polymer solution was ejected from the needle nose and stretched by high speed air flow. During this stretching process, the solvent evaporated, resulting in a simultaneous increase of the PLLA solution's viscosity. Polymer droplets were elongated to form fibres under air flow stress. Previous studies in the laboratory showed that low air pressure and low polymer rate (0.5 Bar and 10 mL/h, respectively) were optimal for high-quality fibres[187]. Air spray apparatus was specifically modified to enable air spinning into the tubular shape of textile prostheses. With this in mind, a special textile prosthesis holder was designed to maintain the prosthesis deployed inside a vacuum chamber and to maintain its extremities in the open position, which made it possible to introduce the spraying nozzle and to air spin the PLLA inside tubular prostheses.

Prosthesis samples were taken from crimped and non-crimped PET textile tubes (semi-finished Dialine II prostheses, C. R. BARD/Cardial, Saint-Etienne, France), hereafter referred to as Cardial Knitted (CK). The PLLA nanofibre samples collected on CK were named CK/PLLA. Two PLLA solution concentrations (4% and 7% v/w) were air spun through air spray apparatus to obtain nanofibres that were collected on CK samples, on PET films for SEM and water permeability analyses, and on dynamic mechanical analysis (DMA) paperboard probe moulds, as well as inside glass beakers to collect nanofibre spools for DSC examination. Prior to spraying the PLLA, the PET films were thoroughly cleaned in successive ultrasonic baths with acetone, deionised water, and methanol (70%).

4.5.2. PLLA nanofibre characterization

PLLA molecular weight was assessed by gel permeation chromatography (GPC) (Shimadzu, Japan) in tetrahydrofuran (THF) solution to compare the average molecular weight (M_n) number and the polydispersity index of bulk PLLA and air-spun PLLA nanofibres.

Viscosity of the PLLA solutions (4% and 7% w/v in chloroform) was determined with a Bohlin CS rheometer equipped with a plate-plate module and a solvent trap for chloroform atmosphere saturation. Measurements were repeated at least three times. Viscosity was investigated to determine the level of shear stress inside tubes used to deliver the polymer

solution in the air spinning apparatus. In that regard, the Reynolds number was calculated as

$$\text{Re} = \frac{\rho V D}{\eta},$$

where ρ = density, V = fluid speed, D = pipe diameter, and η = viscosity.

Laminar flow in a circular pipe for Newtonian fluids followed the Poiseuille relationship with a parabolic speed profile given as

$$\frac{V(r)}{V_m} = 2 \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right],$$

where $V(r)$ = flow speed at radius r , V_m = average flow speed, and R = pipe radius. Shear strain between the laminar layers of the circulating fluid are expressed as $\sigma = \eta \times \dot{\gamma}$, where

$$\dot{\gamma} = \frac{dV(r)}{dx}$$

is shear rate.

Observations of the PLLA nanofibres were performed with a Philips SEM 525 (Eindhoven, Netherlands) scanning electron microscope (SEM) at a 15 kV accelerating voltage, and a Philips CM200 (Eindhoven, Netherlands) transmission electronic microscope (TEM) at a 200 kV accelerating voltage. For the SEM analyses, samples were glued on a stub and sputter-coated with gold. TEM micrographs were taken on polymer grids onto which PLLA fibres were sprayed.

Water permeability was assessed under a constant pressure of 120 mmHg on a 1-cm² sample surface by measuring the amount of water permeating through the sample after 1 minute. CK and CK/PPLA (obtained from tubular CK prostheses air sprayed with PLLA nanofibres) were tested with this method.

Thermal analyses were performed using differential scanning calorimetry (DSC) (MDSC 2920, TA Instruments, Newcastle DE, USA) and dynamic mechanical analysis (DMA

2980, TA Instruments). The PLLA nanofibres sprayed from 4% and 7% solutions were analyzed after 1 and 7 days of aging under vacuum (1mBar) with desiccant salts prior to all thermal analyses. DSC was used to determine both the crystalline index and the effect of aging on the PLLA samples.

The samples (PLLA nanofibres sprayed from 4% and 7% PLLA solutions and PLLA from a manufacturer's pellet) examined with DSC were first kept at an isotherm temperature of 0°C during 5 min. An initial heating cycle with a heating rate of 10°C/min was applied until the samples reached 80°C, which was just under the recrystallization peak. This temperature cycle was assessed to remove adsorbed water and residual traces of solvent present among the PLLA nanofibres. A temperature of 80°C was maintained during 3 min, followed by a cooling period at 10°C/min to reach -20°C. Following stabilization at -20°C, the samples underwent a second heating cycle at 10°C/min to reach 200°C. The collected data include the glass temperature measured at the first heating cycle (T_g'), that measured at the second heating cycle (T_g), the fusion temperature (T_f), the crystallization enthalpy (ΔH_c), and the fusion enthalpy (ΔH_f). The crystalline index (X_c) was calculated according to $X_c = (\Delta H_f - \Delta H_c) / \Delta H_f$, with a theoretical fusion enthalpy of $\Delta H_f^0 = 93 \text{ J/g}$ [188]. Each DSC measurement was repeated six times. Heating parameters were chosen according to previously reported studies[189-191].

Porosity of PLLA meshes is essential to calculate and compare the modulus obtained by DMA. Indeed, modulus is obtained from mechanical stress, and stress is function of load and cross section. In case of porous materials, the cross section value has to take into account for the material porosity. In this context, the porosity of nanofibre meshes was assessed by precisely measuring samples weight (Mettler Toledo AG285, switzerland) and mesh dimensions (thickness was measured under electronic microscopy). PLLA nanofibres meshes porosity was thus determined by comparing the density of the PLLA nanofibre mesh with that of bulk PLLA.

PLLA nanofibres were sprayed onto DMA paperboard probe mould. These home-made probe moulds are simple rectangular windows (18 mm*4.5 mm) cut out of semi-rigid paperboard. It was thus possible to manipulate thin layers of PLLA nanofibres fixed on their paperboard frames with no risk of stretching. The probe moulds were mounted

vertically on DMA grips, after which time the paperboard sides were simply cut away to free the PLLA nanofibre layer. Only these layers of PLLA nanofibres were tested by DMA analyzer, with no interfering paperboard.

PLLA nanofibre samples were tested using standard DMA analyses. The samples were kept under a single frequency excitation of 1 Hz with an amplitude of 100 μm , a preloaded force of 0.005 N, and a 125% force track. The temperature was stabilized at -20°C and a heating ramp of $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was applied to reach 150°C . Each experiment was repeated three to five times.

When submitted to a dynamical load, a material's complex strain is a function of two parts, namely, storage modulus (E') and loss modulus (E''). Storage modulus is related to the instantaneous response of the materials to sinusoidal stimulation, while loss modulus is related to phase difference. The ratio between E' and E'' corresponds to tangent Delta ($\tan\Delta$), which indicates the proportion of visco-elastic response of the materials; a $\tan\Delta$ of zero corresponds to a 100% elastic behavior, while a $\tan\Delta$ equal to one is characteristic of a 50%-50% elastic and visco-elastic behavior.

Because DMA analysis is a function of temperature and as the goal is ultimately to use PLLA nanofibres in the human body, the storage modulus was determined at 37°C ($E'(37^{\circ})$). E''_{max} was the maximum loss modulus measured. The maximum $\tan\Delta$ is expressed as $\tan\Delta_{\text{max}}$, and its temperature as $T^{\circ}\tan\Delta_{\text{Max}}$. Samples were stretched by DMA analysis, and ratio of the observed displacement ($\% \text{Disp}$) was calculated as the $\% \text{Disp} = (\text{DispMax} - \text{DispMin})/\text{DispOrigin}$, with DispMax = the maximum displacement observed, DispMin = the minimum displacement observed, and DispOrigin = the length of the sample. All of the thermal measurements are expressed as the mean \pm Standard Error to the Mean (SEM).

4.5.3. PET substrate plasma treatment and adhesion characterization

Polyethylene terephthalate (PET) films (Goodfellow, Oakdale, PA, USA) were used for plasma treatment as a model for PET textile (CK). Surface chemistry was assessed by XPS and FTIR, and results (not shown) confirmed the identical chemical composition of PET

textile and film surfaces, as well as the absence of any mineral or organic contaminant. Both PET films and textiles were punched into circular-shaped samples for peeling and plasma treatment as well as for contact angle and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses.

The PET film and textile samples were then treated with an atmospheric pressure dielectric barrier discharge (APDBD). The atmospheric pressure plasma reactor configuration is described elsewhere[181]. We used a conventional parallel plate dielectric barrier discharge (DBD) reactor in which the polymer samples were placed on the grounded electrode. The feed gases used for the plasma treatments were medical air and nitrogen (99.998% purity) (BOC Canada Ltd., St-Hubert, QC, Canada). To directly obtain a laminar flow between the electrodes, gas flow was introduced through a diffuser and was maintained constant at 10 L/min. For both treatments (air and N₂), the chamber was purged with the treatment gas for 10 min prior to igniting the discharge. Voltage, frequency, gas gap, and treatment time were all kept constant (9 kV, 3 kHz, 1 mm, 60 s). The discharge was a filamentary discharge in air, while a homogeneous Townsend discharge was obtained in N₂. An atmospheric pressure Townsend discharge (APTD) is homogeneous over the entire electrode area, while a filamentary dielectric barrier discharge (FDBD) is composed of a multitude of microdischarges, 0.2 mm in diameter, that are randomly distributed onto the surface[192]. APTDs are generally believed to be more efficient than are FDBDs in the surface treatment of polymers. However, FDBD treatments performed for 60 s at a frequency of 3 kHz last long enough to enable the statistical occurrence of the filaments throughout the entire surface, thereby ensuring a homogeneous surface modification[193].

The plasma-treated PET samples were stored for aging (1, 2, 7, and 14 days) at room temperature and were subsequently assessed by contact angle and XPS to identify any time-dependent surface modifications. Static contact angle measurements were recorded on the PET film samples using a VCA 2500 XE system (AST, Billerica, MA, USA). Deionized water drops were deposited onto the surface. Three drops were analyzed on different parts of each sample. XPS spectra were recorded on both the flat PET films and PET textile samples (CK) before and after plasma treatment using a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). A monochromatic aluminum (1486.6 eV)

X-ray source (200 W) recorded the survey spectra, while high-resolution spectra were acquired with a monochromatic magnesium (1253.6 eV) X-ray source (100 W). Detection was performed at 45° with respect to the normal of the surface. The PET film and PET textile surfaces were analyzed either with or without plasma treatment. Each measurement was repeated three to six times and is expressed as the average \pm SD.

Tapping mode atomic force microscopy (AFM) was performed on the PET film samples under ambient conditions using a Dimension 3100 atomic force microscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA). Surface images were analyzed using WSxM 4.0 Develop 11.4 software[173].

For the peeling test, PET film samples with or without plasma treatment were glued onto an aluminum stub with carbon tape (Soquelec, Montréal, QC, Canada). The experimental protocol and parameters were inspired by standard tests (ASTM D 1876-01, D 2979-01, and D 5179-02). The peeling test was performed by means of an Instron 5848 Micro tester (Instron, Norwood, MA, USA) at room temperature. Sample preparation consisted in applying a tape band (Tuck Tape, Canadian Technical Tape Ltd., Montréal, QC, Canada), 5 cm long and 5 mm wide on PLLA sprayed onto PET samples while keeping a 3-cm free end on the side of the sample surface. Figure 29A shows a schematic overview of the peeling test. A preloaded force of 35 N was then applied on the tape band within a rubber pusher during 15 s. Finally, the free end of tape band was grabbed by means of pneumatic grips (Mechanical wedge action grips, Instron, Norwood, MA, USA), followed by the peeling test which was performed with a grip speed of 100 mm/min. Data were collected through a 10 N cell. Each test was performed six times ($n = 6$) for each condition (i.e. PLLA fibres sprayed onto PET film without APDBD treatment with either air or N₂ APDBD). Data were presented as average \pm Standard Error to the Mean (SEM).

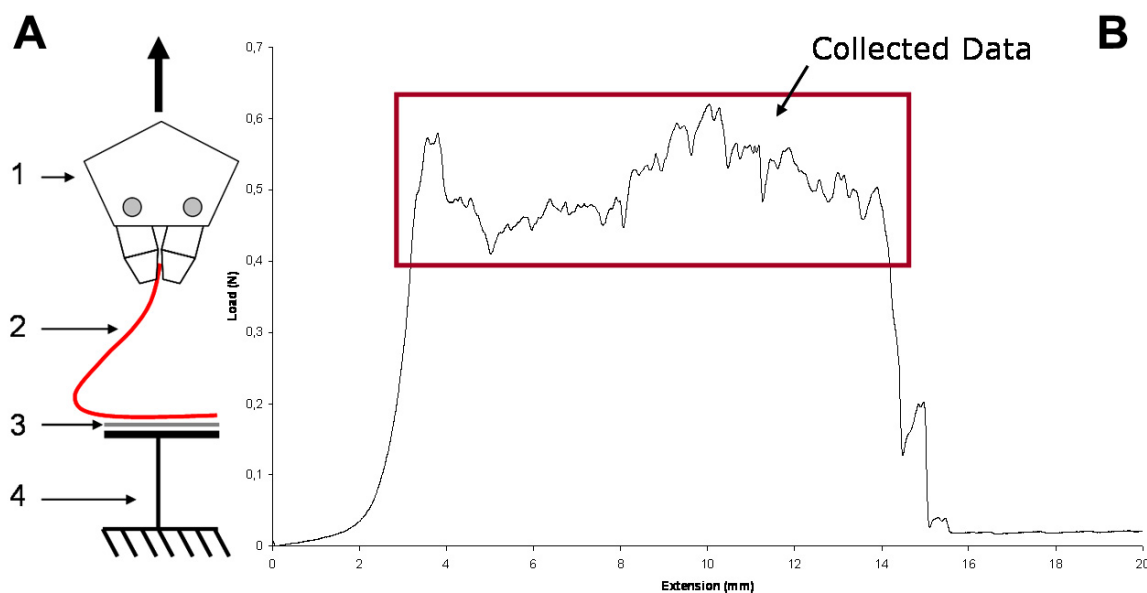


Figure 29: Schematic overview of the peeling test. (A) 1- pneumatic grips, 2- tape band, 3- sample, 4- aluminum stub) and an example of tearing force curve; (B) Indication where data were collected (red rectangle).

4.5.4. Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA and Bonferroni) were performed and assumptions of normality and variance homogeneity were met (visual inspection of data distribution, Shapiro-Wilk normality test, and Levene homogeneity of variance test, respectively). Non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) were also done to determine any significant differences between groups. Statistical analyses were conducted on these data using SPSS (version 13.0, SPPS Inc., Chicago, IL, USA).

4.6. Results

4.6.1. PLLA nanofibre deposition

Vascular prostheses (CK) were positioned in the air spinning system and covered with a layer of PLLA nanofibre mesh. Samples were cut from the tubular prostheses for SEM observations which confirmed that the air spinning system enabled nanofibre deposition

inside the textile vascular prostheses (Figure 30). The tubular air-spun nanofibre results were comparable to data obtained previously with a planar air spinning system[187].

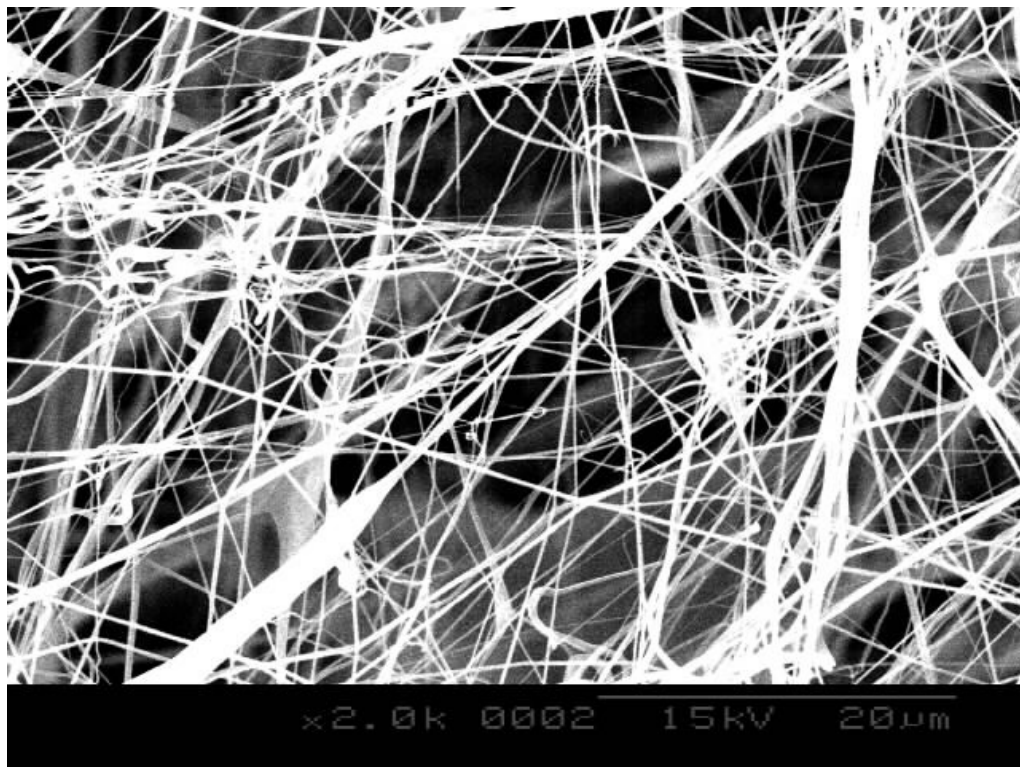


Figure 30: SEM image of CK vascular prosthesis covered with air-spun PLLA nanofibres obtained with a 4% PLLA solution

A more detailed observation of the PLLA nanofibres was possible with TEM. Figure 31A shows PLLA nanofibres obtained with the 4% PLLA solution. The smallest fibre diameter measured for this picture was 45 nm. Figure 31B shows PLLA nanofibres obtained with the 7% PLLA solution, where the smallest fibre diameter measured approximately 35 nm

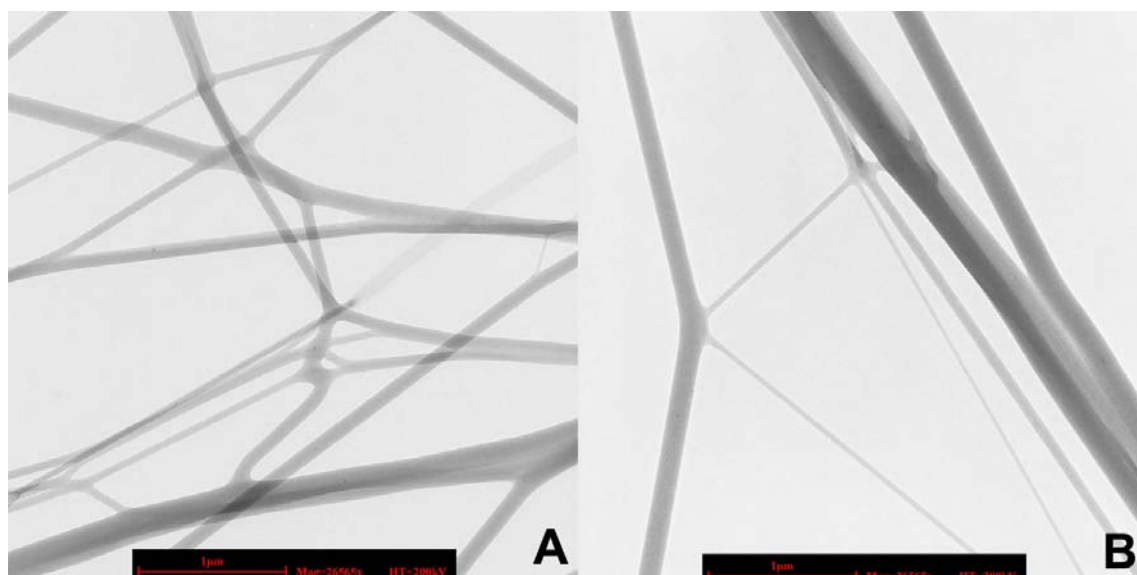


Figure 31: TEM images. (A) Air-spun PLLA nanofibres obtained with a 4% PLLA solution and (B) Air-spun PLLA nanofibres obtained with a 7% PLLA solution.

4.6.2. PLLA nanofibre characterization

Table 3: PLLA nanofibre GPC results

	Raw PLLA pellets	PLLA nanofibres obtain from 4% PLLA	PLLA nanofibres obtain from 7% PLLA
Number Average Molecular Weight(Mn)	126239	122101	108137
Weight Average Molecular Weight(Mw)	224728	217351	236451
Mw/Mn	1.780	1.780	2.186

Table 3 presents the GPC results which showed that the selected PLLA had a high molecular weight ($M_n = 122101$) with a polydispersity index of 1.78. The PLLA air spinning process with the 4% polymer solution kept these parameters at the same level, while the same process with the 7% polymer lowered the M_n and induced a polydispersity increase, compared to that recorded by the bulk PLLA and nanofibres obtained with the 4% solution.

The average viscosity (\pm SD) was $2.59 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 3.48 \cdot 10^{-3}$) Pa.s with the 4% PLLA solution in CHCl_3 and $1.43 \cdot 10^{-1}$ ($\pm 8.79 \cdot 10^{-3}$) Pa.s with the 7% PLLA solution in CHCl_3 with the calculated Reynolds number (Re) always under 2000. The solution was therefore a

Newtonian fluid, and according to this very low Re, fluid displacement within the injection system was laminar, following the Poiseuille type flow with a parabolic speed profile. The maximum shear strain calculated was approximately $9.17 \cdot 10^1 \text{Pa}$ with the 4% PLLA solution, and $5.07 \cdot 10^2 \text{Pa}$ with the 7% PLLA solution.

The CK textile sample, a semi-finished knitted structure with no protein coating, showed a higher permeability average (\pm SD) compared to that of the CK/PLLA: ($p < .001$), $12 \cdot 10^2 \pm 1.3 \cdot 10^2 \text{ mL/min.cm}^2$, ($n = 10$) and $25 \pm 11 \text{ mL/min.cm}^2$ ($n = 4$), respectively, ($p < .001$), with the CK/PLLA samples reaching a waterproof state, which is the only acceptable level clinically.

Table 4: PLLA nanofibre DSC results (average \pm SEM)

Time (day)	PLLA pellet	PLLA Nanofibres 4%		PLLA Nanofibres 7%	
		1	7	1	7
n	6	6	6	6	6
Tg' ($^{\circ}\text{C}$)	61,08(\pm 0,63)*	44,195 (\pm 0,41)*	53,825 (\pm 0,81)*	57,353 (\pm 0,28)*	48,158 (\pm 0,09)*
Tg ($^{\circ}\text{C}$)	58,21(\pm 0,57)	57,561 (\pm 0,11)	57,885 (\pm 0,03)	57,898 (\pm 0,05)	57,821 (\pm 0,04)
Tf ($^{\circ}\text{C}$)	138,16(\pm 0,94)	141,205 (\pm 0,76) †	141,076 (\pm 0,23) ††	139,968 (\pm 0,15)	139,92 (\pm 0,29)
Xc (%)	2,928(\pm 0,5)§#	20 (\pm 1,8)	20,5 (\pm 2,3)	9,7(\pm 1,2)§	6,1(\pm 0,7)§

* $p < .001$ compared to all groups

† $p < .001$ compared to PLLA pellet

†† $p < .05$ compared to PLLA pellet

§ $p < .001$ compared to PLLA nanofibres 4% @ 1 day and @ 7 days

$p < .05$ compared to PLLA nanofibres 7% @ 7 days

Table 4 presents the DSC measurements (Average \pm SEM) and statistical analyses. A strong group effect was detected for the first glass transition temperature ($F(4.29) = 176.1$, $p < .001$) and was confirmed with post hoc analyses, where each group showed statistical differences. The glass transition temperature measured at the second heating cycle was statistically similar for all of the samples. Another group effect was detected when the fusion temperatures (Tf) were compared ($F(4.29) = 4.596$, $p < .01$). Bonferroni post hoc analyses revealed that the pellets' Tf1 was significantly lower than that of the PLLA

nanofibres obtained with the 4% solution after one and seven days of aging ($p < .01$ and $p < .05$, respectively). A second peak of fusion was observed for the PLLA pellets (141.5 ± 0.64) and for the PLLA nanofibres obtained with the 4% solution after one day (147.86 ± 0.33) and seven days (147.25 ± 1.27), but none for the PLLA nanofibres obtained with the 7% solution. The crystalline index (X_c) also showed significant differences under ANOVA analysis ($F(4,29) = 27.917$ $p < .000$), as the PLLA nanofibres with the 4% solution showed a higher crystalline index than did the other groups ($p < .001$), regardless of aging, and where the PLLA nanofibres with the 7% solution at 1 day showed a higher index versus the PLLA pellets. No other significant results were observed.

Table 5 presents the DMA results. ANOVA highlights the group effects for all of the data ($p < .05$ for $E'(37^\circ)$, and $p < .001$ for all other DMA data). The Bonferroni post hoc results are also shown in Table 3. Moduli were calculated with respect to nanofibre mesh porosity to be comparable to those of the PLLA film. PLLA nanofibre mesh porosity for DMA analysis obtained with the 4% PLLA solution was $81.9\% \pm 3.3\%$, while that obtained with the 7% PLLA solution was $54.7\% \pm 1.4\%$.

Table 5: PLLA nanofibre DMA results (average \pm SEM)

	PLLA Film	PLLA Nanofibres 4%			PLLA Nanofibres 7%	
Time (day)	1	1	7	1	7	
n	4	4	3	5	4	
$E'(37^\circ\text{C})$ (MPa)	185,52(\pm 41,99)	110,7 (\pm 10,55)	98,95(\pm 14,7)	91,18(\pm 5,15)**	105,99(\pm 4,03)	
Tg ($^\circ\text{C}$)	30,87(\pm 1,88)	68,04(\pm 3,86)*	70,82(\pm 0,07)*††	59,57(\pm 0,70)*	65,62(\pm 0,12)*	
E''_{max} (MPa)	88,71(\pm 11,28)	25,80(\pm 1,10)*	30,52(\pm 2,81)*	13,72(\pm 0,42)*	17,98(\pm 0,60)*	
tanDeltamax	0,62(\pm 0,02)	0,66(\pm 0,02)‡†	0,81(\pm 0,01)*	0,83(\pm 0,01)*	0,93(\pm 0,04)*§	
% Displacement	24,48(\pm 2)	2,41(\pm 0,29)*†	5,04(\pm 0,97)*††	11,22(\pm 0,48)*‡‡	14,86(\pm 0,76)*‡§	

* $p < .001$ compared to PLLA film

** $p < .05$ compared to PLLA film

† $p < .001$ compared to PLLA nanofibres 7% @1day

†† $p < .05$ compared to PLLA nanofibres 7% @1day

‡ $p < .001$ compared to PLLA nanofibres 4% @7day

‡‡ $p < .05$ compared to PLLA nanofibres 4% @7day

§ $p < .001$ compared to PLLA nanofibres 4% @1day

4.6.3. PET substrate plasma treatment and adhesion characterization

Visual examination of the sample revealed that N₂ APDBD treatment kept the sample intact, whereas air APDBD left the PET film surface slightly opalescent.

The PET textiles without plasma treatment were hydrophobic, with a contact angle close to $117.78^{\circ} \pm 5.57$. With plasma treatment (air and N₂), the water contact angle was unmeasurable because of the total droplet absorption within the textile threads, even after 15 days of aging. APDBD treatment thus enhanced the hydrophilicity of the textile samples. The contact angles on the PET films were thus measured, with the results presented in Figure 32. A strong surface energy modification was achieved with both treatments, as the contact angles dropped from $74.70^{\circ} \pm 2.42$ for the virgin PET to $27.67^{\circ} \pm 4.97$ and $34.81^{\circ} \pm 7.25$ for the air and N₂ APDBD treatments, respectively. Contact angle increased after 2 days, following the same kinetics for the air and N₂ APDBD treatments, with stabilization below 60°. Hydrophilic surfaces (contact angle below 90°) optimize adherence, and this effect was clearly obtained with plasma treatment

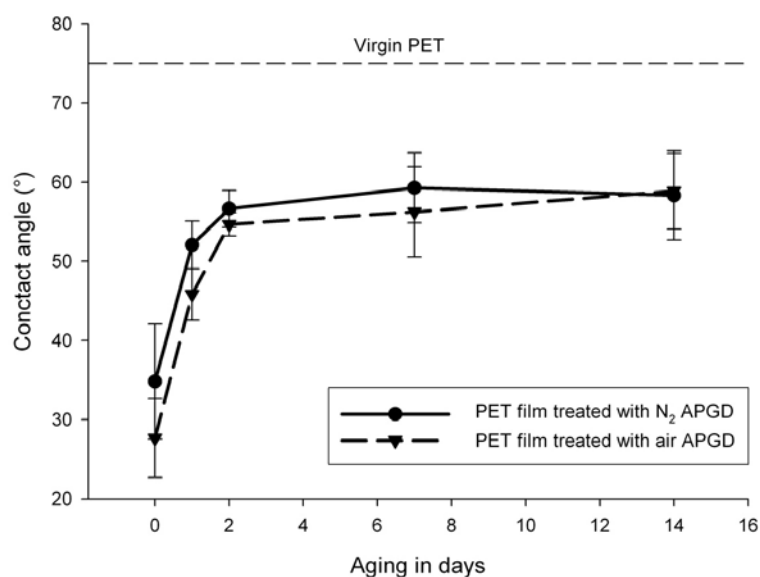


Figure 32: Contact angles for air- and N₂ APDBD-treated PET films and aging of contact angle as a function of time.

XPS analyses show that the APDBD treatment produced an identical chemical surface modification on the PET film and PET textile samples (Figure 33 and Figure 34), despite very different macroscopic structures for both types of samples. With air APDBD, the N/C ratios remained negligible for both types directly following plasma modification up to 15 days of aging. Therefore, only a few nitrogenous groups were grafted onto the PET via the air APDBD treatment. This plasma treatment resulted in modified O/C ratios; with an increase of initial ratio of the virgin PET film at 0.42 ± 0.01 , compared to 0.75 ± 0.03 for the PET film. The O/C XPS ratio slightly decreased after 2 days, with stabilization occurring at around 0.6. Nitrogen APDBD produced very different results, as the O/C ratios for both the film and textile remained comparable to that of the virgin PET, and were unaffected by aging. On the other hand, N/C increased up to 0.15, here again unaffected by aging. Nitrogenous groups were therefore durably and equally grafted onto the PET film and textile surfaces.

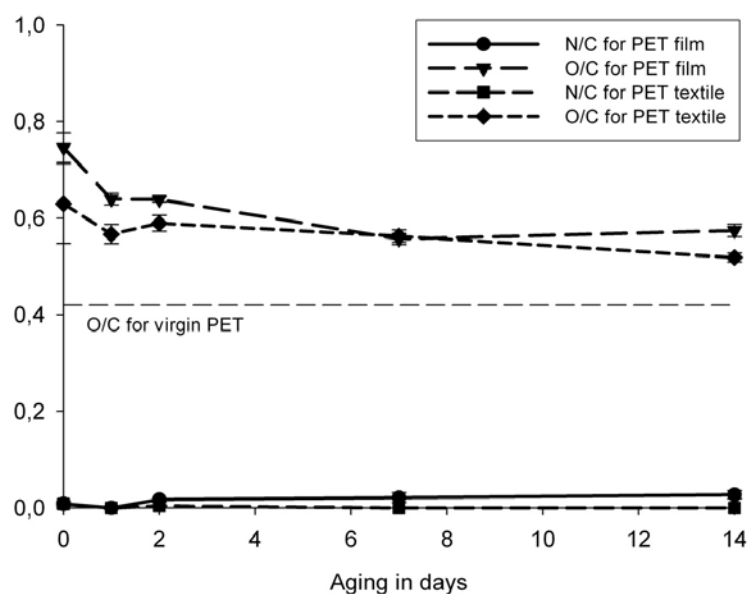


Figure 33: N/C and O/C ratios of a PET film and a textile surface following air APDBD treatment, and aging of these ratios as a function of time.

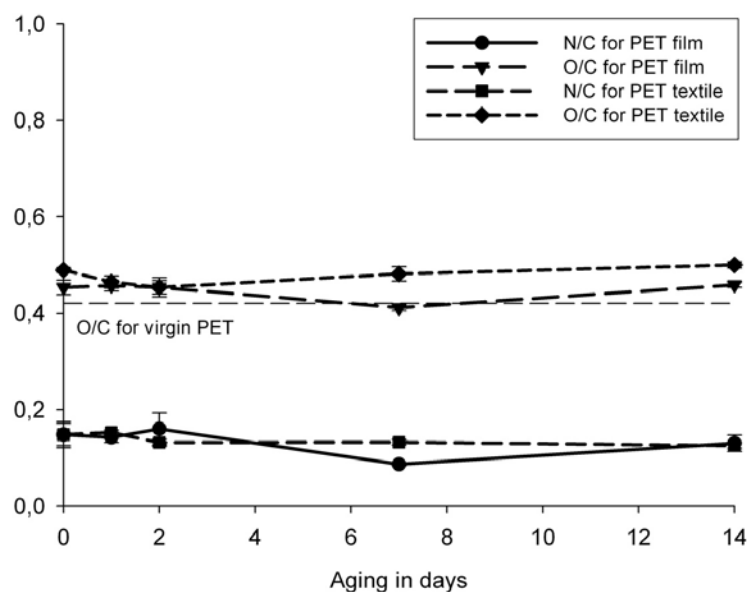


Figure 34: N/C and O/C ratios of PET film and textile surface after Nitrogen APDBD treatment, and aging of these ratios in function of time.

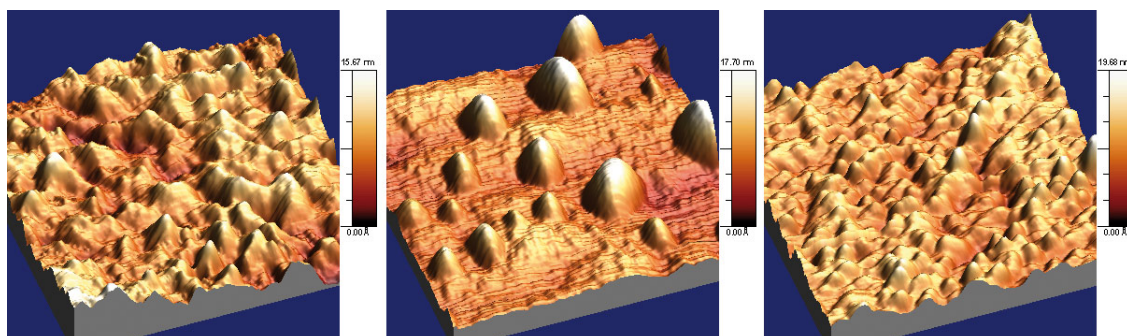


Figure 35: AFM tapping mode images (500 nm x 500 nm, 3D topography data). (A) Virgin PET film; (B) Air APDBD-treated PET film; (C) N₂ APDBD-treated PET film

AFM micrographs (Figure 35) show a slightly modified roughness (RMS equal to 2.127 nm, 2.399 nm, and 1.922 nm for the virgin PET film, air plasma-treated PET film, and N₂ plasma-treated PET film, respectively), as well as significant topographic changes. The air APDBD treatment modified the PET film's topology. This phenomenon can be explained by the formation of oxidative species on the PET surface during the APDBD plasma treatment, thus creating low molecular weight oxidized material (LMWOM) domains that agglomerate in the observed geometry. XPS results support this hypothesis

because of the high ratio of oxidative species present on the PET surface following the air APDBD. In contrast, nitrogen APDBD plasma treatment did not affect surface topography, which is again confirmed by XPS results, as nitrogenous species were permanently grafted onto the PET surface with no oxidative species present.

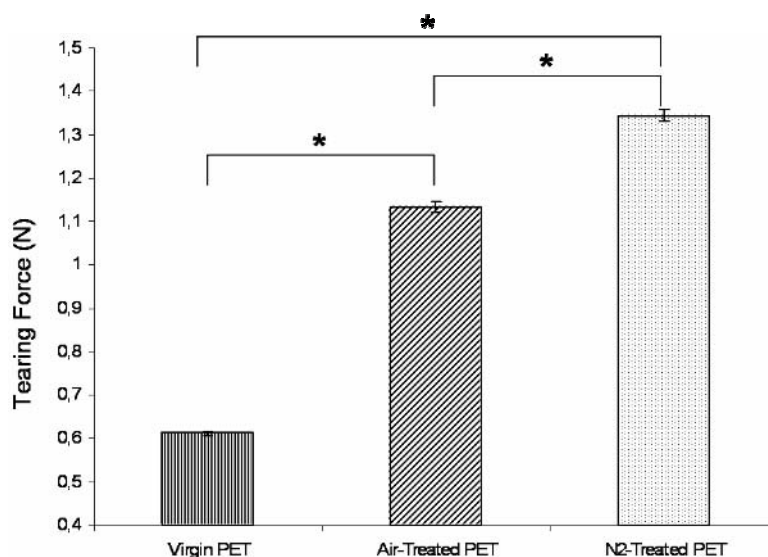


Figure 36: Average tearing force (\pm SEM) measured to remove PLLA nanofibres from the PET substrates with or without plasma treatment. (* = $p < .001$)

Figure 29-B shows an example of tearing force curve. The curves began with a sharp increase then stabilized in an almost constant stage shape until the tape was completely removed from the sample surface. It was chose to focus on the continuous phase of the curve profiles (Figure 29B, collected data), more representative of the adherence[194]. Data were therefore truncated to retain only the constant stage and were compiled ($n = 6$) for each condition. Figure 36 shows the average force used to remove the PLLA fibres from the PET films. As the assumption of normality was not met (Levene test, $p < .001$), non-parametrical tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) were performed to compare groups. A significant group effect was detected (χ^2 [df = 2] = 1989.493, $p < .001$), and the Mann-Whitney tests reveal that all of the groups presented significant differences: the N₂ APDBD-treated PET films displayed higher tearing forces to remove the PLLA fibres than did the air APDBD-treated PET films ($p < .001$) and virgin PET films ($p < .001$), and the

air APDBD-treated PET films presented higher tearing forces over its untreated counterpart ($p < .001$).

4.7. Discussion

4.7.1. PLLA nanofibres deposition and characterization

While air spinning a 4% PLLA solution did not affect the polymer chain size distribution, it appears that air spinning a 7% PLLA solution did provoke modification of this parameter. This phenomenon may have occurred inside the long stainless steel needle of the customized air spinning atomizer, as the high-viscosity polymer solution forced through the small calibre tube induced a high shear stress (calculations show that shear stress rose to a maximum with the 7% PLLA solution ($5.07 \cdot 10^2 \text{Pa}$) compared to $9.17 \cdot 10^1 \text{Pa}$ with the 4% solution). This laminar shear stress may have been one initiator of polymer chain length modification, therefore leading to modification of PLLA chain length distribution.

The air spinning system presented herein consisted of a succession of pipes leading to a capillary-size exit. Each reduction of the pipe produced turbulence. Entanglements occurred with each polymer concentration, which necessarily increased the stress to the deployed polymer chains[195] in the solutions. These chains were thus possibly totally or partially stretched, unraveled, and uncoiled. At times, sufficient energy may have given rise to breaks in the chemical bonds within the carbon backbone. Moreover, shear stress provoked during the drawing of the solution by the air jet may have induced the observed reduction of M_n for the 7% PLLA by chain scission, as well as the observed chain degradation after high shear stress processing[196, 197].

SEM analyses confirm that the air spinning system was successful in producing PLLA nanofibres inside vascular prostheses (Figure 30). This constitutes a definite innovation in the field of nanofibre technology as it will finally enable the deposition of nanofibres inside small areas. Moreover, this very rapid air jet spinning process will provide total coverage of a vascular graft by nanofibres in less than 20 min.

TEM enabled us to visualize how the PLLA nanofibres were interconnected. PLLA fibres seem to be linked by “fusion-like” junctions (Figure 31A and 4B). Whether these “fusion-like” junctions are associated with remaining solvent or mechanical bonding remains unclear. Regardless of their origin, these junctions led to a better cohesion of the PLLA nanofibre mesh. TEM also highlights that the PLLA nanofibres had extremely small diameters, in terms of the lower-diameter part of the fibre population[187]. No crystallization was observed in TEM with electron diffraction. Crystallization and an amorphous zone were certainly not possible within such small fibres. The polymer was therefore probably arranged as an oriented zone, mid-way between an amorphous zone and a crystalline zone where macromolecules are aligned in bundle-like formation.

To avoid blood leakage during implantation, vascular grafts must ideally be waterproof. Because this property is so important, it was deemed it necessary to investigate both CK/PLLA samples and bare textiles and to compare these results to the acceptable clinical level (0 mL/min.cm²). PLLA nanofibre mesh air spun inside vascular prostheses (CK) was able to reduce water permeability to the clinical level. This encouraging result shows the potential of this novel air spinning system to create synthetic nanofibre mesh on textiles by acting as both a tissue engineering scaffold and a sealant to prevent blood leakage during implantation.

Porosity was higher for the PLLA nanofibres obtained with the 4% solution than those obtained with the 7% solution (81.9% ± 3.3% vs 54.7% ± 1.4% respectively). The lower amount of solvent remaining within the nanofibres obtained with 4% solution during the process produced less compact mesh, thereby increasing its level of porosity. It has been reported that high porosity signifies greater cell viability[81, 82].

DSC shows that the glass transition temperature displayed a wide range of values depending on the history and morphology of the PLLA. The initial glass temperatures (Tg') showed significant differences. The PLLA nanofibres obtained with the 4% solution presented the lowest Tg', which increased as a function of time, whereas those obtained with the 7% solution presented an opposite and decreasing behavior over storage time. None of these temperatures came close to that recorded by the PLLA pellets. Interestingly, the PLLA fibers spun from the 7% polymer solution displayed a relatively low level a

crystallinity (10% and 6% after 1 day and 6 days of aging, respectively) while PLLA fibers obtained from the 4% solution crystallized at a level near 20% without important variations between 1 and 6 days.

The second heating cycle showed that T_g was comparable for all of the samples, regardless of time aging or morphology. Therefore, it was put forth that the T_g measured at the second heating cycle is comparable to the standard T_g shown in various other studies[167, 197, 198]. Differences between the T_g' and the T_g for the PLLA pellets can be explained by a small amount of adsorbed water remaining in the polymer[190] which was removed during the first heating cycle. While this phenomenon cannot be excluded, it cannot by itself explain the huge differences observed between the T_g and the T_g' recorded for the nanofibre samples. The presence of solvent (which acted as a plasticizer) trapped in the PLLA nanofibres may provide the beginnings of an answer, although this should be further investigated.

The second heating cycle showed that T_g was comparable for all of the samples, regardless of time aging or morphology. Therefore, it was put forth that the T_g measured at the second heating cycle is comparable to the standard T_g shown in various other studies[167, 197, 198]. Differences between the T_g' and the T_g for the PLLA pellets can be explained, in part, by a small amount of adsorbed water remaining in the polymer[190] which was removed during the first heating cycle. However, this sole phenomenon cannot by itself explain the huge differences observed between the T_g and the T_g' recorded for the nanofibre samples.

As can be seen in Table 2, PLLA nanofibres displayed quite different thermotropic behavior depending whether they were spun from the 4% or 7% polymer solution. On one hand, PLLA from the 4% solution exhibited a level of crystallinity of about 20% which remained almost unchanged between 1 and 7 days of aging. In addition, T_g' evolved from 44.2 to 53.8°C after 1 and 7 days of aging, respectively. On the other hand, the level of crystallinity of PLLA nanofibres spun from the 7% polymer solution was 10 and 6.1% after 1 and 7 days of aging, respectively, which was accompanied with a decrease of T_g from 57.4 to 48.16°C. This relationship between PLLA crystallinity and T_g increase has been already described in the literature and is believed to be caused by a reduction of segmental

mobility in the amorphous phase in the vicinity of crystalline lamellae[199]. This opposite behavior (constant and relatively high crystallinity with T_g increase upon aging for PLLA 4% versus low crystallinity which decreases along with T_g decrease for PLLA 7%) still has to be understood. However, different initial viscosity of both polymer solutions may be taken into account for opposite relaxation mechanisms[200]. Indeed, two different mechanisms appear to have occurred during nanofibre formation with the 4% and 7% concentrations. The 4% PLLA solution was less viscous and was easily stretchable by setting less resistance against the air jet spinning-induced elongation. Polymer macromolecules are aligned during this process, thus increasing the probability of promoting nucleation and crystallization. This hypothesis is confirmed by the higher crystalline index recorded for PLLA nanofibres obtained with the 4% solution compared to those obtained with the 7% solution. Moreover, the 4% solution produced smaller fibres[187], thus increasing the specific surface of the nanofibre mesh in process.

This higher specific surface may impact solvent vaporization. During the stretching process, however, chloroform can be trapped between macromolecules in either the crystalline or the amorphous zone, within entire fibres. Chloroform is known to be a plasticizer[201], thus explaining the lower T_g' observed after one day of aging. Seven days under vacuum appears to have removed the partially trapped solvent, resulting in an increase of T_g' for the PLLA nanofibres obtained with the 4% solution. It is remarkable that no comparable reduction of T_g' due to chloroform was observed for 7% PLLA nanofibres after one day. This could be explained by initial smaller amount of chloroform in the 7% solution compared to the 4% solution, reducing the probability of trapped solvent.

Fusion peak temperature showed no variation after seven days of aging. The higher results observed for the PLLA nanofibres obtained with the lower solution concentration can be explained by the higher crystallinity, higher oriented zone and greater residual strain, which shifted the T_f upward. Moreover, the presence of a secondary fusion peak (results not shown) for solely the PLLA nanofibres obtained with the 4% solution also tends to confirm the presence of an oriented zone.

Secondary fusion peaks may also be associated with the occurrence of recrystallization during the DSC experiment[202], and an oriented zone can be defined by an amorphous zone which has been stretched enough to align macromolecules without reaching crystallization. These zones should be located between the amorphous and the crystalline ones. DSC measurements show that air spinning process enabled us to produce PLLA nanofibres with physicochemical characteristics that were dependent on the polymer solution concentration and the history of the sample after production. It is obvious that a 4% PLLA solution allowed for a better crystalline index, which is clearly interesting for biomedical applications, as it has a significant impact on both degradation rate[203] and mechanical properties[204].

Table 5 presents DMA results. It can be noted that the storage modulus at 37° was slightly higher for the PLLA film than for the PLLA nanofibre mesh. The randomly oriented fibres of the nanofibre mesh induced a lower $E'(37^\circ)$ compared to that of the PLLA film, as many fibres were not oriented along the direction of the stress and thus offered no resistance. The T_g measured with DSC differed from that determined with DMA, as unconstrained fibres in DSC relaxed before reaching T_g . In DMA, the fibres were blocked, thus preventing polymer chain relaxation[197]. The huge difference between the PLLA film's T_g and that of the PLLA nanofibres is also related to residual strain present in the fibres in contrast to the film. Moreover, the remaining solvent within the material amplified the differences between the two surface samples, as it should ideally be more present in film because of the lower open surface to escape.

The storage and loss modulus profiles are comparable to previous findings[205]. Although not statistically significant, the slight increase in T_g after seven days of aging may be associated with macromolecular reorganization under strain. Nanofibres within the mesh were kept locked on their paperboard probe mould under strain, while polymer macromolecules tended to rearrange themselves into a more oriented zone. The energy level required to initiate glass transition was therefore greater. Moreover, the elevated T_g recorded by the 4% PLLA nanofibres can be explained by the presence of less amorphous phases entangled with more crystalline ones, which therefore required a higher level of energy to commence glass transition[196, 206]. The amorphous phase appears to have been

in higher proportions in the PLLA film, which induced greater viscoelastic behavior, as confirmed by the higher loss modulus.

Aging influenced the E''_{max} of the PLLA nanofibre mesh, as it displayed a tendency to increase after 7 days of aging. This shifting may be correlated with the idea that blocked fibres induce residual strains, thereby rearranging macromolecules into oriented zones that would essentially be more sensitive to viscoelastic behavior. Tangent delta also supports these results, with statistical differences between the PLLA nanofibres obtained with 4% solution and those obtained with 7% solution after one day and seven days. It shows that the viscoelastic part of the material's behavior increased as a function of both time and concentration. The longer the material was maintained under strain, the more it rearranged itself. Moreover, the greater the number of amorphous phases involved in the making of the material, the more likely the phenomenon would occur.

Finally, the displacement percentages were significantly different between the two types of samples. Nanofibre structure is less sensitive to mechanical flow under strain. Producing PLLA nanofibres is again dependent on the initial spinning conditions, and solution concentration has a significant effect on the characteristics of PLLA nanofibres. A 4% PLLA solution enabled us to air spin better quality nanofibres. They displayed higher crystallinity and less sensitivity towards relaxation phenomena. This latter property brings better dimensional stability, which is a clear advantage if such a material is to be implanted in humans.

4.7.2. PLLA fibres adhesion optimization

Contact angle measurements show that both the air and the N_2 plasma treatments modified the PET films into a more hydrophilic material (Figure 32). Surface modification and kinetics over time were comparable for both treatments. The APDBD-treated PET films were more wettable, and despite an increased contact angle after two days, this level remained under that of the virgin PET sample. APDBD treatment therefore enabled the modification of a hydrophobic material into a more hydrophilic one, which is encouraging when optimizing surface adherence. Moreover, this modification lasted over time.

XPS analyses confirm that the APDBD surface modification showed fundamentally different kinetics when air atmosphere was involved, as opposed to a nitrogen one, despite a high concentration of nitrogen in the air composition. As previously demonstrated[192], when oxygen is present in the plasma gas, it controls the surface chemistry and degradation ensues. Results show the appearance of oxidative species on the PET surfaces (film or textile) with air APDBD. Both visual inspection of the air-treated samples and AFM imaging (Figure 35) point to surface degradation and a clustering of LMWOM on the PET film, as supported by surface treatment studies using oxygen species[207-209]. These LMWOM reorganized over time, with O/C decreasing after a few days without reaching the initial level of the virgin PET (Figure 33). Alternately, N₂ APDBD allowed for a less destructive modification on the PET surfaces (film or textile), with no or few oxidative species created on the surface and the presence of grafted nitrogenous groups (appearance of one N peak on the XPS spectra). Moreover, N₂ APDBD surfaces were less sensitive to aging, thus creating an opportunity to preserve surfaces for up to 15 days (Figure 34).

AFM, XPS, and contact angle analyses provide convincing evidence that APDBD treatments present comparable surface modifications when used on PET film and PET textile and that these modifications are both non-destructive and stable over time.

Results of the peeling tests show an average value of required forces to remove the PLLA fibres from its PET film substrata. Continuous stages with peaks are associated with the normal running of the delaminating layer of PLLA by the tape band. Results indicate that the plasma treatment on the PET films increased the adherence of the PLLA fibres. A similar phenomenon was observed in another context where plasma treatment was involved[210]. Moreover, despite the detrimental effect of low molecular weight oxidized material (LMWOM) on adhesion[208], the air-treated surfaces displayed a significant increase ($p < .001$), compared to the non-treated PET film. N₂ treatment therefore produced better results, with a significant difference ($p < .001$) twice that of the non-treated surfaces and statistically higher than that observed with the air-treated surfaces ($p < .001$). These results are promising as a solution in terms of PLLA nanofibre adherence optimization. Indeed, these findings show that APDBD plasma treatments provide identical surface modifications on PET films and PET textiles. In addition, such surface treatment have

demonstrated their efficiency on textiles [211], and are adaptable to tubular shapes[212] and commonly used in continuous manufacturing processes. Therefore it is likely that APDBD plasma treatments could bring better adhesion of PLLA nanofibres sprayed onto plasma treated PET textiles, as demonstrated for PET films.

It is not straightforward to compare shear stresses due to blood flow with forces resulting from a peel test. Indeed, the peel geometry is not known a priori and therefore, it is difficult to elaborate a model capable to describe delaminating fibres during this mechanical test which involves viscoelastic properties of the fibres. However, it can be hypothesized, as first approximation, that the peel stress should be related to a surface obtained by multiplying the peel front width with a length resulting from the projection in the longitudinal direction of the backing tape radius. This surface, equal to 10^{-5} m² in this study, allows evaluating adhesive stresses of 135kPa, 115kPa and 60kPa for PLLA nanofibres sprayed on N₂, air and non treated PET film, respectively. In addition, it is reasonable to believe that adhesion forces would be lower on PET textile. Even with a drastic reduction, these adhesion forces, they would still be much higher than physiological shear stress exerted by the blood flow (1 to 7 Pa).

One issue that arises in the approach presented herein is related to the time that PLLA fibres will remain after exposure to blood and implantation and how long will they remain on the textile structure before degradation. In addition, questions also arise as to the time of residence required to positively influence endothelial cell attachment and growth. Finally, one may also question possible interference between fibre degradation and endothelial cell attachment and proliferation. No clear answer is available at the present time. These important issues will require *in vivo* evaluation to conclude in a definitive manner on the potential of PLLA nanofibre coatings to promote endothelial cell growth on PET arterial prostheses.

4.8. Conclusion

This study on the physico-chemical properties of PLLA provides a better understanding of the air spinning process. The air spinning method presented here will enable us to transform

a single droplet of solubilized PLLA into a mesh of interlinked nanofibres. A high drawing ratio allows for an increase of PLLA crystallinity without reaching maximum values reported in the literature for other kinds of fibre processes [159]. This study shows that a 4% PLLA solution results in higher crystallinity and lower relaxation, which signifies greater stability over time. Moreover, a heating cycle up to 80°C is sufficient to remove chloroform from nanofibres. The APDBD treatment of PET is effective for both PET film and textiles to increase the adherence of PLLA nanofibres, with necessary stability over time.

The primary goal in providing this description of PLLA nanofibre properties is to increase the understanding of the nature of air-spun PLLA as a nanofibre mesh. PLLA mesh is created to support endothelial cell proliferation on the inner surface of textile prostheses following implantation and to follow its movement within a vascular prosthesis. Endothelial cell viability has already been demonstrated[187], and this study confirms that air spinning is possible inside tubular shaped textile prostheses. When covered by a PLLA nanofibre mesh, textile prostheses display low water permeability with levels that are acceptable for clinical use.

This innovative approach for textile vascular grafts therefore introduces a promising new concept: the partially biodegradable vascular substitute. The very simple and affordable air spinning process is much more than a laboratory curiosity, as it can be readily transferred to industrial applications. Moreover, by emphasizing the capability of a simple yet efficient plasma treatment, it was show the possibility of improving PLLA nanofibre adherence on PET textile fibres. Further studies must be undertaken to investigate the blood compatibility, aging behaviour, and long-term degradation (both in vitro and in vivo) of PLLA nanofibre scaffold, as well as fine characterization of air spinning system as a viable process for vascular textile prosthesis optimization.

4.9. Acknowledgments

The authors wish to thank Cardial for providing the prosthesis samples. This research was supported by NSERC-Canada (GL). Sébastien François also acknowledges GEPROVAS,

A. V. Wallach and the L. Dreyfus Foundation (Mulhouse, France), and the Region Alsace (France) for their financial support. Sincere thanks to Stéphane Turgeon from LIS (Québec, Canada) for his precious assistance and advice on the design of the air spinning system. We are also indebted to Professors C. Delaite and K. Hairiri from the ESCMU (Mulhouse, France) for their kind cooperation with GPC and their expertise regarding PLLA. The encouragements, advice, and support of M. Nardin, K. Anselme, L. Vidal, and F. Snell from the ICSI-CNRS (Mulhouse, France) in the field of image analysis are also greatly appreciated.

5. Discussion générale

5.1. Discussion

5.1.1. Effet de la structure textile

Nous avons d'abord étudié l'effet de la structure du biomatériau prothétique sur le comportement des cellules endothéliales. Par une expérimentation *in vitro*, il a été mis en évidence que les cellules endothéliales sont facilement influencées par le substrat sur lequel elles prolifèrent. Une structure comme les matrices textiles en PET (tissées ou tricotées, avec ou sans effet velours) empêche le développement en monocouche et conduit inéluctablement à une prolifération anarchique tridimensionnelle.[179] Or cette prolifération anarchique va à l'encontre du phénotype endothélial qui mène normalement au développement en monocouche. Les cellules endothéliales sont incapables de produire les quantités importantes de matrice extracellulaire nécessaires pour combler les vides et les interstices propres aux matrices textiles en PET. Cette observation, ainsi que la nécessité d'éviter les pertes sanguines opératoires trop importantes liées à la grande porosité inhérente des prothèses textiles, justifie leur imprégnation par des revêtements protéiniques. Cependant, même si ces recouvrements permettent de minimiser le nombre de manipulations pendant l'acte chirurgical (suppression du « préclotting »),[35] leur gain en néoendothélialisation n'a pas été mis en évidence.[34] En effet, ces protéines sont souvent des collagènes réticulés ou bien des gélatines. Leur ressemblance biologique est très éloignée des tissus vasculaires, sans tenir compte du fait de la présence de résidus d'agents de réticulation.[150] Par ailleurs, d'autres auteurs ont observé que les couches denses de fibrine compactées dans la matrice textile forment une muraille presque infranchissable pour les bourgeons angiogéniques qui proviennent des tissus avoisinants, les vasa-vasorum, qui sont le vecteur de néoendothélialisation transmurale.[46] Donc grâce aux informations acquises lors de notre première étude (voir Chapitre 1), nous avons développé une nouvelle approche de transformation des prothèses vasculaires textiles. Le but est de fournir une interface propice à une néoendothélialisation en monocouche.

5.1.2. Création d'une interface biodégradable

Afin de créer une nouvelle interface dont les caractéristiques soient favorables au bon développement des cellules endothéliales, nous avons sélectionné un biomatériau synthétique biodégradable. Ceci permet de s'affranchir des variabilités de production inhérentes aux matériaux provenant de ressources naturelles (production animale pour le collagène ou la chitine pour le chitosan par exemple), ou bien des risques de contamination par des agents infectieux (prion, virus ou autre). Le choix s'est porté vers l'acide poly(L-Lactique) (PLLA), car c'est un polymère approuvé par la FDA pour l'implantation et largement utilisé en chirurgie.[165] Il est couramment utilisé en tant que biomatériau pour ses bonnes caractéristiques mécaniques, son taux de dégradation lent,[203, 213] et ses sous-produits de dégradation métabolisables par l'organisme. Il est facilement soluble dans de nombreux solvants, comme le chloroforme par exemple, sans effet sur le PET. De plus, il offre un très large éventail de caractéristiques mécaniques, de cinétiques de dégradation et de fonctionnalités biologiques avec la possibilité de le faire copolymériser avec d'autres polymères comme le polycaprolactone par exemple ,[214] sa capacité à stéréocomplexer entre ses énantiomères D et L lactiques,[185, 215] la possibilité de lui faire subir des traitements thermiques,[216] des modification de surface[217, 218] ou encore d'être mise en forme avec différents composants biologiques[90, 160, 219]. Le choix du PLLA permet donc de travailler avec un polymère largement connu dans le monde médical, largement étudié en recherche et qui autorise de nombreuses possibilités de modifications ou transformations afin de l'adapter au mieux aux besoins à venir.

Le défi majeur de ce travail de doctorat réside dans la mise en forme du PLLA pour réaliser l'interface permettant le développement en monocouche des cellules endothéliales. En résumé, l'interface en PLLA doit :

- fournir une surface géométriquement propice au développement en monocouche des cellules endothéliales ;
- être poreuse pour maintenir les échanges biologiques entre le sang et les tissus avoisinants tout en diminuant la perméabilité des prothèses (avoisinant le seuil de $0\text{mL}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$) ;

- être flexible pour suivre les déformations de la prothèse dans ses mouvements relatifs ainsi qu'au moment de l'implantation ;
- s'adapter à la forme des prothèses vasculaires textiles (tubes cosselés) ;
- adhérer à la surface interne de la prothèse ;
- être simplement et rapidement déposé pour faciliter une application industrielle.

Plusieurs techniques de mise en forme de l'acide poly(L-Lactique) sont décrites dans la littérature. Le trempage permet d'obtenir un scellant étanche non poreux, ce qui n'est pas satisfaisant pour des raisons de communication tissulaire.[64] Des méthodes de moulages, de lyophilisation ou de précipitation par séparation de phase permettent la formation de structure poreuse. Cependant, il est à noter la taille très grande des pores obtenus et les étapes successives du procédé le rendant complexe à industrialiser. Sachant que les cellules endothéliales font une dizaine de micromètres de diamètre en suspension et qu'une fois étalées elles peuvent atteindre une quarantaine de micromètres de diamètre, il est donc important d'avoir une structure dont la taille de pores est inférieure d'un ordre de grandeur à la plus petite taille des cellules endothéliales.

L'électrospinning est une des méthodes les plus couramment employées pour produire des petites structures de polymère, souvent à l'échelle nanométrique.[90, 160, 220] Les nanofibres obtenues pourraient être de bonnes candidates pour la formation de notre interface de PLLA à la surface des prothèses. Cependant, le procédé d'électrospinning nécessite l'extrusion de la solution de polymère dans un champ électrique de haute tension. S'il est possible de recouvrir la face externe d'un tube avec une couche de nanofibres par électrospinning,[219, 221-223] ce procédé s'avère inapplicable à la face interne d'un tube en raison des risques d'arc électrique et du chemin nécessaire à la fibre pour se former dans le champ électrique. Toutefois, la forme fibrillaire est intéressante, car elle permet de préserver une porosité tout en formant un substrat capable de retenir les cellules endothéliales. De plus, les fibres possèdent de bonnes caractéristiques mécaniques et forment un matériau souple et résistant comparativement au même matériau massif. Les procédés de filage sont nombreux, comme le filage à l'état fondu (melt spinning), le filage

à sec (dry spinning), le filage au mouillé (wet spinning) ou encore filage par jet (jet spinning)[197]. La plupart de ces procédés sont conçus pour la production industrielle de fibres qui sont collectées, traitées et ensuite bobinées pour un usage ultérieur (fabrication textile).

De l'ensemble de ces procédés de mise en forme, il peut être retenu plusieurs concepts utiles à la conception d'un système de mise en forme du PLLA pour satisfaire notre cahier des charges. Le premier est que la forme fibrillaire et plus précisément la forme nanofibrillaire est certainement la plus appropriée en terme de porosité, de souplesse et de résistance mécanique. Le second concept est qu'une solution de polymère éjecté depuis un fin capillaire est à même de former des fibres sous certaines conditions d'évaporation et d'étirement. Si un champ électrique ne peut être utilisé dans l'espace confiné d'un tube textile, un jet d'air peut lui aussi servir d'agent d'accélération capable d'étirer la solution de polymère éjecté du capillaire et de vaporiser le solvant.

Cette revue de l'état de l'art technologique a donc permis de mettre en lumière les principes fondamentaux permettant la réalisation d'un système de filage d'une solution de polymère éjectée par un capillaire et étirée par un jet d'air pour former des fibres de PLLA de petite taille. Afin de déterminer le potentiel de ce nouveau procédé de filage, que l'on a nommé filage par jet d'air, un prototype a été réalisé à l'aide d'un pousse-seringue et d'un atomiseur modifié, alimenté en air médical comprimé et au travers duquel est éjectée la solution de PLLA (voir Chapitre 2).

Le premier résultat remarquable fut la rapidité de production de fibre, avec une capacité de couverture des substrats présentés de l'ordre de quelques minutes. Cette vitesse est à mettre en perspective avec les temps relativement longs nécessaires à l'électrospinning pour produire les mêmes résultats (jusqu'à 24h). Le diamètre des fibres obtenues par notre procédé de filage par jet d'air est influencé par la concentration de la solution de PLLA, avec $0.258 \pm 0.146 \mu\text{m}$ pour une solution à 4% et $0.328 \pm 0.238 \mu\text{m}$ pour celle à 7%. Ces fibres ont donc un diamètre largement inférieur au micron et peuvent donc être qualifiées de nanofibres. Cette taille de fibres convient donc pour notre projet de recouvrement des prothèses vasculaires, car elle se situe en dessous de la taille des cellules endothéliales. La solution à 1% quant à elle ne permet pas la formation de fibres. L'augmentation de la

pression d'air provoque la rupture des nanofibres, qui se déposent alors fragmentées sur les substrats sélectionnés. L'augmentation du débit de la solution de polymère provoque la formation de gouttelettes qui viennent s'écraser sur les nanofibres. Le maintien de ces deux paramètres aux niveaux minimums permet de maximiser la qualité des nanofibres obtenues. Il faut toutefois noter que parmi les trois paramètres sélectionnés, seule la concentration de la solution de polymère possède une influence sur le diamètre moyen des fibres obtenues. Celui-ci est donc probablement piloté par d'autres caractéristiques comme le diamètre du capillaire, la nature du polymère (chaîne ramifiée, masse moléculaire, indice de polydispersité...) ou encore la nature du solvant (tension de surface, point d'ébullition...). Ces paramètres n'ont pas été étudiés dans le cadre de ce travail doctoral.

Des échantillons de prothèses vasculaires textiles (PET tricoté provenant de semi-fini Cardial Dialine II) ont été recouverts d'une couche de nanofibres de PLLA (quelques microns d'épaisseur) et ont été soumis au test de perméabilité qui détermine la quantité d'eau qui s'échappe de l'échantillon à une pression de 130mmHg, sous une surface de 1cm² pendant une minute. Nos échantillons recouverts de nanofibres de PLLA montrent bien une diminution significative de la perméabilité ($8,2 \cdot 10^2 \pm 0,9 \cdot 10^2$ mL/min.cm² (n = 7) contre $1,26 \cdot 10^3 \pm 0,13 \cdot 10^3$ mL/min.cm² (n = 10) pour les échantillons non recouverts). Cette forte diminution est encourageante et permet d'envisager l'atteinte d'un seuil clinique en augmentant l'épaisseur des couches de nanofibres. La cytocompatibilité de ces nanofibres a ensuite été analysée par le biais de cultures de cellules endothéliales. Les tests d'adhérence ont montré que les cellules endothéliales étaient plus nombreuses à adhérer sur les structures textiles que sur les surfaces planes comme le film de PET et les nanofibres de PLLA, ce qui est en accord avec nos précédents travaux qui montraient l'effet protecteur des structures textiles lors du lavage du test d'adhérence[179]. Les tests de prolifération ont quant à eux mis en évidence des cellules endothéliales proliférant non seulement bien sur les nanofibres, mais également en respectant leur phénotype par une organisation en monocouche. Des résultats de prolifération inférieure ont été constatés sur les structures textiles brutes et sur les films de PET, probablement dus à la perte d'amplification de colonie liée aux agglomérats isolés de cellules pour celles-ci et au manque de structuration de surface pour ceux-là. Les cellules endothéliales sont sensibles à la nanostructure de leurs substrats [65, 66, 174, 180] et les images d'AFM ont montré que les nanofibres de PLLA

possèdent des aspérités de surface qui pourraient être à l'origine de l'amélioration leur adhérence des cellules endothéliales. Par ailleurs, nos analyses n'ont montré aucune trace de chloroforme rémanent dans le PLLA sous forme de nanofibres, mais ces résultats sont à considérer avec le niveau de sensibilité des techniques utilisées (XPS et FTIR). La chimie de surface ne peut donc pas être totalement écartée pour expliquer ces résultats de prolifération cellulaire.

Ces résultats sont encourageants, car ils valident le procédé de filage par jet d'air pour la production de fibres de PLLA de taille nanométrique. Ces nanofibres ont montré un fort potentiel pour la réduction de la perméabilité de la paroi des prothèses vasculaires textiles. De plus, les couches de nanofibres de PLLA sont restées cohésives et adhérentes à la surface de la prothèse par ancrage mécanique qui s'opère au moment du filage sous la buse de notre système. Elles suivent la matrice textile dans ses déformations lors de la manipulation des échantillons. Enfin, les nanofibres de PLLA ont offert une réelle interface sur le textile permettant la prolifération en monocouche des cellules endothéliales. Cette interface pourrait donc jouer un rôle déterminant dans le processus de cicatrisation et de colonisation de la prothèse vasculaire textile en PET. En effet, au moment de l'implantation, les nanofibres de PLLA forment une barrière bloquant le sang et le dépôt fibrine, évitant ainsi le remplissage de la matrice textile avec un agglomérat de protéines plus ou moins dénaturées qui sont peu propices à l'angiogenèse. Les nanofibres de PLLA maintiennent donc l'espace interstitiel ouvert entre les fibres textiles et les tissus avoisinants. Ce faisant, ceux-ci peuvent alors entamer le processus de cicatrisation et amorcer la croissance de capillaire au travers la matrice textile. Au moment où les capillaires atteindraient la couche de nanofibres de PLLA, le processus de dégradation du polymère aurait commencé et permettrait par la déstructuration progressive de la couche de nanofibres. Ceci laisserait de l'espace à la croissance de ces capillaires, ce qui pourrait alors amorcer une endothélialisation transmurale. Cette forme d'endothélialisation, en opposition à celle transanastomotique (migration de l'anastomose vers la prothèse), semble être pour Zilla le mécanisme principal d'endothélialisation chez l'homme.[46] Dans le cas du rôle des fibres de PLLA, il reste évidemment qu'un long chemin reste à faire avant valider cette hypothèse, mais il est nécessaire d'intégrer le développement de cette nouvelle approche dans une vision globale de la problématique vasculaire.

5.1.3. Adaptation du filage par jet d'air aux prothèses tubulaires

Les travaux ont ensuite été poursuivis dans le but d'adapter le procédé de filage par jet d'air à la forme tubulaire des prothèses vasculaires. Pour cela un système d'injecteur long et de faible diamètre a été développé permettant de plonger profondément dans une prothèse en s'insérant par une de ses extrémités. Un système de maintien des prothèses a été également conçu pour la tenir déployée et gonflée. L'injecteur produit donc des nanofibres et permet de les déposer sur la surface interne de la prothèse déployée. Les nanofibres obtenues sont comparables avec celles produites avec le prototype. Elles forment une couche cohésive capable de diminuer la perméabilité de la prothèse jusqu'à 25 ± 11 mL/min.cm², soit très proche du seuil d'étanchéité qui est le seul niveau acceptable cliniquement. Les fibres semblent subir un processus de formation différent suivant qu'elles sont produites à partir d'une solution à 4% ou à 7%. Une chute de la masse moléculaire en nombre est observée pour le filage de solution de PLLA à 7%, probablement due à une contrainte de cisaillement trop importante soit dans l'acheminement de la solution ou durant l'étirage[196, 197]. Cette diminution n'est pas constatée pour la solution à 4% et pourrait être le bénéfice du à une solution moins concentrée dans laquelle les chaînes macromoléculaires sont moins enchevêtrées. Ceci diminuerait le risque de scission de chaîne par contrainte de cisaillement trop élevée[195]. Les variations de la température de transition vitreuse avant un dégazage en fonction du vieillissement indiquent des cinétiques de relargage différentes du chloroforme rémanent dans le polymère, traduisant aussi un mécanisme d'évaporation différent au moment du filage. Ce chloroforme a semblé avoir un effet plastifiant[201], diminuant la T_g des nanofibres obtenues et a semblé toutefois totalement disparaître après 3min de dégazage à 80°C. En effet, après le dégazage, la T_g des fibres de PLLA est redevenue très similaire à celle rapportée dans la littérature[167, 197, 198]. La cristallinité était supérieure pour les nanofibres de PLLA issues de la solution à 4%, soit près de 20% par rapport au 9% pour les fibres issues d'une solution à 7%. De manière générale, une solution de 7% soumise au filage de notre système par jet d'air semble résister plus fortement à l'étirement. La formation d'une peau de polymère séché en surface des fibres pourrait expliquer pourquoi le chloroforme paraît être piégé dans des interstices. Ainsi capturé, il lui faudrait plus de temps pour s'échapper et ce faisant il agirait alors en déstructurant les zones cristallines. Cette hypothèse semble être vérifiée par la

diminution du taux de cristallinité des fibres issues d'une solution à 7% de chloroforme. La plus faible viscosité de la solution de 4% de PLLA permettrait une meilleure mobilité des chaînes, favorisant la cristallisation sous l'étirement. Enfin, le chloroforme qui s'évaporerait plus graduellement semble être réparti de manière plus homogène au sein du polymère et son effet plastifiant diminuant avec le temps, proportionnellement à son évaporation. L'augmentation de la température de fusion entre les fibres de 7% et de 4% semblerait liée à l'augmentation concomitante du taux de cristallinité. Les seconds pics de fusion observés pour les fibres à 4% pourraient quant à eux être associés à la recristallisation liée à la DSC[202]. De manière plus hypothétique, la présence de ces seconds pics de fusion pourrait être aussi associée à un troisième type d'organisation polymérique, la zone orientée. Cette conformation particulière est à mi-chemin entre la forme cristalline et la forme amorphe, avec des chaînes plus ou moins alignées, mais qui n'ont cependant pas réussi à cristalliser. Les fibres issues du filage de solution à 4% présentant les meilleurs taux de cristallinité. Ceci a un impact intéressant dans le domaine biomédical pour déterminer les cinétiques de dégradation[203] et améliorer les propriétés mécaniques[204]. Les phénomènes de relaxation observés peuvent être associés au blocage des nanofibres, maintenues sous contraintes pendant les tests d'analyse mécanique dynamique (DMA) et pendant qu'elles vieillissaient maintenues en position sur leurs porte-échantillons. De manière générale, plus la phase amorphe est importante et plus le vieillissement est long, plus les nanofibres se relaxent. Ce phénomène semble donc être majeur pour les fibres produites à partir d'une solution à 7% après 7 jours de vieillissement. Le réarrangement occasionné dans les chaînes macromoléculaires réoriente celles-ci, transformant ainsi certaines parties de la zone amorphe en zone orientée. En effet, les images de TEM ont bien montré des fibres très petites, de l'ordre de la dizaine de nanomètres de diamètre dans lesquelles le PLLA ne peut pas réellement cristalliser normalement. Il est probable alors qu'il se forme des zones orientées, où les chaînes macromoléculaires seraient alors arrangées sous forme de fagot.

5.1.4. Optimisation de l'adhésion des nanofibres

Afin d'optimiser l'ancrage des nanofibres de PLLA sur la face interne des prothèses vasculaires textile, des travaux ont été conduits sur l'utilisation d'un système de

modification de surface du PET. La modification de surface est couramment employée pour améliorer les propriétés de mouillabilité d'un matériau, ou pour y greffer des fonctionnalités chimiques d'intérêt. L'attaque de la surface d'un matériau par des acides ou des bases est l'une des façons les plus simples de modifier les caractéristiques de surface. Dans le cas des polymères, a fortiori dans leurs applications biomédicales, il est sage d'éviter ce genre de traitements qui peuvent facilement occasionner des dégradations profondes avec des modifications des caractéristiques mécaniques, ou bien encore une contamination chimique. Le traitement de surface par plasma s'avère quant à lui plus approprié pour les applications médicales, avec un traitement qui modifie efficacement la surface sans transformer les propriétés du matériau massif[210]. Si de nombreuses études montrent l'efficacité des traitements à basse pression pour modifier des polymères[119, 210, 224, 225], ces traitements nécessitent cependant des équipements de pompage coûteux afin de créer un vide poussé pour opérer une décharge de qualité. Dans un souci de maintenir un choix de solutions technologiques applicables aisément au niveau industriel, nos regards se sont naturellement portés vers les plasmas à pression atmosphérique à barrière diélectrique (APDBD), communément appelé traitements « corona ». Ces traitements simples et peu coûteux sont couramment employés pour la production en continu de film de polymère afin de permettre leur impression[192, 226]. Les traitements APDBD ont fait leurs preuves dans le traitement de biomatériaux[181] et sont à même de traiter la surface interne des prothèses vasculaires[212]. L'objectif était donc de démontrer le potentiel de traitement des surfaces textile en PET et de mesurer le gain en adhésion des nanofibres de PLLA. Dans un premier temps, des échantillons de films de PET et de textile de PET (provenant des prothèses Cardial Dialine II) ont donc été soumis à un traitement APDBD sous atmosphère d'azote (N_2) et d'air. Les résultats nous montrent clairement que la nature des modifications chimiques est la même quelque soit la structure de l'échantillon. Le traitement APDBD sous atmosphère d'air crée beaucoup d'espèces oxydées à faibles poids moléculaires (LMWOM) en surface du PET.[208] Les domaines s'accumulent modifiant ainsi la topologie[207], et rendent opalescent un film au préalable transparent. Un traitement APDBD sous atmosphère d'azote permet quant à lui de limiter les espèces oxydées, tout en greffant des fonctions azotées. Ces traitements de surface ont été également suivis dans le temps et les modifications sont stables après une courte période de

réarrangement. La mouillabilité des échantillons est grandement améliorée quelque soit le traitement et après une remonté des angles de contact après deux jours, la mouillabilité est stabilisée à des seuils d'au moins 25% inférieurs à la normale. Des angles de contacts ont pu être mesurés autour de 110° sur le textile de PET avant traitement. Après traitement, la mouillabilité est améliorée de manière remarquable. En effet, la goutte du goniomètre est aspirée par capillarité, quel que soit le traitement, et ceci, même après 15 jours. Ces résultats nous permettent de conclure de l'efficacité du traitement APDBD sur le PET et que les modifications apportées sont comparables entre un film et un textile. Dans un deuxième temps, nos travaux ont porté sur l'adhérence des nanofibres de PLLA sur le PET. Des nanofibres de PLLA ont été déposées sur des échantillons de film de PET, ayant subi ou non un traitement APDBD à l'air ou à l'azote. Le test d'adhérence des nanofibres développé dans cette étude est inspiré des tests de pelage ASTM[227]. Le traitement APDBD permet une amélioration significative de l'adhérence des nanofibres de PLLA sur les films de PET traités. Les meilleurs résultats sont obtenus pour le traitement APDBD sous atmosphère d'azote. Les niveaux d'adhérence inférieurs reportés pour le traitement APDBD à l'air s'expliquent certainement par l'effet délétère que peuvent avoir les LMWOM sur l'adhérence[208]. Ces travaux nous montrent donc la possibilité de traiter les prothèses textiles en PET avec un procédé simple, adaptable à la forme tubulaire des prothèses et facilement industrialisable. Ce traitement améliore l'adhérence des nanofibres de PLLA, permettant ainsi de minimiser les risques de délaminage des nanofibres. Cette délamination pouvant intervenir lors de la manipulation des prothèses ou sous la contrainte de cisaillement du flux sanguin.

5.2. Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat constituent une première étape dans le développement d'une prothèse vasculaire textile en PET recouverte d'une interface synthétique biodégradable destinée à promouvoir l'endothélialisation *in vivo*. Nous avons prouvé la faisabilité d'un procédé de filage par jet d'air, adaptable à la forme tubulaire des prothèses textiles, capable de produire des fibres de polymère aux dimensions nanométriques. L'étude de la nature de ces nanofibres a permis de définir des paramètres

ajustables pour contrôler leur diamètre, leur cristallinité ainsi que la qualité de l'ensemble de l'interface produite par rapport au nombre de fracture de fibres et de gouttelettes de solution de polymère projetées. Il a par ailleurs été démontré que l'adhérence de cette interface de nanofibres de PLLA pouvait être améliorée au moyen d'un traitement par plasma à pression atmosphérique. Enfin, les cellules endothéliales ont montré qu'une couche de nanofibres de PLLA déposée sur une prothèse textile était à même de promouvoir leur prolifération en monocouche.

Il reste maintenant plusieurs aspects de ce projet à développer plus en profondeur. Le premier concerne le choix du PLLA. Celui-ci a été fait, rappelons-le, dans le but d'utiliser un polymère reconnu par la communauté biomédicale et déjà utilisé en tant que biomatériaux. Le choix de ce polymère doit maintenant également prendre en considération la réponse biologique qui suit l'implantation d'un biomatériau dans le réseau vasculaire, comme la thrombose ou l'inflammation. Cette réponse doit également être considérée au regard de la dégradation du polymère. Les cinétiques d'hydrolyse doivent être coordonnées avec le cycle d'événements biologiques après implantation comme le dépôt de protéines plasmatiques et l'envahissement cellulaire. Ainsi, une étude des rythmes et des mécanismes de dégradation des nanofibres de PLLA pourrait être conduite. Il faudrait pour cela faire des essais d'hydrolyse en solution de Hank, voir éventuellement dans un système de circulation de fluide. Des analyses de cristallinité (DSC, SAXS-WAXS) permettraient également de mieux comprendre le processus de dégradation et les structures cristallines des nanofibres de PLLA. De plus, il serait également nécessaire de vérifier la réponse inflammatoire des cellules endothéliales qui se développeraient sur des nanofibres de PLLA en cours d'hydrolyse. Enfin, des tests biologiques d'agrégation plaquettaire et d'hémocompatibilité compléteraient avantageusement les investigations. Enfin, il est clair qu'une expérimentation animale reste nécessaire en préambule à toute poursuite de développement d'un tel projet. Cette expérimentation pourrait se faire dans un premier temps par l'implantation sous-cutanée chez le rat d'échantillons de prothèses textiles de PET recouverts de nanofibres de PLLA. Ceci permettrait de vérifier la réaction inflammatoire provoquée par cette implantation et par la dégradation du polymère. Ensuite, il conviendrait également de tester le potentiel réel d'endothélialisation de notre nouveau substitut en l'implantant dans des animaux de grande taille (chien, mouton, porc) des

sections de prothèse vasculaire recouverte de nanofibres. Cependant, le coût élevé de ces tests *in vivo* est évidemment un frein à ces expérimentations. Malgré tout, si ces tests sont possibles, alors il faudrait pouvoir les réaliser en prenant soin d'implanter des échantillons les plus longs possible afin de mieux distinguer les processus d'endothélialisation (transanastomotique ou transluminal).

Si le PLLA ne s'avère pas être le choix optimal, de nombreuses options de modification sont possibles, notamment en combinant le PLLA avec du PDLA, du PGA ou encore du PCL, des polymères biodégradables couramment employés pour les fils de sutures par exemple[157], permettant de moduler largement les caractéristiques mécaniques et physico-chimiques du PLLA. De plus, il serait intéressant d'intégrer le concept de fonctionnalisation au sein de la prothèse vasculaire partiellement biodégradable. La matrice textile pourrait faire l'objet d'un traitement de surface visant à contrôler et à favoriser l'angiogenèse par le biais de biomolécules d'intérêts[11, 228]. La couche de nanofibres de PLLA pourrait voir sa capacité de dégradation exploitée pour permettre le relargage de médicament[106, 107, 229] ou d'autres molécules (facteurs spécifiques), selon une cinétique déterminée. Ceci permettrait de minimiser le dépôt de fibrine en surface des nanofibres et la prolifération de cellules autres qu'endothéliales (cellules musculaires lisses par exemple[230, 231]) et de favoriser le recrutement de cellules endothéliales.

Un autre aspect de ce projet concerne le mécanisme de production de nanofibres du procédé de filage par jet d'air. Si certains paramètres ont une influence sur la taille et la nature des nanofibres obtenues, comme la concentration de la solution filée, la pression d'air et le débit de polymère, le mécanisme réel de formage des nanofibres reste encore inconnu. Des travaux complémentaires permettraient de découvrir les mécanismes sous-jacents à la genèse des fibres. Une approche intéressante pourrait être de chercher à orienter les nanofibres de PLLA et de les analyser finement en DMA dans le but de s'affranchir de la problématique de la réorientation des nanofibres sous l'effort, parasitant en partie l'interprétation de leurs caractéristiques viscoélastiques. Une approche systémique combinant la variation des paramètres de pulvérisation et des conditions de vieillissement contribuerait à élucider l'importance des zones amorphes, cristallines et hypothétiquement orientées dans le comportement du polymère. Des analyses WAXS plus exhaustives

mettraient en lumière la structure cristalline et des analyses en DSC modulée aideraient à mieux comprendre et vérifier le comportement thermique du polymère sous sa forme nanofibrillaire.

Enfin, un aspect intéressant du projet est celui concernant l'adhérence des nanofibres de PLLA sur le textile de PET. Cette problématique abordée dans ce travail mériterait d'être plus explorée, pour mieux comprendre et mieux estimer le niveau d'adhérence des nanofibres. Est-ce que la fonctionnalisation par traitement APDBD greffant des fonctions azotées permet l'ancrage covalent du polymère, ou est-ce simplement un ancrage par contact, favorisé par l'augmentation de l'hydrophilicité du matériau ? Le développement de tests de traction, inspiré du test de pelage utilisé, offrirait l'opportunité d'évaluer directement les efforts nécessaires à l'arrachement de la couche de nanofibres en surface des textiles de PET. Il serait également intéressant de tester l'adhérence des fibres de PLLA à l'intérieur d'une prothèse dans un banc d'essai qui permettrait la circulation d'un fluide suivant un flux pulsé.

Ce projet de doctorat s'insère donc dans un environnement de recherche en biomatériaux vasculaires très dynamique. Plusieurs thèmes ont émergé ces dernières années et parmi ceux-ci l'ingénierie tissulaire. Celui-ci suscite le plus d'espoir par rapport aux résultats encourageants obtenus à ce jour[94, 146] relativement aux objectifs à atteindre, à savoir la reconstruction totale et fonctionnelle d'un vaisseau sanguin. Cependant, cette voie est également la plus longue et de nombreuses années risquent de s'écouler avant de voir la commercialisation d'une application concrète destinée à l'homme. Notre approche combine une des notions les plus fondamentales de l'ingénierie tissulaire (en fournissant temporairement un support à la croissance des cellules) avec un produit conventionnel (les prothèses vasculaires textiles), afin de maintenir les propriétés mécaniques à long terme du substitut. Ce concept du substitut partiellement résorbable s'inscrit également dans un contexte où l'industrie biomédicale est frileuse d'expérimenter des concepts totalement nouveaux comme les produits issus de l'ingénierie tissulaire, difficile à intégrer dans un univers très réglementé et contrôlé[149] et où les procès coûtent chers et sont très préjudiciables en terme d'image[55, 232, 233].

Pour finir la revue des perspectives de ce projet, plusieurs autres applications du concept de filage par jet d'air sont envisageables. Une de celles-ci est la possibilité de réaliser des échafaudages biodégradables pouvant être utiles à l'ingénierie tissulaire d'autres organes mous, comme la vessie par exemple. En effet, la technique de filage par jet d'air permet le dépôt de nanofibre sur de nombreux supports, que ce soit le fond d'une boîte de culture ou sur une membrane flexible. La forme cotonneuse des agglomérats de nanofibres peut également être une bonne matrice tridimensionnelle à forte porosité, permettant une bonne circulation des fluides de culture. En s'éloignant du domaine des biomatériaux, il est à noter les applications dans le domaine de la filtration qui semblent également être prometteuses, notamment dans la niche particulière de la nanofiltration.

Conclusion générale

Ce projet de doctorat a permis de confirmer que les cellules endothéliales sont sensibles à la structure du substrat sur lequel elles sont amenées à se développer. Il a particulièrement mis en évidence l'importance de la géométrie et de la surface spécifique des textiles des prothèses vasculaires en PET qui empêchent les cellules endothéliales de proliférer en monocouche. Une fois ce constat fait, une stratégie d'optimisation de la surface textile a été mise en place dans le but de remplacer les recouvrements protéiniques ne permettant pas une néoendothélialisation efficace. Un système de filage par jet d'air a été développé pour produire des nanofibres d'acide poly(L-Lactique). Ces nanofibres permettent de créer une interface capable de soutenir un développement en monocouche des cellules endothéliales. De plus, cette interface biodégradable reste flexible et cohésive, tout en scellant la paroi prothétique. Une seconde version du système de filage a été développée, permettant cette fois-ci le dépôt des nanofibres directement à l'intérieur de la prothèse vasculaire. Ainsi recouvertes, la perméabilité des prothèses textiles a été réduite à des niveaux proche du seuil clinique. Enfin, dans le souci de minimiser les risques de délamination, un traitement de surface par plasma à pression atmosphérique sous azote permet d'augmenter significativement les niveaux d'adhérence des nanofibres de PLLA sur un substrat de PET. Ce travail doctoral a permis d'atteindre les objectifs fixés, et propose donc une nouvelle approche dans le développement d'un substitut vasculaire partiellement résorbable. Le procédé développé est simple et innovant. Il permet de produire des nanofibres de PLLA. De plus, les choix technologiques retenus possèdent un fort potentiel d'industrialisation.

Bibliographie

1. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. The Lancet, 2006. 367: p. 1747-1757.
2. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. 1993: Édition du Renouveau Pédagogique.
3. Red_White_Blood_cells.jpg, available from http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Red_White_Blood_cells.jpg, 2009-04-22
4. Mackman, N., *Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(6): p. 1015-1022.
5. Coeur1 et Coeur2, available from <http://www.medecine-et-sante.com/anatomie/coeurvasc.html>, 2009-04-22
6. Anatomie, available from: www.fibromyalgiesos.com/FM/anatomie.html, 2009-04-22
7. Kratz, J.R., et al., *Fluid mechanical forces as extrinsic modifiers of endothelial function*, in *Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
8. Human Physiology 4th, Fox, Stuart I, Brown Publishers
9. Hayoz, D. and P. Silacci, *Biologie de la cellule endothéliale, apport des modèles expérimentaux*. Sang Thrombose Vaisseaux, 2006. 18(6): p. 318-24.
10. Libby, P., M. Aikawa, and M. Jain, *Vascular endothelium and atherosclerosis*. Handb Exp Pharmacol. , 2006. 176 (2): p. 285-306.
11. Ferrara, N., R. Lin, and J. LeCouter, *Vascular bed-specific signaling and angiogenesis in Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
12. Hebbel, R.P. and A. Solovey, *Blood endothelial cells in Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
13. Rafii, S. and J. Edelberg, *Determination of endothelial heterogeneity by the recruitment of bone marrow derived endothelial progenitors in Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
14. Van Craenenbroeck, E.M. and V.M. Conraads, *Endothelial progenitor cells in vascular health: Focus on lifestyle*. Microvascular Research, 2009. In Press.
15. Pompilio, G., et al., *Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: Clinical implications*. International Journal of Cardiology, 2009. 131(2): p. 156-167.
16. Ait-Oufellaa, H., E. Mauryb, and G. Offenstadt, *L'endothélium : un nouvel organe* Réanimation, 2008. 17(2): p. 126-136
17. Jacobson, J.R., S.M. Dudek, and J.G.N. Garcia, *Differential regulation of endothelial cell barrier function in Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
18. Dardik, A., et al., *Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells*. Journal of Vascular Surgery, 2005. 41(5): p. 869-880.
19. Inoguchi, H., et al., *The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft*. Biomaterials, 2007. 28(3): p. 486-495.
20. Walles, T., et al., *Functional neointima characterization of vascular prostheses in human*. The Annals of Thoracic Surgery, 2004. 77(3): p. 864-868.

21. Helmke, B.P. and P.F. Davies, *The Cytoskeleton Under External Fluid Mechanical Forces: Hemodynamic Forces Acting on the Endothelium*. Annals of Biomedical Engineering, 2002. 30(3): p. 284-296.
22. Gorbet, M.B., M.V. Sefton, and V. Michael, *Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes*. Biomaterials, 2004. 25(26): p. 5681-5703.
23. Thom, T., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics--2006 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2006. 113(6): p. e85-151.
24. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery,* Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation*. Circulation, 2006. 113(11): p. e463-654.
25. Breteler, M.M., *Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective*. Neurobiology of aging, 2000. 21(2): p. 153-60.
26. Stary, H.C., et al., *A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. 92(5): p. 1355-1374.
27. Cooke, J.P., *The diversity of vascular disease : a clinician's perspective*, in *Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
28. www.smtpl.com/diseases
29. Zenovich, A. and D. Taylor, *Atherosclerosis as a disease of failed endogenous repair*. Front Biosci., 2008. 1(13): p. 3621-36.
30. Faries, P.L., et al., *A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: All-autogenous conduit versus prosthetic grafts*. Journal of Vascular Surgery, 2000. 32(6): p. 1080-1090.
31. Cameron, A., et al., *Coronary Bypass Surgery with Internal-Thoracic-Artery Grafts -- Effects on Survival over a 15-Year Period*. N Engl J Med, 1996. 334(4): p. 216-220.
32. Seifalian, A.M., et al., *Improving the Clinical Patency of Prosthetic Vascular and Coronary Bypass Grafts: The Role of Seeding and Tissue Engineering*. Artificial Organs, 2002. 26(4): p. 307-320.
33. Voorhees, A., A. Jarezkilii, and A. Blackemore, *The use of tubes constructed from Vinyon N cloth in bridging arterial defects*. Annals of Surgery, 1952. 135: p. 332-6.
34. Chakfé, N., et al., *Substituts vasculaires*. Annales de Chirurgie, 2004. 129(5): p. 301-309.
35. Chakfé, N., et al., *Impregnated Polyester Arterial Prostheses: Performance and Prospects*. Ann Vasc Surg, 1999. 3: p. 509-523.

36. Greenwald, S.E. and C.L. Berry, *Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties*. The Journal of Pathology, 2000. 190(3): p. 292-299.
37. Sarkar, S., et al., *The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts: Their Role in Influencing Patency*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2006. 31(6): p. 627-636.
38. Haruguchi, H. and S. Teraoka, *Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review*. Journal of Artificial Organs, 2003. 6(4): p. 227-235.
39. Anderson, J.M., *Biological responses to materials*. Annual Review of Materials Research, 2001. 31(1): p. 81-110.
40. Baier, R.E. and R.C. Dutton, *Initial events in interactions of blood with a foreign surface*. Journal of Biomedical Materials Research, 1969. 3(1): p. 191-206.
41. Ratner, B.D. and S.J. Bryant, *Biomaterials: Where We Have Been and Where We are Going*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2004. 6(1): p. 41-75.
42. Vara, D.S., et al., *Cardiovascular tissue engineering: state of the art*. Pathologie Biologie, 2005. 53(10): p. 599-612.
43. Falkenback, D., et al., *Exposure of Plasma Proteins on Dacron and ePTFE Vascular Graft Material in a Perfusion Model*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2000. 19(5): p. 468-475.
44. Scott, C.F., *Mechanism of the participation of the contact system in the Vroman effect*. Journal of Biomaterials Science -- Polymer Edition, 1991. 2(3): p. 173-81.
45. Tai, N.R., et al., *Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction*. British Journal of Surgery, 2000. 87(11): p. 1516-1524.
46. Zilla, P., D. Bezuidenhout, and P. Human, *Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing*. Biomaterials, 2007. 28(34): p. 5009-5027.
47. Ao, P.Y., et al., *Development of Intimal Hyperplasia in Six Different Vascular Prostheses*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2000. 20(3): p. 241-249.
48. Cunningham, K.S. and A.I. Gotlieb, *The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis*. Laboratory Investigation, 2005. 85: p. 9-23.
49. Darouiche, R.O., *Treatment of Infections Associated with Surgical Implants*. N Engl J Med, 2004. 350(14): p. 1422-1429.
50. Swain, T.W., K.D. Calligaro, and M.D. Dougherty, *Management of Infected Aortic Prosthetic Grafts* Vascular and Endovascular Surgery, 2004. 38(1): p. 75, 8.
51. Chakfé, N., et al., *Influence of the Textile Structure on the Degradation of Explanted Aortic Endoprostheses*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2004. 27(1): p. 33-41.
52. Chakfé, N., et al., *Longitudinal ruptures of polyester knitted vascular prostheses*. Journal of Vascular Surgery, 2001. 33(5): p. 1015-1021.
53. Dieval, F., et al., *Mechanisms of Rupture of Knitted Polyester Vascular Prostheses: An In vitro Analysis of Virgin Prostheses*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2003. 26(4): p. 429-436.
54. King, M.W., *Designing fabrics for blood vessel replacement*. Canadian Textile Journal, 1991. 108(4): p. 24-30.
55. Fielder, J.H., *Issues in ethics: the biomaterials crisis*. Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE, 1995. 14(4): p. 439-440, 42.

56. Ben Abdesslem, S., et al., *Influence of Crimping Textile Polyester Vascular Prostheses on the Fluid Flow Kinetics*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1999. 18(5): p. 375-380.
57. Baskurt, O.M.D. and H.S.D. Meiselman, *Blood Rheology and Hemodynamics*. M.Sc., 2003(5): p. 435-450.
58. Lyman, D.J., et al., *Role of fluid dynamics on the healing of an in vivo tissue engineered vascular graft*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2006. 77B(2): p. 389-400.
59. Meinhart, J., et al., *Hyperlipidemia Coincides with Reversible Growth Impairment of Cultured Human Autologous Endothelial Cells*. Endothelium, 2002. 9(4): p. 239-246.
60. Noishiki, Y., et al., *Age Dependency of Neointima Formation on Vascular Prostheses in Dogs*. Artificial Organs, 2000. 24(9): p. 718-728.
61. Thomas, A.C., G.R. Campbell, and J.H. Campbell, *Advances in vascular tissue engineering*. Cardiovascular Pathology. 12(5): p. 271-276.
62. Yates, S.G., et al., *The preclotting of porous arterial prostheses*. Annals of Surgery, 1978. 188(5): p. 611-622.
63. Huang, Y., M. Siewe, and S.V. Madihally, *Effect of spatial architecture on cellular colonization*. Biotechnology and Bioengineering, 2005. 93(1): p. 64-75.
64. Sieminski, A.L. and K.J. Gooch, *Biomaterial-microvasculature interactions*. Biomaterials, 2000. 21(22): p. 2233-2241.
65. Zhang, Z., et al., *Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses*. Biomaterials, 2004. 25(1): p. 177-187.
66. Simon, C., J.C. Palmaz, and E. Sprague, *Influence of Topography on endothelialization of Stents: Clues for New designs*. J Long Term Eff Med Implants, 2000. 10(1-2): p. 143-51.
67. Losi, P., et al., *Luminal surface microgeometry affects platelet adhesion in small-diameter synthetic grafts*. Biomaterials, 2004. 25(18): p. 4447-4455.
68. Mantovani, D., et al., *Modeling Lipid Uptake in Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Prostheses and Its Effects on Mechanical Properties*. Artificial Organs, 2000. 24(5): p. 334-345.
69. Xu, C., et al., *Electrospun Nanofiber Fabrication as Synthetic Extracellular Matrix and Its Potential for Vascular Tissue Engineering*. Tissue Engineering, 2004. 10(7): p. 1160-1168.
70. Marois, Y., M.-F. Sigot-Luizard, and R. Guidoin, *Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment*. ASAIO Journal, 1999. 45(4): p. 272-280.
71. Yavuz, K., et al., *Comparison of the Endothelialization of Small Intestinal Submucosa, Dacron, and Expanded Polytetrafluoroethylene Suspended in the Thoracoabdominal Aorta in Sheep*. J Vasc Interv Radiol, 2006. 17(5): p. 873-882.
72. Riha, G.M., et al., *Roles of Hemodynamic Forces in Vascular Cell Differentiation*. Annals of Biomedical Engineering, 2005. 33(6): p. 772-779.
73. Kudo, S., et al., *Effect of fluid force on vascular cell function*. Journal of Physiological anthropology and Applied Human Science, 2005. 24(4): p. 459-461.
74. Pratt, K.J., et al., *Kinetics of endothelial cell-surface attachment forces*. J Vasc Surg., 1988. 7(4): p. 591-9.

75. Gulbins, H., et al., *Development of an artificial vessel lined with human vascular cells*. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2004. 128(3): p. 372-377.
76. Feugier, P., et al., *Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress*. Biomaterials, 2005. 26(13): p. 1457-1466.
77. Gojova, A. and A.I. Barakat, *Vascular endothelial wound closure under shear stress: role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels*. J Appl Physiol, 2005. 98(6): p. 2355-2362.
78. Fernandez, P., et al., *Gene Response in Endothelial Cells Cultured on Engineered Surfaces Is Regulated by Shear Stress*. Tissue Engineering, 2007. 13(7): p. 1607-14.
79. Georges, P.C. and P.A. Janmey, *Cell type-specific response to growth on soft materials*. J Appl Physiol, 2005. 98(4): p. 1547-1553.
80. Sonoda, H., et al., *Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: Time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. 65A(2): p. 170-181.
81. He, H. and T. Matsuda, *Newly designed compliant hierarchic hybrid vascular graft wrapped with microprocessed elastomeric film--II: Morphogenesis and compliance change upon implantation*. Cell transplantation, 2002. 11(1): p. 75-87.
82. Matsuda, T. and H. He, *Newly designed compliant hierarchic hybrid vascular grafts wrapped with a microprocessed elastomeric film--I: Fabrication procedure and compliance matching*. Cell transplantation, 2002. 11(1): p. 67-74.
83. Jun, H.-W. and J. West, *Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization*. Journal of Biomaterials Science -- Polymer Edition, 2004. 15(1): p. 73-94.
84. Jun, H.W., L.J. Taite, and J.L. West, *Nitric Oxide-Producing Polyurethanes*. Biomacromolecules, 2005. 6(2): p. 838-844.
85. Hsu, S.-h., S.-h. Sun, and D.C. Chen, *Improved Retention of Endothelial Cells Seeded on Polyurethane Small-diameter Vascular Grafts Modified by a Recombinant RGD-containing Protein*. Artificial Organs, 2003. 27(12): p. 1068-1078.
86. Kannan, R.Y., et al., *The Endothelialization of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocomposites: An In Vitro Study* Cell Biochemistry and Biophysics, 2006. 45(2): p. 129-136.
87. Unger, R.E., et al., *Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells*. Biomaterials, 2004. 25(21): p. 5137-5146.
88. Unger, R.E., et al., *Vascularization and gene regulation of human endothelial cells growing on porous polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes*. Biomaterials, 2005. 26(17): p. 3461-3469.
89. Ozawa, T., et al., *Optimal Biomaterial for Creation of Autologous Cardiac Grafts*. Circulation, 2002. 106(12-1): p. 1176-182.
90. He, W., et al., *Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth*. Biomaterials, 2005. 26(36): p. 7606-7615.
91. Iwai, S., et al., *Biodegradable polymer with collagen microsphere serves as a new bioengineered cardiovascular prosthesis*. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2004. 128(3): p. 472-479.

92. Iwai, S., et al., *Novel Tissue-Engineered Biodegradable Material for Reconstruction of Vascular Wall*. The Annals of Thoracic Surgery, 2005. 80(5): p. 1821-1827.
93. Turner, N.J., et al., *A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11(R)) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts*. Biomaterials, 2004. 25(28): p. 5955-5964.
94. Lepidi, S., et al., *In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold*. FASEB J., 2005. 20(1): p. 103-5.
95. Opitz, F., et al., *Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo*. Cardiovascular Research, 2004. 63(4): p. 719-730.
96. Keun Kwon, I., S. Kidoaki, and T. Matsuda, *Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential*. Biomaterials, 2005. 26(18): p. 3929-3939.
97. He, W., et al., *Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering*. Tissue Engineering, 2005. 11(9-10): p. 1574-1588.
98. Ma, Z., et al., *Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering*. Biomaterials, 2005. 26(15): p. 2527-2536.
99. Miller, D.C., et al., *Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features*. Biomaterials, 2004. 25(1): p. 53-61.
100. Flemming, R.G., et al., *Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior*. Biomaterials, 1999. 20(6): p. 573-588.
101. Chung, T.-W., et al., *Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale*. Biomaterials, 2003. 24(25): p. 4655-4661.
102. Deible, C.R., et al., *Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol*. Biomaterials, 1999. 20(2): p. 101-109.
103. Levesque, S., et al., *Modification of lipid transport through a microporous PTFE membrane wall grafted with poly(ethylene glycol)*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. 25(3): p. 205-217.
104. Chevallier, P., et al., *In vitro Biological Performances of Phosphorylcholine-Grafted ePTFE Prostheses through RFGD Plasma Techniques*. Macromolecular Bioscience, 2005. 5(9): p. 829-839.
105. Chupa, J.M., et al., *Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations*. Biomaterials, 2000. 21(22): p. 2315-2322.
106. Ritter, E.F., et al., *Heparin coating of vascular prostheses reduces thromboemboli*. Surgery, 1997. 122(5): p. 888-892.
107. Sefton, M.V., et al., *Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers?* Journal of Biomedical Materials Research, 2001. 55(4): p. 447-459.
108. Kumar, S.T.R. and L.K. Krishnan, *A Stable Matrix for Generation of Tissue-Engineered Nonthrombogenic Vascular Grafts*. Tissue Engineering, 2002. 8(5): p. 763-770.
109. Sreerekha, P.R. and L.K. Krishnan, *Cultivation of Endothelial Progenitor Cells on Fibrin Matrix and Layering on Dacron/Polytetrafluoroethylene Vascular Grafts*. Artificial Organs, 2006. 30(4): p. 242-249.

110. Koenig, A.L., V. Gambillara, and D.W. Grainger, *Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. 64A(1): p. 20-37.
111. Randone, B., et al., *Dual Role of VEGF in Pretreated Experimental ePTFE Arterial Grafts*. Journal of Surgical Research, 2005. 127(2): p. 70-79.
112. Meinhart, J.G., et al., *Enhanced Endothelial Cell Retention on Shear-Stressed Synthetic Vascular Grafts Precoated with RGD-Cross-Linked Fibrin*. Tissue Engineering, 2005. 11(5-6): p. 887-895.
113. Larsen, C.C., et al., *The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function*. Biomaterials, 2006. 27(28): p. 4846-4855.
114. Walluscheck, K.P., et al., *Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1996. 12(3): p. 321-330.
115. Li, C., A. Hill, and M. Imran, *In vitro and in vivo studies of ePTFE vascular grafts treated with P15 peptide*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2005. 16(7): p. 875-891(17).
116. Gauvreau, V., et al., *Engineering Surfaces for Bioconjugation: Developing Strategies and Quantifying the Extent of the Reactions*. Bioconjugate Chem., 2004. 15(5): p. 1146-1156.
117. Mirengi, L., et al., *Growth of human endothelial cells on plasma-treated polyethyleneterephthalate surfaces*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. 11(5): p. 327-331.
118. Ramires, P.A., et al., *Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. 51(3): p. 535-539.
119. Chevallier, P., et al., *Ammonia RF - Plasma on PTFE surfaces: Chemical characterization of the species created on the surface by vapor - Phase chemical derivatization*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. 105(50): p. 12490-12497.
120. Pu, F.R., et al., *Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro*. Biomaterials, 2002. 23(11): p. 2411-2428.
121. Chen, H., et al., *Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer*. Biomaterials, 2005. 26(35): p. 7418-7424.
122. Gauvreau, V. and G. Laroche, *Micropattern Printing of Adhesion, Spreading, and Migration Peptides on Poly(tetrafluoroethylene) Films To Promote Endothelialization*. Bioconjugate Chem., 2005.
123. Gagne, L., G. Rivera, and G. Laroche, *Micropatterning with aerosols: Application for biomaterials*. Biomaterials, 2006. In Press, Corrected Proof.
124. Bordenave, L., et al., *In vitro endothelialized ePTFE prostheses: Clinical update 20 years after the first realization*. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2005. 33(3): p. 227-234.
125. Pawlowski, K.J., et al., *Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts*. Frontiers in bioscience, 2004(9): p. 1412-21.
126. Rashid, S.T., et al., *Engineering of bypass conduits to improve patency*. Cell Proliferation, 2004. 37(5): p. 351-366.

127. Tassiopoulos, A.K. and H.P. Greisler, *Angiogenic mechanisms of endothelialization of cardiovascular implants: a review of recent investigative strategies*. Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition, 2000. 11(11): p. 1275.
128. Van der Zijpp, Y.J.T., A.A. Poot, and J. Feijen, *Endothelialization of Small-Diameter Vascular Prostheses*. Archive of Physiology and Biochemistry, 2003. 111(5): p. 415 - 427.
129. Tiwari, A., et al., *Tissue Engineering of Vascular Bypass Grafts: Role of Endothelial Cell Extraction*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2001. 21(3): p. 193-201.
130. Nasserri, B.A., et al., *Dynamic Rotational Seeding and Cell Culture System for Vascular Tube Formation*. Tissue Engineering, 2003. 9(2): p. 291-299.
131. Hsu, S.-h., et al., *The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts*. Medical Engineering & Physics, 2005. 27(3): p. 267-272.
132. Pislaru, S.V., et al., *Magnetic Forces Enable Rapid Endothelialization of Synthetic Vascular Grafts*. Circulation, 2006. 114(1): p. I-314-318.
133. Gulbins, H., et al., *Seeding of human vascular cells onto small diameter polyurethane vascular grafts*. Thorac cardiovasc Surg, 2006. 54(2): p. 102-107.
134. Yu, H., et al., *Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo*. Journal of Vascular Surgery, 2003. 38(3): p. 557-563.
135. Deutsch, M., et al., *Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts*. Journal of vascular surgery, 2009. 49(2): p. 352-362.
136. Laube, H.R., et al., *Clinical experience with autologous endothelial cells seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2000. 120(1): p. 134-141.
137. Gabbieri, D., et al., *Aortocoronary Endothelial Cell-Seeded Polytetrafluoroethylene Graft: 9-Year Patency*. Ann Thorac Surg., 2007. 83(3): p. 1166-8.
138. Baguneid, M.S., et al., *Tissue engineering of blood vessels*. British Journal of Surgery, 2006. 93(3): p. 282-290.
139. Yow, K.-H., et al., *Tissue engineering of vascular conduits*. British Journal of Surgery, 2006. 93(6): p. 652-661.
140. Bordenave, L., P. Menu, and C. Baquey, *Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes*. Expert Review of Medical Devices, 2008. 5(3): p. 337-347.
141. Williams, C. and T.M. Wick, *Perfusion Bioreactor for Small Diameter Tissue-Engineered Arteries*. Tissue Engineering, 2004. 10(5-6): p. 930-941.
142. Baguneid, M., et al., *Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes*. Biotechnol. Appl. Biochem, 2004. 39: p. 151-157.
143. Weinberg, C.B. and E. Bell, *A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells*. Science, 1986. 231(4736): p. 397-400.
144. Cummings, C.L., et al., *Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures*. Biomaterials, 2004. 25(17): p. 3699-3706.

145. Cho, S.-W., et al., *Enhancement of in vivo endothelialization of tissue-engineered vascular grafts by granulocyte colony-stimulating factor*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. 76A(2): p. 252-263.
146. Abed, A., et al., *A Biocompatible Polysaccharide Hydrogel-Embedded Polypropylene Mesh for Enhanced Tissue Integration in Rats*. Tissue Engineering Part A, 2008. 14(4): p. 519-527.
147. L'Heureux, N., et al., *A completely biological tissue-engineered human blood vessel*. FASEB J., 1998. 12(1): p. 47-56.
148. L'Heureux, N., et al., *Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization*. Nat Med., 2006. 12(3): p. 361-5.
149. Heinonen, M., O. Oila, and K. Nordstrom, *Current issues in the regulation of human tissue-engineering products in the European Union*. Tissue Engineering, 2005. 11(11-12): p. 1905-1911.
150. Tomizawa, Y., *Endothelialization and Functional Neointima on Vascular Grafts in Humans*. The Annals of Thoracic Surgery, 2005. 79(4): p. 1465-1465.
151. Daniel, T.O., *Thrombotic microangiopathies : role of microvascular endothelium in pathogenesis in Endothelial Cells In Health And Disease*, W.C. Aird, Editor. 2005.
152. Rifle, G., C. Mousson, and P. Hervé, *Endothelial cells in organ transplantation: Friends or foes?* Transplantation, 2006. 82(1 Suppl): p. S4-5.
153. Prager, M., et al., *Collagen versus gelatin-coated dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: Results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial*. Surgery, 2001. 130(3): p. 408-414.
154. Tschoeke, B., et al., *Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Graft Based on a Novel Biodegradable Composite Fibrin-Polylactide Scaffold*. Tissue Engineering Part A, 2009. 15(00): p. 1-10.
155. Zhang, L., et al., *A novel small-diameter vascular graft: In vivo behavior of biodegradable three-layered tubular scaffolds*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. 99(4): p. 1007-1015.
156. Zavan, B., et al., *Neoarteries grown in vivo using a tissue-engineered hyaluronan-based scaffold*. FASEB J., 2008: p. fj.08-107284.
157. Cottin-Bizonne, S., et al., *Les polymeres synthetiques resorbables : caracteristiques et applications pour les protheses arterielles*. RBM-News, 1999. 21(4): p. 62-75.
158. Gonzalez, M.F., R.A. Ruseckaite, and T.R. Cuadrado, *Structural Changes of Polylactic-Acid (PLA) Microspheres under Hydrolytic Degradation*. Journal of Applied Polymer Science, 1999. 71: p. 1223-1230.
159. Gupta, A.P. and V. Kumar, *New emerging trends in synthetic biodegradable polymer - Polylactide: A critique*. European Polymer Journal, 2007. 43: p. 4053-4074.
160. Kim, H.-W., H.-H. Lee, and J.C. Knowles, *Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. 79A(3): p. 643-649.
161. Chitkara, D., et al., *Biodegradable Injectable In Situ Depot-Forming Drug Delivery Systems*. Macromolecular Bioscience, 2006. 6(12): p. 977-990.
162. Zilberman, M., K.D. Nelson, and R.C. Eberhart, *Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable fibers and expandable fiber-based stents*. Journal of

- Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. 74B(2): p. 792-799.
163. Stitzel, J., et al., *Controlled fabrication of a biological vascular substitute*. Biomaterials, 2006. 27(7): p. 1088-1094.
 164. Zong, X., et al., *Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs*. Biomaterials, 2005. 26(26): p. 5330-5338.
 165. Lunt, J., *Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers*. Polymer Degradation and Stability, 1998. 59(1-3): p. 145-152.
 166. Athanasiou, K.A., G.G. Niederauer, and C.M. Agrawal, *Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers*. Biomaterials, 1996. 17(2): p. 93-102.
 167. Chen, C.-C., et al., *Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends*. Biomaterials, 2003. 24(7): p. 1167-1173.
 168. Zilberman, M., N.D. Schwade, and R.C. Eberhart, *Protein-loaded bioresorbable fibers and expandable stents: Mechanical properties and protein release*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2004. 69B(1): p. 1-10.
 169. Martin, O. and L. Avérous, *Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems*. Polymer, 2001. 42(14): p. 6209-6219.
 170. Zhu, Y., et al., *Layer-by-Layer Assembly To Modify Poly(L-lactic acid) Surface toward Improving Its Cytocompatibility to Human Endothelial Cells*. Biomacromolecules, 2003. 4(2): p. 446-452.
 171. van Wachem, P.B., et al., *Adhesion and spreading of cultured endothelial cells on modified and unmodified poly(ethylene terephthalate): a morphological study*. Biomaterials, 1989. 10(8): p. 532-539.
 172. Wong, C.S., et al., *Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium*. Heart, Lung and Circulation, 2006. 15(6): p. 371-377.
 173. Horcas, I., et al., *A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Rev. Sci. Instrum, 2007. 78(013705).
 174. Xu, C., et al., *In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2004. 71A(1): p. 154-161.
 175. Gagnon, E., et al., *Human vascular endothelial cells with extended life spans: In vitro cell response, protein expression, and angiogenesis*. Angiogenesis, 2002. V5(1): p. 21-33.
 176. Palmaz, J.C., et al., *Influence of stent design and material composition on procedure outcome*. Journal of Vascular Surgery, 2002. 36(5): p. 1031-1039.
 177. Cenni, E., et al., *Evaluation of endothelial cell integrins after in vitro contact with polyethylene terephthalate*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2001. 12(4): p. 345-349.
 178. Kannan, R.Y., et al., *Current status of prosthetic bypass grafts: A review*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. 74B(1): p. 570-581.
 179. François, S., et al., *Effect of Polyester Prosthesis Micro-Texture on Endothelial Cell Adhesion and Proliferation*. Trends Biomater. Artif. Organs, 2008. 22(2): p. 89-99.

180. Duncan, A.C., et al., *Effect of laser modified surface microtopochemistry on endothelial cell growth*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. 54(2): p. 150-159.
181. Sarra-Bournet, C., et al., *A study of atmospheric pressure plasma discharges for surface functionalization of PTFE used in biomedical applications*. J. Phys. D: Appl. Phys., 2006. 39: p. 3461-3469.
182. Drumright, R.E., P.R. Gruber, and D.E. Henton, *Poly(lactic acid) Technology*. Advanced Materials, 2000. 12(23): p. 1841-1846.
183. Yang, F., et al., *Manufacturing and morphology structure of polylactide-type microtubules orientation-structured scaffolds*. Biomaterials, 2006. 27(28): p. 4923-4933.
184. Yokota, T., et al., *In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008. 136(4): p. 900-907.
185. Tsuji, H., et al., *Electrospinning of poly(lactic acid) stereocomplex nanofibers*. Biomacromolecules, 2006. 7(12): p. 3316-3320.
186. Teebken, O.E. and A. Haverich, *Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2002. 23(6): p. 475-485.
187. François, S., et al., *A poly(L-lactic acid) nanofibres mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses*. Acta Biomaterialia, 2009. 5(7): p. 2418-2428.
188. Fischer, E.W., H.J. Sterzel, and G. Wegner, *Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions*. Colloid & Polymer Science, 1973. 251(11): p. 980-990.
189. Cao, X., et al., *DSC study of biodegradable poly(lactic acid) and poly(hydroxy ester ether) blends*. Thermochimica Acta, 2003. 406(1-2): p. 115-127.
190. Passerini, N. and D.Q.M. Craig, *An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC*. Journal of Controlled Release, 2001. 73(1): p. 111-115.
191. Lim, L.T., R. Auras, and M. Rubino, *Processing technologies for poly(lactic acid)*. Progress in Polymer Science, 2008. 33(8): p. 820-852.
192. Massines, F., et al., *The role of dielectric barrier discharge atmosphere and physics on polypropylene surface treatment*. Plasmas and Polymers, 2001. 6(1-2): p. 35-49.
193. Rahel, J. and D.M. Sherman, *The transition from a filamentary dielectric barrier discharge to a diffuse barrier discharge in air at atmospheric pressure*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2005. 38(4): p. 547-554.
194. Wei, Y. and J.W. Hutchinson, *Interface strength, work of adhesion and plasticity in the peel test*. International Journal of Fracture, 1998. 93: p. 315-333.
195. Odell, J.A., et al., *Degradation of polymer solutions in extensional flows*. Macromolecules, 1990. 23(12): p. 3092-3103.
196. Garlotta, D., *A Literature Review of Poly(Lactic Acid)*. Journal of Polymers and the Environment, 2001. 9(2): p. 63-84.
197. Gupta, B., N. Revagade, and J. Hilborn, *Poly(lactic acid) fiber: An overview*. Progress in Polymer Science, 2007. 32: p. 455-482.
198. Day, M., A. Nawaby, and X. Liao, *A DSC study of the crystallization behaviour of polylactic acid and its nanocomposites*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2006. 86(3): p. 623-629.

199. Shalaby, S.W. and K.J.L. Burg, *Absorbable and Biodegradable Polymers*. Advances in Polymeric Biomaterials. Vol. 1. 2003: CRC PRESS Boca Raton London New York Washington, D.C.
200. Rabin, Y. and H.C. Ottinger, *Dilute Polymer Solutions: Internal Viscosity, Dynamic Scaling, Shear Thinning and Frequency-Dependent Viscosity*. EPL (Europhysics Letters), 1990(13): p. 423-428.
201. Stuart, B.H., *Surface plasticisation of poly(ether ether ketone) by chloroform*. Polymer Testing, 1997. 16(1): p. 49-57.
202. Fambri, L., et al., *Biodegradable fibres of poly(-lactic acid) produced by melt spinning*. Polymer, 1997. 38(1): p. 79-85.
203. Duek, E.A.R., C.A.C. Zavaglia, and W.D. Belangero, *In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation*. Polymer, 1999. 40(23): p. 6465-6473.
204. Suzuki, A., D. Mizuochi, and T. Hasegawa, *Superstructure and mechanical properties of poly(L-lactic acid) microfibers prepared by CO₂ laser-thinning*. Polymer, 2005. 46(15): p. 5550-5555.
205. Li, H. and M.A. Huneault, *Effect of nucleation and plasticization on the crystallization of poly(lactic acid)*. Polymer, 2007. 48(23): p. 6855-6866.
206. Agrawal, A.K. and R. Bhalla, *Advances in the Production of Poly(Lactic Acid) Fibers. A Review*. Polymer Reviews, 2003. 43(4): p. 479 - 503.
207. Ton-That, C., et al., *Surface characterisation of ultraviolet-ozone treated PET using atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy* Surface Science, 1999. 433-435: p. 278-282.
208. Strobel, M. and C.S. Lyons, *The role of low-molecular-weight oxidized materials in the adhesion properties of corona-treated polypropylene film*. Journal of Adhesion Science and Technology, 2003. 17: p. 15-23.
209. Strobel, M., et al., *Analysis of air-corona-treated polypropylene and poly(ethylene terephthalate) films by contact-angle measurements and X-ray photoelectron spectroscopy*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1992. 6: p. 429-443.
210. Liston, E.M., L. Martinu, and M.R. Wertheimer, *Plasma modification of polymers for improved adhesion: a critical review*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1993. 7(10): p. 1091-1127.
211. Borcia, G., C.A. Anderson, and N.M.D. Brown, *Dielectric barrier discharge for surface treatment: application to selected polymers in film and fibre form*. Plasma Sources Science and Technology, 2003. 12(3): p. 335-344.
212. Njatawidjaja, E., et al., *Hydrophilic modification of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) by atmospheric pressure glow discharge (APG) treatment*. Surface and Coatings Technology, 2006. 201(3-4): p. 699-706.
213. Wang, Z., et al., *Evaluation of biodegradable synthetic scaffold coated on arterial prostheses implanted in rat subcutaneous tissue*. Biomaterials, 2005. 26(35): p. 7387-7401.
214. Chen, V.J. and P.X. Ma, *The effect of surface area on the degradation rate of nano-fibrous poly(l-lactic acid) foams*. Biomaterials, 2006. 27(20): p. 3708-3715.
215. Tsuji, H., *Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications*. Macromolecular Bioscience, 2005. 5(7): p. 569-597.
216. Weir, N.A., et al., *Processing, annealing and sterilisation of poly--lactide*. Biomaterials, 2004. 25(18): p. 3939-3949.

217. Park, J.-M., D.-S. Kim, and S.-R. Kim, *Nondestructive evaluation of interfacial damage properties for plasma-treated biodegradable poly(p-dioxanone) fiber/poly(lactide) composites by micromechanical test and surface wettability*. Composites Science and Technology, 2004. 64(6): p. 847-860.
218. Loo, J.S.C., C.P. Ooi, and F.Y.C. Boey, *Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation*. Biomaterials, 2005. 26(12): p. 1359-1367.
219. Lee, S.J., et al., *In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. 83A(4): p. 999-1008.
220. Li, W.-J., et al., *Fabrication and characterization of six electrospun poly([alpha]-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications*. Acta Biomaterialia, 2006. 2(4): p. 377-385.
221. Khil, M.-S., et al., *Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, 2005. 72B(1): p. 117-124.
222. Stankus, J.J., et al., *Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization*. Biomaterials, 2007. 28(17): p. 2738-2746.
223. Smith, M.J., et al., *Suture-reinforced electrospun polydioxanone-elastin small-diameter tubes for use in vascular tissue engineering: A feasibility study*. Acta Biomaterialia, 2008. 4(1): p. 58-66.
224. Hossain, M.M., A.S. Herrmann, and D. Hegemann, *Plasma Hydrophilization Effect on Different Textile Structures*. Plasma Processes and Polymers, 2006. 3(3): p. 299-307.
225. Poll, H.U., U. Schladitz, and S. Schreiter, *Penetration of plasma effects into textile structures*. Surface and Coatings Technology, 2001. 142-144: p. 489-493.
226. Miralá, S.F., et al., *Electrical and Optical Diagnostics of Dielectric Barrier Discharges (DBD) in He and N₂ for Polymer Treatment*. Plasmas and Polymers, 2000. 5(2): p. 63-77.
227. ASTM D 1876-01, ASTM D 2979-01, ASTM D 5179-02
228. Crombez, M., et al., *Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces*. Biomaterials, 2005. 26(35): p. 7402-7409.
229. Ishii, Y., et al., *A novel bioengineered small-caliber vascular graft incorporating heparin and sirolimus: Excellent 6-month patency*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008. 135(6): p. 1237-1246.
230. Vallières, K., É. Petitclerc, and G. Laroche, *Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity*. Macromolecular Bioscience, 2007. 7(5): p. 738-745.
231. Vallières, K., É. Petitclerc, and G. Laroche, *On the Ability of Imatinib Mesylate to Inhibit Smooth Muscle Cell Proliferation without Delaying Endothelialization: An in vitro Study*. Vascular Pharmacology, 2009. In Press, Accepted Manuscript.
232. Saha, S. and P. Saha, *The biomedical industry and the need for tort reform*. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 2003. 22(4): p. 154-155.
233. Saha, S. and P.S. Saha, *Biomedical research: some ethical challenges*. Critical Reviews in Biomedical Engineering, 1998. 26(5-6): p. 380.

234. Kraiss, L.W., et al., *Fluid flow activates a regulator of translation, p70/p85 S6 kinase, in human endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 278(5): p. H1537-1544.
235. Pearce, M.J., et al., *Shear Stress Activates Cytosolic Phospholipase A2(cPLA2) and MAP Kinase in Human Endothelial Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996. 218(2): p. 500-504.
236. Ley, K., et al., *Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate*. Blood, 1989. 73(5): p. 1324-1330.
237. Azevedo, N.F., et al., *Shear Stress, Temperature, and Inoculation Concentration Influence the Adhesion of Water-Stressed Helicobacter pylori to Stainless Steel 304 and Polypropylene*. Appl Environ Microbiol, 2006. 72(4): p. 2936-2941.
238. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow*. Blood, 2005. 106(2): p. 584-592.
239. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tissue_factor.png
240. http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_Protein_ICAM1_image.jpg
241. Quéré, D., *Lois du mouillage et de l'imprégnation* T.d. l'Ingénieur, Editor. 2003.
242. Relkin, P., *Microcalorimétrie à balayage DSC - Application agroalimentaire*, T.d. l'Ingénieur, Editor. 2006.
243. Rivoal, J.-c. and C. Frétnigny, *Microscopie à force Atomique*, in *Techniques de l'Ingénieur*. 2005.
244. Paqueton, H. and J. Ruste, *Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement*, T.d. l'Ingénieur, Editor. 2006.
245. Paqueton, H. and J. Ruste, *Microscopie électronique à balayage - Images, applications et développements*, T.d. l'Ingénieur, Editor. 2006.
246. DUC, T.M., *Analyse de surface par ESCA - Analyse élémentaire et applications*, in *Techniques de l'Ingénieur*. 1998.
247. DUC, T.M., *Analyse de surface par ESCA - Principe et instrumentation*, T.d. l'Ingénieur, Editor. 1998.
248. Dalibart, M. and L. Servant, *Spectroscopie dans l'infrarouge*, T.d. l'Ingénieur, Editor. 2000.

Appendice 1 : Travaux non publiés

Etude de la réponse athérosclérotique des cellules endothéliales sous flux dynamique

Après avoir effectué les essais d'adhérence et de prolifération de cellules endothéliales aortiques de bœufs (BAECs) en conditions statiques sur les substrats de nanofibres de PLLA (voir Chapitre 2), nous avons choisi de poursuivre nos travaux de culture cellulaire en conditions dynamiques. En effet, les vaisseaux sanguins sont un environnement hautement dynamique (flux sanguin, déplacement de la paroi, vasoconstriction et vasodilatation...) et les cellules endothéliales sont extrêmement sensibles aux stimulations mécaniques (voir Introduction-Mise en contexte). Les cultures cellulaires statiques s'approchent plus des conditions athérosclérotiques, alors que nous cherchons à exprimer leur phénotype athéroprotecteur. Nous avons donc développé un système de stimulation mécanique par déplacement de fluide dans le but de créer un flux dynamique laminaire à la surface d'échantillons préalablement greffés avec des cellules endothéliales. Nos hypothèses de travail étaient les suivantes : (i) une organisation spatiale typique des cellules endothéliales (monocouche sur les nanofibres de PLLA voir chapitre 2) favorisera la diminution des facteurs typiques de l'athérosclérose, (ii) et à l'opposé, des cellules endothéliales qui auraient proliféré de manière chaotique (voir prolifération sur textile, voir chapitre 1) produiraient plus de facteurs athérotypiques.

Système de culture dynamique

Nous avons conservé le procédé de maintien des échantillons développé pour l'Article 1, à savoir une tige de PTFE sur laquelle est serti l'échantillon (PET textile, avec ou sans fibres de PLLA ou film de PET) grâce à une bague en PTFE. Ce porte-échantillon permet la manipulation sans déformation du textile (voir Figure 37). Il supporte les températures élevées du procédé de stérilisation à la vapeur, et il est inerte chimiquement, minimisant les risques d'interaction avec les expérimentations.

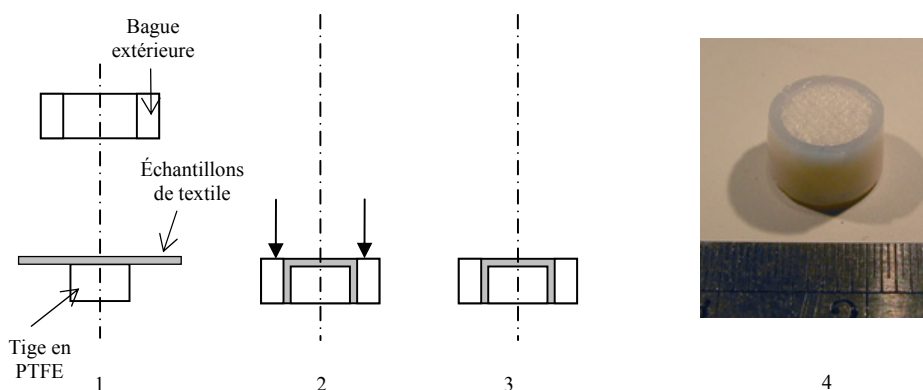


Figure 37 : Schéma de montage des échantillons sur les portes-échantillons en PTFE (1- mise en place de l'échantillon sur la tige de PTFE, 2- sertissage avec la bague en PTFE, 3- schéma d'un échantillon monté sur son support, 4- photographie d'un échantillon monté)

Les échantillons ont été préalablement greffés avec des BAECs (prolifération de 48h, voir protocole décrit en appendice 4) et ont été placés dans des logements ajustés et répartis de manière radiale sur une plaque circulaire de PTFE d'épaisseur égale à la hauteur du porte-échantillon. Cette plaque se loge dans un pétri de culture en polystyrène (Corning Inc., Corning, NY, USA) de 12 cm de diamètre.

Un premier système simple de culture dynamique reproduisant une contrainte de cisaillement et une contrainte normale a été envisagé pour les expérimentations in vitro. C'est un système de rotation orbitale qui entraîne un pétri rempli de milieu de culture. Dans le fond de celui-ci sont disposés nos échantillons de manière concentrique. Le mouvement orbital entraîne la rotation du milieu de culture en une vague rotative (voir Figure 38). Ce type de culture dynamique en rotation orbitale a été utilisé avec succès dans quelques publications concernant les cellules endothéliales [18, 234-236] avec un calcul de la contrainte de cisaillement établi grâce à une approximation mathématique :

$$\tau = a\sqrt{\eta\rho(2\pi f)^3}$$

ou τ est la contrainte de cisaillement, a est le rayon orbital de l'agitateur, η la viscosité dynamique du milieu, ρ la densité du milieu et f la fréquence de rotation. Cependant, cette

approximation reste grossière et nécessite une corrélation avec des mesures[18] et des simulations numériques.[237] Des mesures expérimentales ont montré que les valeurs de débit de circulation équivalant à celles observées dans une artère carotide (voir Figure 38), mais tout en restant très approximatives.

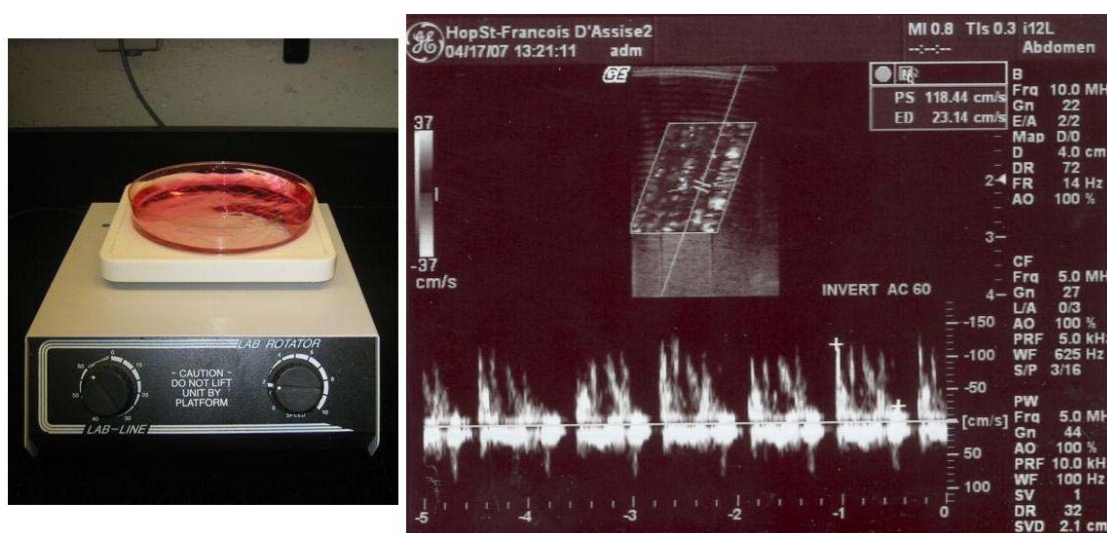


Figure 38 : Rotation orbitale d'un pétri de culture et mesure de vitesse par échographie Doppler

Cependant, le temps consacré à la simulation numérique (une centaine d'heures environ) et les moyens à engager associés, ainsi que la marge d'erreur quant à la qualité des résultats pour retranscrire réellement les conditions hydrodynamiques et la contrainte de cisaillement réelle contrebalancent l'intérêt de ce mode de stimulation.

Nous avons donc choisi de développer une solution plus classique à disque tournant. La boîte de Pétri qui contient la plaque et les porte-échantillons a été placée sous un appareillage spécifiquement conçu pour faire tourner un disque parallèlement à la surface des échantillons (voir Figure 39). La boîte de Pétri a été remplie de milieu de culture et le système a ensuite été placé en incubateur (100% humidité, 5%CO₂ à 37°C). Le disque fut fabriqué en acier chirurgical 316L, permettant son usage dans un milieu de culture et sa stérilisation. Le système de contrôle et d'entraînement du disque était celui d'un disque dur d'ordinateur. Il permet le maintien d'une vitesse de rotation constante, quelles que soient les variations de température ou les fluctuations de courant. Cette vitesse de rotation est de

4,88tr/s⁻¹. La contrainte de cisaillement provoquée par la rotation du disque dans le milieu de culture peut s'exprimer sous la forme

$$\tau = \eta \frac{d(v)}{d(x)}$$

ou v est la vitesse d'un point du disque et x la hauteur du disque par rapport aux échantillons. Sachant que $v = \omega r$ avec ω la vitesse angulaire et r la distant du point par rapport à l'axe de rotation, nous obtenons

$$\tau = \eta \frac{\omega r}{d}$$

avec d la distance entre le disque est les échantillons. La viscosité du milieu $\eta=0,00084$, ce qui nous donne une contrainte de cisaillement de 0,79Pa (7,9dynes/cm²) pour une distance de 1mm et un rayon de 60mm. La vitesse d'éjection tangentielle du fluide n'a pas été prise en considération pour l'approximation de la contrainte de cisaillement. Cette contrainte de cisaillement théorique est comparable à celle référencée pour une circulation laminaire dans les vaisseaux de petits calibres [2, 7].

Enfin, afin d'effectuer une mesure en condition réelle de la véritable contrainte de cisaillement, nous avons réalisé un montage avec jauge de contrainte. Un porte-échantillon, monté avec un tricot de PET a été placé sur une lame métallique équipée de jauges de déformation, le tout monté sur un support immergé dans une solution à la viscosité comparable à celle de l'eau (voir Figure 40). Les jauges de déformation ont été étalonnées grâce à des poids standards accrochés en bout d'échantillons, alors que la lame était placée verticalement afin de se déformer sous l'effet de la gravité. Les facteurs poids de l'échantillon et de la lame ont été pris en considération lors de cet étalonnage. De plus, l'étalonnage a été effectué avec des masses qui sous l'action de la pesanteur exerçaient des efforts comparables à ceux prédits théoriquement par le calcul de cisaillement. En effet, une contrainte de cisaillement de 0,7Pa sur une surface de $5,52 * 10^{-5} \text{ m}^2$ exerce un effort théorique de $3,86 * 10^{-5} \text{ N}$ soit celui d'une masse de 4,5mg sous l'accélération de la pesanteur.

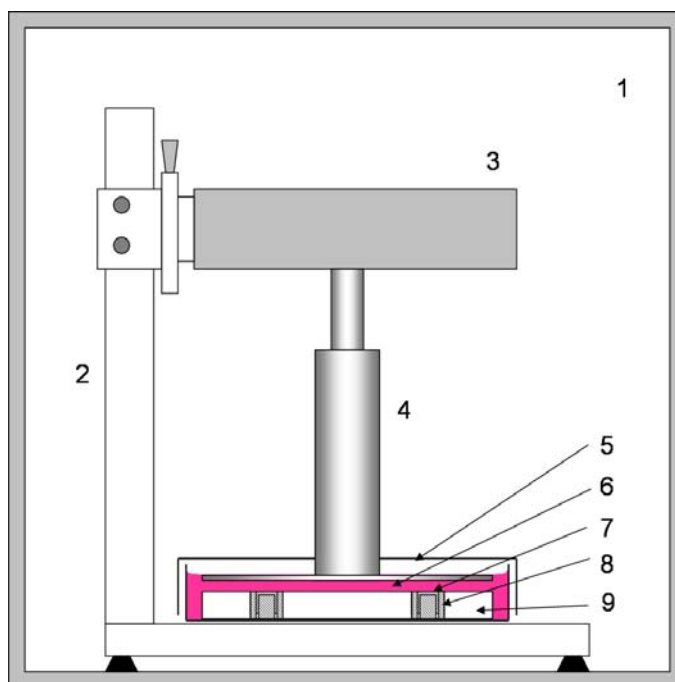


Figure 39 : Système de culture dynamique par rotation disque-plan. (1- Incubateur 100% humidité, 5%CO₂ à 37°C, 2- Support réglable, 3- Partie commande et actionneur, 4- Tige et disque en acier 316L, 5- Boîte de pétri avec couvercle perforé, 6- Milieu de culture, 7- échantillon, 8- Porte-échantillon, 9- Plaque de maintien des échantillons)

Les mesures de courant des jauges de déformation étaient suffisamment stables pour permettre cet étalonnage. Comme nous pouvions le prévoir, l'immersion du système a provoqué des fluctuations de courant dans les jauges, principalement à cause des variations thermiques induisant des dilatations dans les matériaux. Cependant, malgré des temps de stabilisation thermique longs (24h), les mesures de courant n'ont jamais pu être stabilisées et dérivait facilement d'un à trois ordres de grandeur continuellement. Malheureusement, le temps imparti à ces validations de contrainte de cisaillement vint à manquer et l'étude des causes sûrement multiples de l'imprécision de ces mesures ne se serait faite qu'au détriment de la poursuite du projet. Nous avons choisi de nous contenter provisoirement de l'approche théorique pour estimer la contrainte de cisaillement qu'occasionnait la rotation du disque au dessus de nos échantillons immergés dans du milieu de culture.

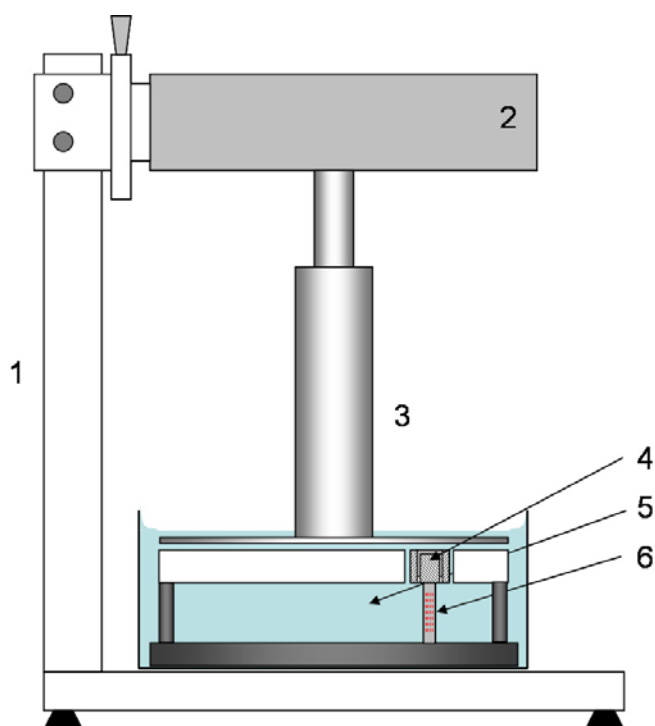


Figure 40 : Montage avec jauges de contrainte pour mesure de cisaillement réelle. (1- Support réglable, 2- Partie commande et actionneur, 3- Tige et disque en acier 316L, 4- Échantillon, 5- Milieu liquide, 6- Lame métallique avec jauges de déformation)

Sélection de facteurs typiques des conditions athérosclérotiques

Quand elles sont placées en conditions athérosclérotiques, les cellules endothéliales produisent de nombreux facteurs qu'il est possible de détecter par Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), ou littéralement dosage d'immunosorption lié à enzyme. Nous avons retenu deux facteurs comme étant typiques de l'expression athérosclérotique des cellules endothéliales :

Tissue Factor (TF) – CD142 : typique de l'état prothrombotique[4]

ICAM –CD54 : typique de l'état pro-inflammatoire[238]

Ces deux facteurs (voir Figure 41), intervenant dans deux mécanismes associés à l'athérosclérose (activation de la cascade de la thrombose via TF et recrutement des monocytes via ICAM), doivent permettre de détecter si des cellules endothéliales expriment leur phénotype athéropromoteur.

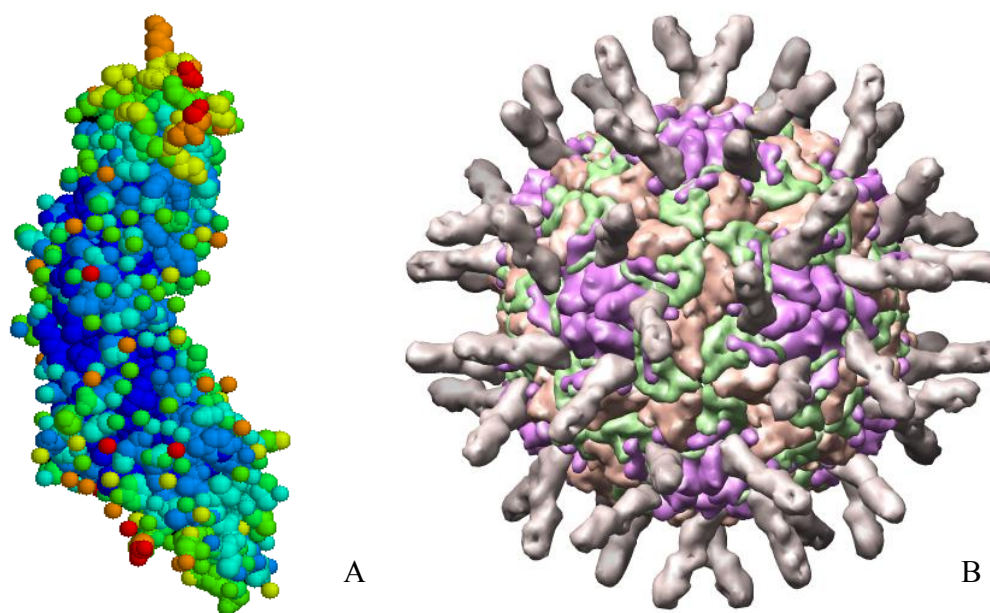


Figure 41 : Représentation tridimensionnelle des facteurs CD142 (A) [239] et CD54 (B) [240]

Les cellules endothéliales ont donc d'abord été greffées sur les différents substrats étudiés (Nanofibres de PLLA sur matrice textile –CKPLLA, matrice textile–CK et film de PET comme contrôle –PET film). Après 48h de prolifération, la moitié des porte-échantillons avec les substrats greffés a été placé sous notre système de stimulation dynamique par disque tournant et l'autre moitié a été conservée sous conditions statiques dans l'incubateur pour contrôle. Les cellules ont été ensuite stimulées pendant 6h consécutives. Enfin, elles ont été fixées et testées par ELISA afin de mettre en lumière la présence ou non des facteurs sélectionnés suivant qu'elles aient été stimulées mécaniquement ou non et suivant la nature du substrat (PLLA par rapport au textile brut).

Résultats

Les résultats des ELISA sont présentés à la Figure 42. Il apparaît clairement que la stimulation dynamique n'a pas eu de rôle déterminant quant à la discrimination des supports de prolifération. En effet, aucune différence n'a été mise en évidence entre les échantillons conservés sous milieu statique et ceux placés sous le système de stimulation dynamique. Les tendances observées sont identiques. Des différences significatives ont été détectées entre les groupes. Il apparaît que l'expression de CD142 est significativement

plus faible sur les échantillons de textiles que sur les structures menant à une prolifération plane des cellules endothéliales. Enfin, l'expression de CD54 est quant à elle significativement plus forte sur les fibres de PLLA que sur les autres échantillons.

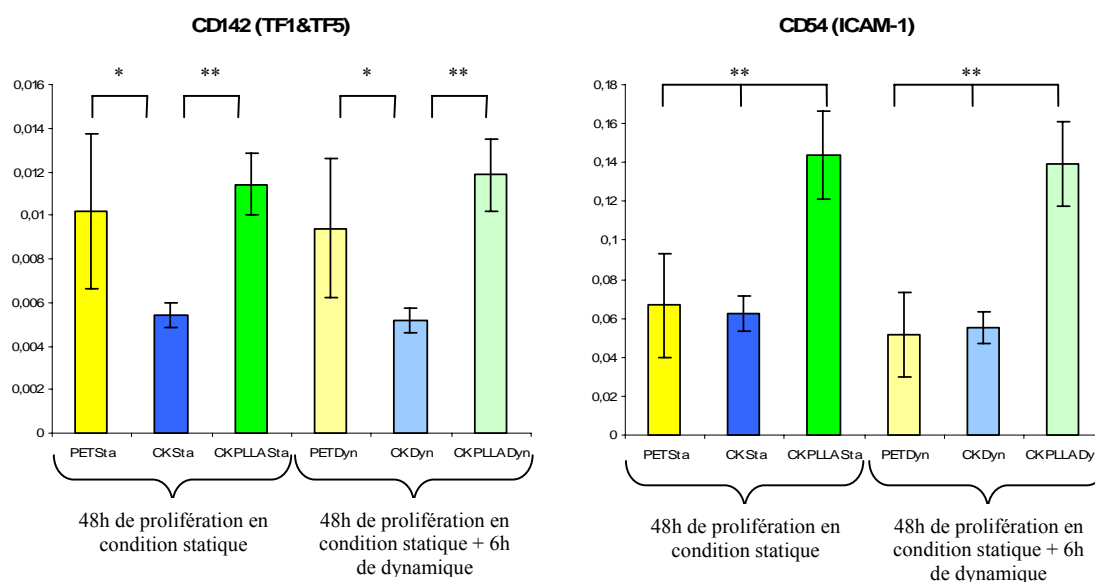


Figure 42 : Histogramme de l'expression (moyenne±SEM, n=12) en émission de fluorescence des facteurs CD142 et CD54, relativisé au nombre de cellules estimées par échantillon (sta= 48h en condition statique, dyn= 48h en condition statique + 6h dynamique) (Film de PET, Tricot de PET et Tricot de PET recouvert de nanofibres de PLLA pour PET, CK et CK PLLA respectivement). *= $p < 0,01$ et **= $p < 0,001$

Discussion

La littérature semble unanime sur le fait que les cellules endothéliales soient sensibles à la stimulation mécanique et plus particulièrement celle induite par un flux hydrodynamique entraînant une contrainte de cisaillement. Cette sensibilité s'exprime notamment par une expression cellulaire de type athéroprotectrice sous des contraintes laminares d'ordre physiologique. En dehors de ces plages de stimulation physiologique, les cellules endothéliales vont au contraire favoriser les processus menant au développement de l'athérosclérose. Les conditions menant à l'expression de facteurs typiques exprimés lors de conditions athérosclérotiques sont soit l'absence de circulation menant à des stagnations locales, soit des flux perturbés et turbulents, menant à des recirculations et à des zones mortes. Il est à noter que la culture des cellules endothéliales en conditions statiques est à

même de favoriser l'expression de ces facteurs. Le manque de différence dans nos résultats entre l'expression des cellules greffées sur des échantillons soumis ou non à des flux dynamiques nous conduit à plusieurs hypothèses. La première est que le niveau de cisaillement réel engendré par le système de disque tournant n'était pas assez élevé pour faire entrer les cellules endothéliales dans un processus visant à mettre en veille leur phénotype « athérosclérotique ». La seconde est que le niveau de cisaillement réel était trop important et que celui-ci étant largement en dehors des niveaux physiologiques tolérables, provoque un stress cellulaire conduisant à une expression des facteurs sélectionnés identique à celle observée lors de l'absence totale de stimulation. Cependant, cette explication doit tenir compte des cinétiques d'expression et des temps de transport transmembranaire au sein de la cellule. En lien avec ce dernier aspect de la problématique, il est probable que l'expression cellulaire mesurée soit simplement celle de cellules endothéliales qui n'ont pas eu le temps de réagir au stimulus mécanique, ou dans le cas contraire, dont la diminution des facteurs n'aurait pas encore été perceptible. Enfin, il est également possible que le système de rotation de disque n'entraîne pas seulement une contrainte laminaire, mais aussi des perturbations turbulentes au niveau des échantillons dues aux défauts locaux de géométrie inhérents au placement des échantillons, à la forme des portes-échantillons et aux logements usinés dans la plaque support. En somme, il est impossible, dans la mesure des expérimentations faites à ce jour dans le cadre de ces travaux de doctorat, de conclure sur la viabilité de notre système de stimulation par flux laminaire des cellules endothéliales. De plus, les doutes concernant les conditions réelles de stimulation mécanique au niveau de la contrainte de cisaillement invalident clairement les résultats obtenus par ELISA, même si la similitude des expressions mesurées semble mettre en avant l'hypothèse d'un temps de stimulation trop court pour être réellement influent sur les cellules endothéliales.

Cependant, les différences significatives récurrentes entre les différents échantillons, nonobstant la présence ou l'absence de stimulation mécanique, peuvent toutefois apporter certains indices sur la sensibilité des cellules vis-à-vis de l'expression des facteurs sélectionnés et sur la pertinence du test employé pour mesurer cette sensibilité. Dans le cas du facteur CD142, il apparaît que le textile brut, sur lequel se développent les cellules endothéliales de manière anarchique, a favorisé une diminution de son expression par

rapport à une prolifération en monocouche comme sur les films de PET et les nanofibres de PLLA. Ceci va à l'encontre des observations physiologiques, clinique et in vitro. Il est donc probable que la structure tridimensionnelle du textile, qui permet aux cellules endothéliales de plonger profondément au sein des fibres textiles, crée un abri les protégeant des anticorps de l'ELISA. Ainsi protégées, moins de facteurs exprimés seraient alors disponibles pour une détection et la voie enzymatique de production de chromogène se verrait donc pénalisée, réduisant de fait la quantité mesurée. La même critique peut-être avancée pour expliquer le manque de différences entre l'expression de CD54 entre le film de PET et le textile de PET (CK), ou normalement CK devrait favoriser une plus grande réponse inflammatoire due à des cellules plus désorganisées. Par contre, la surexpression de CD54 sur les fibres de PLLA est notable et peut quant à elle être expliquée par une réaction plus forte des cellules endothéliales sur le PLLA, qui a déjà été mis en évidence avec une exacerbation de la réponse inflammatoire en présence d'acide polylactique. Sans toutefois minimiser l'importance de ce phénomène, la dégradation du PLLA implique la formation de sous-produits qu'il faut évacuer et la mobilisation de monocytes par la production de CD54 permet le recrutement de macrophage utile pour assurer cette évacuation.

Conclusion

Ces travaux nous ont permis d'illustrer clairement la problématique de l'expérimentation in vitro avec des cellules endothéliales, qui pour être la plus représentative de la réalité, doit prendre en considération la nature dynamique de leur environnement physiologique. La mise au point d'un système de stimulation dynamique simple et peu onéreux n'a pu être concluante pour des raisons incluant le manque de maîtrise de la contrainte de cisaillement et la sensibilité des cellules testées. Les travaux doivent être poursuivis pour permettre la mise en place d'un système plus fiable de stimulation, comme une circulation de fluide par pompe et un écoulement laminaire sur plaque. De plus, l'ELISA qui reste une méthode fiable pour des cultures cellulaires sur plaque, est peut-être limitée dans sa capacité à détecter des niveaux vraisemblables d'expression sur des structures aux géométries complexes et différentes. Là encore, des travaux doivent être poursuivis pour valider une méthode plus pertinente, comme celles basées sur un décrochage des cellules de leurs

substrats et l'analyse de l'expression de leurs gènes, ce qui permettrait théoriquement de s'affranchir de la nature tridimensionnelle du substrat.

Étude de la cristallinité des nanofibres de PLLA par diffraction des rayons X

Les travaux d'analyse enthalpique différentielle (DSC) ont mis en évidence la présence de structures cristallines dans les échantillons de nanofibres de PLLA (voir Chapitre 3). Ces structures cristallines sont probablement la résultante de la forte contrainte de cisaillement imposée par le procédé de filage par jet d'air au polymère en solution lors de son étirage pendant la formation des fibres. En effet, la contrainte mécanique produite par un étirement favorise la formation de structure cristalline au sein des chaînes macromoléculaires[191 , 197]. Les résultats ont également montré que le procédé de filage par jet d'air ne permettait pas d'obtenir des taux de cristallisation comparables suivant que le polymère était en solution à 4% ou à 7% (w/v). La solution la plus visqueuse, c'est-à-dire celle à 7%, permet la production des fibres avec un taux de cristallinité près de deux fois inférieur à celui mesuré sur des nanofibres obtenues depuis une solution à 4%. Il nous est donc apparu essentiel de poursuivre les investigations sur la nature cristalline des nanofibres ainsi produites pour mieux comprendre les phénomènes qui interviennent lors de la formation de celles-ci par notre procédé de filage par jet d'air.

Afin de déterminer plus précisément la nature cristalline des nanofibres de PLLA produites par filage par jet d'air, nous avons choisi d'utiliser la Spectrométrie de diffusion des rayons X aux petits angles et aux grands angles (Small Angle X-Ray Spectrometry et Wide Angle X-Ray Spectrometry pour les acronymes SAXS et WAXS, Rigaku, Tokyo, Japon). Des films de nanofibres, déposés sur les portes-éprouvettes développées pour les tests de DMA (voir Article 3), ont été produits avec une solution de 4% de PLLA et une solution de 7%. Ces films ont ensuite été placés en travers du faisceau de rayons X afin de vérifier la présence ou non de structure cristalline.

Les résultats de SAXS sont présentés en Figure 43. Parmi les quatre échantillons testés (deux par concentration de solution), aucune structure particulière comprise entre 2000 et 50 Å n'a pu être mise en évidence.

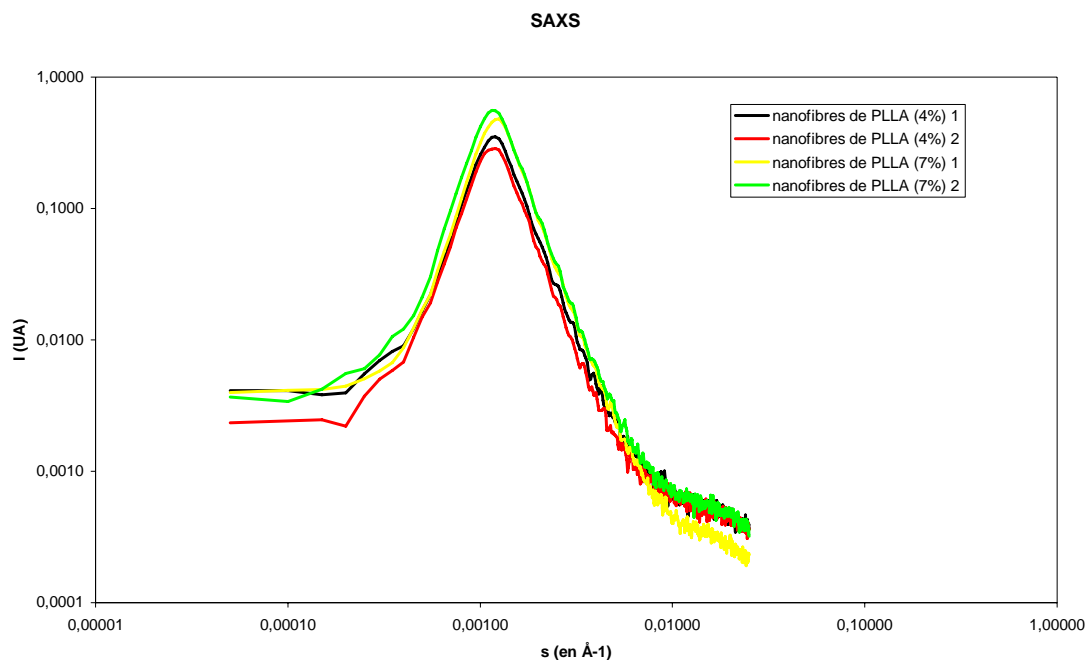


Figure 43 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les petits angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA produits à partir de solution à 4% (courbe noire et rouge) et à 7% (courbe jaune et verte). Nota : Le pic commun aux quatre courbes autour de 800 Å est un artefact de l'appareil de mesure.

La Figure 44 montre les résultats obtenus après une analyse de la diffraction des rayons X pour les grands angles (WAXS). La encore aucune structure particulière comprise entre en 50 et 2 Å n'a été mise en évidence. La bosse présente pour tous les échantillons est caractéristique des zones amorphes. Ces premiers résultats de SAXS sont en accord avec nos travaux, dans le sens où aucune structure de grande taille n'a été mise en évidence conformément au diamètre moyen de fibres produites. Il ne peut en effet y avoir des structures cristallines plus grandes que le diamètre des fibres. Les résultats de WAXS sont quant à eux surprenants, car ils ne laissent apparaître aucune structure assimilable à une organisation cristalline de petite taille du PLLA lorsque celui-ci est analysé sous forme de nanofibres et ce, quel que soit la concentration d'origine. Ceci va aussi bien à l'encontre des résultats obtenus avec DSC qui nous indique des taux de cristallinité de 10 à 20 % pour les nanofibres obtenues depuis une solution à 7% et 4% respectivement. Ceci va également à l'encontre d'une logique théorique qui voudrait qu'un procédé de filage produise des structures cristallines suite à l'étirement des fibres de PLLA. Cependant, la nature des films

de nanofibres permet d'apporter un début d'explication à l'absence de résultats en diffraction des rayons X. En effet, les films sont essentiellement composés de nanofibres non orientées. Ces fibres ont un diamètre moyen avoisinant les 300nm avec une large distribution allant de la dizaine de nanomètres pour les plus petites à des dimensions avoisinant le micro pour les plus grosses d'entre elles. L'anisotropie due à la non-orientation des nanofibres, ainsi que la nature poreuse du matériau, conduit une perte de contraste au niveau du signal émis. De plus, il est important de noter la présence de gouttelettes séchées de PLLA, enchevêtrées entre les nanofibres et dont la structure est essentiellement amorphe (pas d'étirage et séchage par évaporation de solvant).

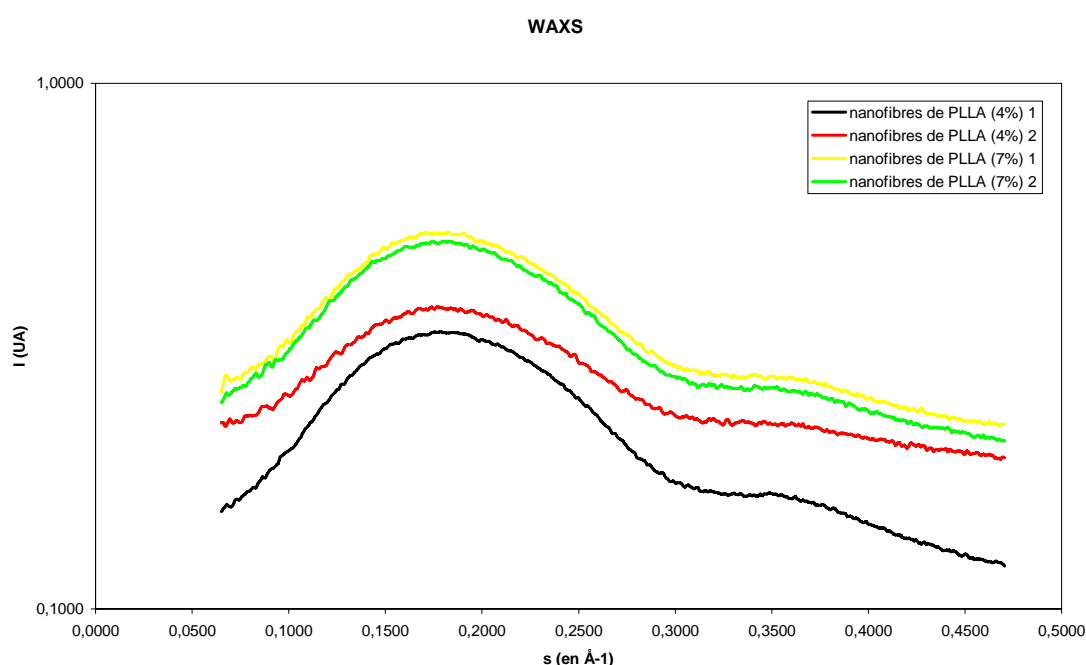


Figure 44 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les grands angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA produits à partir de solution à 4% (courbes noire et rouge) et à 7% (courbes jaune et verte).

Afin d'augmenter le contraste des échantillons analysés, l'anisotropie des nanofibres peut facilement être contournée, en alignant celles-ci suite à un étirement du film de nanofibres. Une maximisation de l'orientation devrait alors permettre de mieux mettre en évidence les structures cristallines de nos échantillons. Nous avons donc préalablement soumis nos

échantillons à une contrainte mécanique cyclique dans l'analyseur mécanique dynamique (DMA). Les échantillons obtenus ont flué jusqu'à rupture.

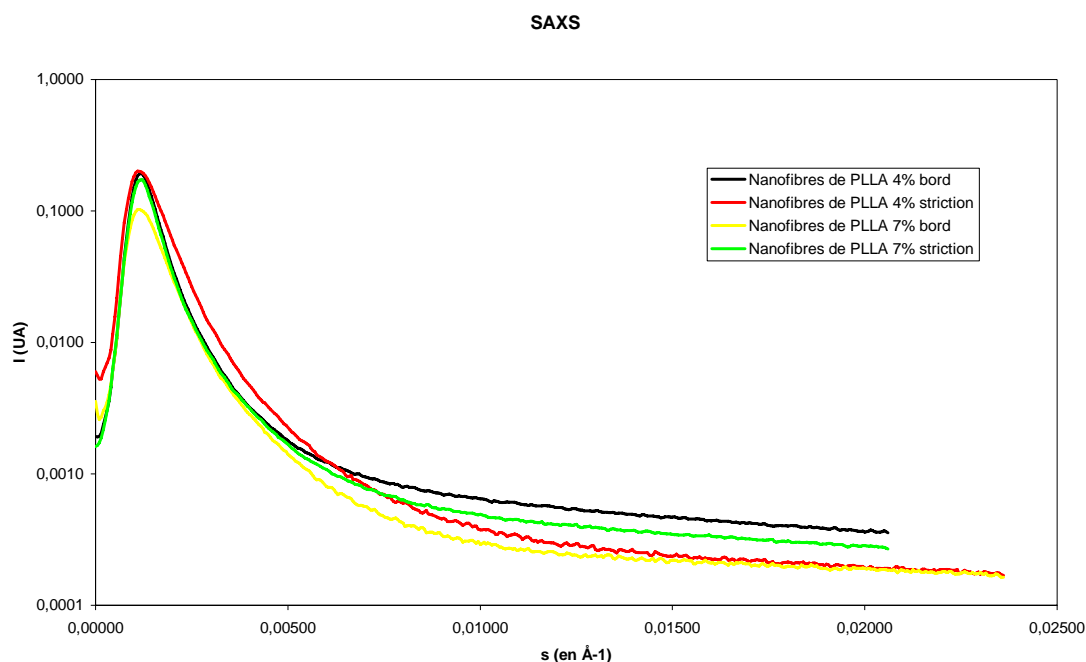


Figure 45 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les petits angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA soumis à un fluage jusqu'à rupture et produits à partir de solution à 4% (mesure sans déformation courbe noire et mesure à la striction courbe rouge) et à 7% ((mesure sans déformation courbe jaune et mesure à la striction courbe verte). Nota : Le pic commun aux deux courbes autour de 800 Å est un artefact de l'appareil de mesure.

La forme des échantillons après l'étirement avait celle caractéristique des éprouvettes de traction ayant subi une striction. De la largeur d'origine à la base, la striction mène à un amincissement au milieu de l'éprouvette jusqu'à la rupture de celle-ci. Nous avons ensuite analysé la cristallinité de la base de l'éprouvette ainsi qu'à la zone de striction maximale juste en dessous du point de rupture.

Les résultats de l'analyse SAXS pour les éprouvettes soumises à un fluage sont présentés en Figure 45. Comme précédemment, aucune structure caractéristique ne ressort des analyses de la diffraction des rayons X aux petits angles et le pic centré autour de 800 Å est là encore un artefact de l'appareil de mesure. Ces résultats restent en accord avec l'ensemble des arguments présentés jusqu'à présent.

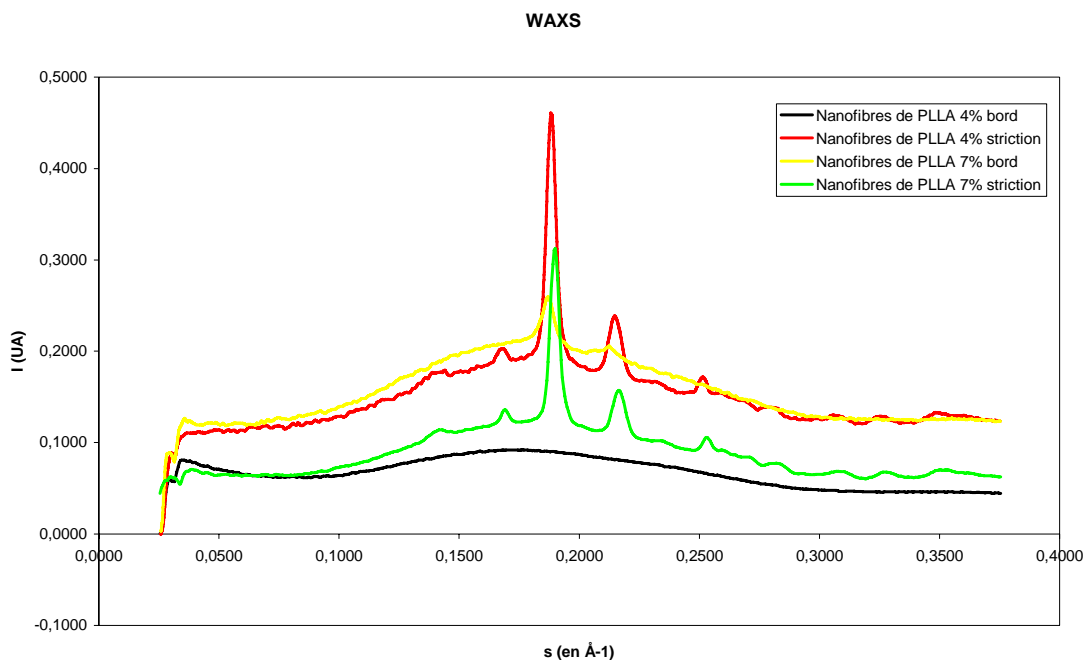


Figure 46 : Intensité du signal de diffraction des rayons X pour les grands angles dans des échantillons de nanofibres de PLLA soumis à un fluage jusqu'à rupture et produits à partir de solution à 4% (mesure sans déformation courbe noire et mesure à la striction courbe rouge) et à 7% ((mesure sans déformation courbe jaune et mesure à la striction courbe verte).

Les résultats de l'analyse WAXS pour les éprouvettes soumises à un fluage sont présentés en Figure 46. Les mesures faites à la base des éprouvettes dans la zone des films de PLLA non soumise au fluage et à l'alignement subséquent des nanofibres présentes comme précédemment une forme typique des polymères amorphes, avec toutefois un léger pic apparaissant pour l'échantillon de nanofibres de PLLA produites à 7% pour une distance interréticulaire $D=0,536\text{nm}$. Les profils des courbes des mesures faites dans la zone la plus fortement étirée et donc où les nanofibres de PLLA sont plus alignées, montrent plusieurs pics de diffractions. Ceux-ci apparaissent pour des distances interréticulaires D égales à $0,707\text{nm}$, $0,592\text{nm}$, $0,526\text{nm}$, $0,462\text{nm}$ et $0,395\text{nm}$. Ces pics confirment donc la présence d'une structure cristalline au niveau des nanofibres de PLLA réorientées.

Appendice 2 : Techniques d'analyses

Angle de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide. L'utilisation de l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, permet de déduire le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) de la surface. [241]

Analyseur Mécanique Dynamique

L'Analyseur Mécanique Dynamique (DMA en Anglais pour Dynamic Mechanical Analyser) utilise le type de vibration forcée hors résonance. En appliquant un petit déplacement dynamique (noté D) à un échantillon du matériau à analyser, on mesure la force dynamique (F) résultante transmise par celui-ci. Le DMA mesure principalement deux grandeurs dynamiques : le déplacement et la force. Le déphasage entre les signaux d'entrée sinusoïdaux d'excitation et les signaux sinusoïdaux de sortie est donné par l'angle de phase δ . Le déphasage est lié aux propriétés viscoélastiques d'un matériau. L'angle δ est calculé à partir du traitement de ces signaux selon une transformée de Fourier rapide. Le facteur de perte du matériau est égal à la tangente de cet angle. Connaissant les dimensions de l'éprouvette, il est possible de calculer les modules du matériau.

Calorimétrie à balayage différentiel

La calorimétrie à balayage différentiel (DSC en anglais pour Differential Scanning Calorimetry) est une méthode d'analyse thermique qui mesure en fonction de la température la différence de quantité de chaleur nécessaire pour augmenter la température d'un échantillon par rapport à celle d'une référence. La mesure qu'elle nous donne est le flux thermique nécessaire pour que la température de l'échantillon augmente ou diminue à une vitesse choisie. Ce flux thermique est directement proportionnel à la capacité calorifique du matériau à une température donnée. Des transformations thermodynamiques de 1er ordre

comme la fusion vont se traduire par un pic, dont la surface est proportionnelle à l'enthalpie de transformation. Par contre, une transformation de 2e ordre sera caractérisée par une marche. À des températures suffisamment élevées, le polymère peut se décomposer si la température de stabilité thermique du polymère est dépassée, des réactions de dégradation peuvent avoir lieu. Ces réactions peuvent être exothermiques ou endothermiques, selon la nature chimique du polymère et l'atmosphère environnante (inerte ou oxydative). [242]

Dosage d'immunosorption liée à enzyme (ELISA)

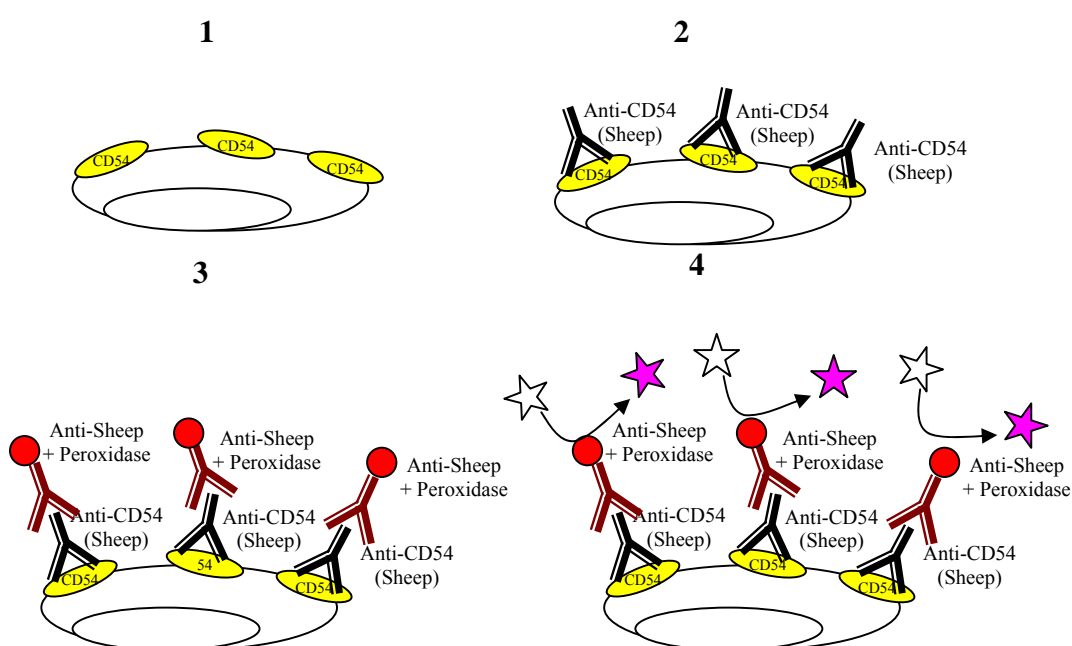


Figure 47 : (1) Cellule exprimant le facteur CD54, (2) liage d'un anticorps primaire extrait du mouton au CD142, (3) liage d'un anticorps anti mouton sur les anticorps anti-CD54, greffés avec une enzyme, (4) conversion du substrat par l'enzyme sous forme fluorescente

L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est un test biologique utilisant le principe de dosage d'immunosorption liée à enzyme. Principalement utilisée en immunologie, elle permet la détection de protéines spécifiques par le biais d'anticorps spécifiques (anticorps primaires) qui se lient au matériel que l'on cherche à détecter et qui sont eux même la cible d'anticorps secondaires, moins onéreux que les premiers et qui sont couplés avec des enzymes permettant la transformation d'un substrat en colorant ou en

composés fluorescents. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode illustrée en Figure 47 pour détecter le CD54 et le CD142. Elle permet de directement les facteurs sélectionnés sur les cellules.

Note : Le terme CD est l'abréviation pour Clusters de Différenciation, une nomenclature désignant les antigènes exprimés par les populations de cellules.

Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM en anglais pour Atomic Force Microscope) est une sonde d'analyse locale qui permet d'obtenir des images tridimensionnelles de la topographie des surfaces avec une très haute résolution spatiale et verticale. Le microscope à force atomique fonctionne à l'air libre, sous vide, mais également en milieu liquide ce qui élargit ses possibilités à des domaines comme l'électrochimie ou l'étude des matériaux biologiques vivants. Sa pointe, ou stylet est sensible à différents types de forces : les forces de Van Der Waals, les forces répulsives, les forces électrostatiques et magnétiques, les forces adhésives et de friction. Ainsi, la microscopie à force atomique permet également de fournir des mesures de propriétés physiques, mécaniques (élasticité, viscosité), tribologiques (friction, adhésion), magnétiques et électriques avec une résolution dans le domaine nanométrique.

Le stylet est monté sur un levier très flexible ; et la mesure de la flexion du levier (dans un sens ou dans l'autre) donne une mesure directe de la force d'interaction entre la surface sondée et la pointe. Il existe en fait trois modes d'utilisation de l'AFM : le mode contact (la pointe en contact avec la surface réagit avec les forces de répulsion), le mode non-contact (la pointe n'est pas en contact avec la surface et réagit avec les forces d'attraction, mode peu utilisé) et enfin le mode contact intermittent (la pointe vibre à sa fréquence de résonance et interagit avec la surface par variation de son amplitude, c'est le mode le plus utilisé). La mesure se fait généralement à l'aide d'un faisceau laser réfléchi par le levier. Toute déviation du laser indique un changement dans la position du levier. [243]

Microscopie électronique à balayage

Un microscope électronique à balayage (MEB, ou SEM en anglais pour Scanning Electron Microscope) fournit des informations sous forme d'images lumineuses, résultant de l'interaction d'un faisceau d'électrons avec un volume microscopique de l'échantillon étudié. Il est constitué d'une enceinte sous vide secondaire où un faisceau électronique est mis en forme par des lentilles électromagnétiques pour exciter l'objet à étudier. La source d'électrons est un filament de tungstène parcouru par un courant de chauffage. Le wehnelt, plaque percée d'un orifice et portée à une tension positive de quelques centaines de Volts, est placé à proximité de la pointe du filament. L'accélération des électrons est réalisée par une deuxième plaque percée également d'un orifice et portée à un potentiel ajustable. Le flux d'électrons est ensuite limité par les diaphragmes et focalisé sur l'échantillon à l'aide de différentes bobines électromagnétiques. Des bobines déflectrices en x et en y permettent de déplacer le pinceau électronique à la surface de l'échantillon.

Le faisceau électronique pénètre ponctuellement dans l'échantillon et y diffuse dans un volume d'interaction varie entre $0.01 \mu\text{m}^3$ et $100 \mu\text{m}^3$ selon certaines conditions qui dépendent de la densité de la matrice ainsi que de l'énergie des électrons incidents, donc de la tension d'accélération du microscope. L'interaction entre les électrons incidents et l'échantillon produit l'émission d'électrons d'énergies différentes, de rayons X et de luminescence. Les électrons secondaires de faible énergie cinétique sont émis près de la surface de l'échantillon et sont très sensibles à la topographie de l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés, réémis avec une énergie identique ou légèrement inférieure à l'énergie initiale, sont typiques des échantillons riches en éléments lourds. Les rayons X donnent quant à eux de l'information sur la nature des éléments excités. [244, 245]

Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS en anglais pour X-Ray Photoemission Spectrometry) est une technique d'analyse de la chimie de surface qui permet d'obtenir le pourcentage atomique des différents éléments présents dans l'échantillon analysé ainsi que des informations sur l'environnement atomique de chacun de ces éléments. Cette technique permet d'obtenir la composition chimique d'une surface

d'un matériau sur une profondeur de 10 nm. Presque tous les éléments sont détectés, sauf l'hydrogène.

Son principe consiste à irradier l'échantillon par des rayons X monochromatiques qui provoquent l'ionisation de ses atomes par effet photoélectrique. L'énergie cinétique E_c de ces photoélectrons est mesurée et comparée à l'énergie d'émission, ce qui donne une indication sur l'énergie de liaison E_L (relation d'Einstein : $E_c = h \cdot \nu - E_L$ avec h la constante de Planck et ν la fréquence de la radiation). L'analyse des photoélectrons donne le spectre de l'intensité des électrons en fonction de l'énergie mesurée. [246, 247]

Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR en anglais pour Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 – 25 μm) correspond au niveau d'énergie vibrationnelle des molécules.

Lorsque la longueur d'onde apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre, le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice qui divise le signal en deux. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en

fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme qui est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Il est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier. [248]

Appendice 3 : Protocoles

Protocole de culture des BAECs, adhérence et prolifération

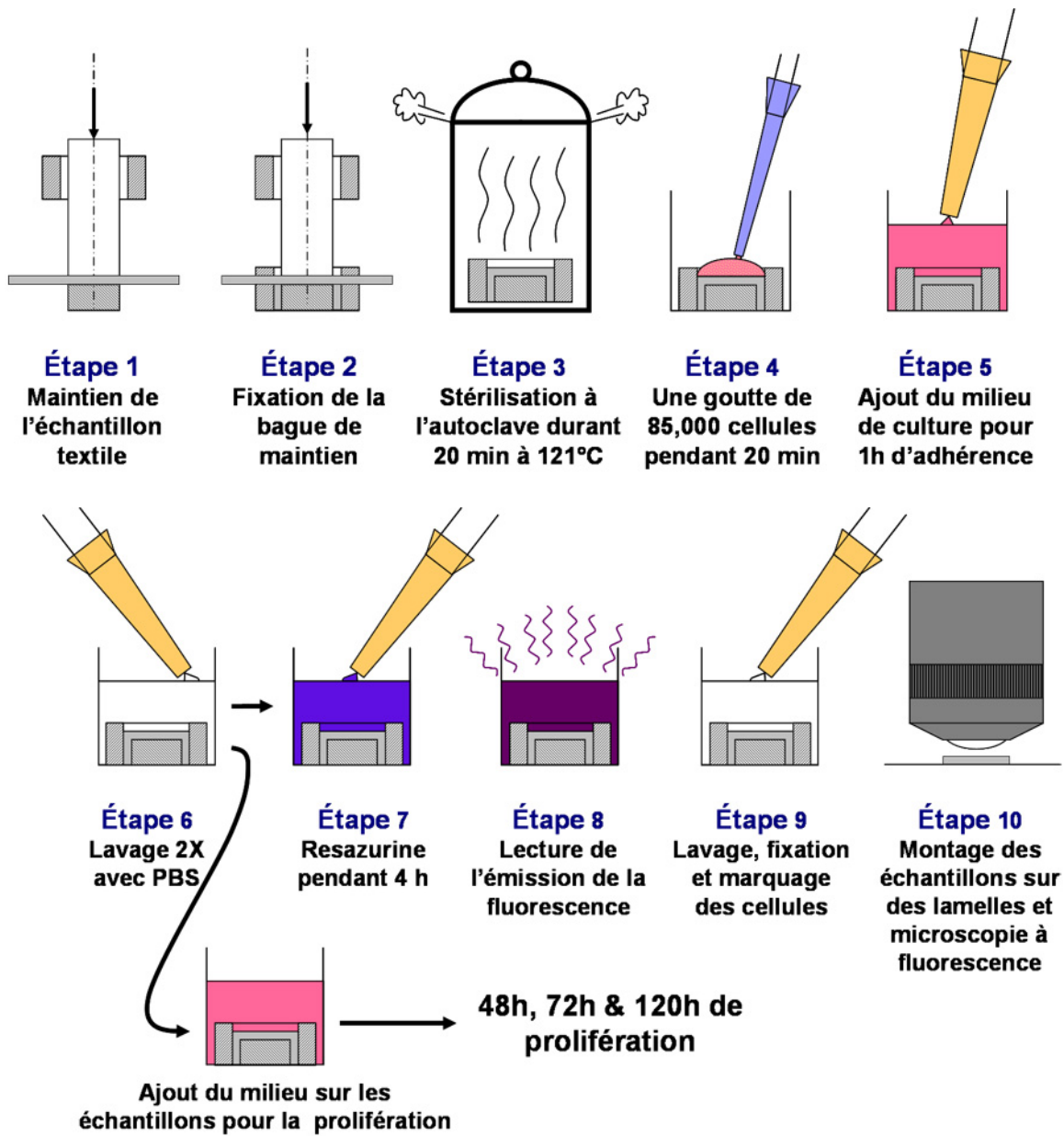


Figure 48 : Schématisation du protocole de culture cellulaire

Préparation des échantillons

1. Laver les bagues et les cylindres de Téflon (acétone, eau déionisée et isopropanol 70% dans le bain à ultrasons)
2. Monter les échantillons de textiles sur les supports
3. Monter les échantillons contrôles sur les supports
4. Placer tous les échantillons dans des sachets individuels pour autoclave

Préparation des produits :

1. PBS stérile
2. Trypsine 1x
3. Medium = DMEM+10% Sérum de veau fœtal (SVF) +1% d'antibiotique (10000 unités/ml pénicilline G sodium, 25µg/ml amphotéricine B, 10000µg/ml streptomycine Sulfate, 0.85% saline)
4. Tripaun bleu
5. Résazurine ((1/5 dans du DMEM sans SVF)
6. Formaldéhyde 3.7%
7. Na Azide

Culture de cellules en préparation des tests :

1. Décongeler vial de cellules (BAECs)
2. Mettre en flasque avec 10mL de medium et mettre en incubateur (37°C, 5%CO₂)
3. Changer le médium entre 3 et 8h après le début de la culture afin d'éliminer le DMSO restant
4. Laisser incuber jusqu'à confluence (3 jours)

Test d'adhérence et de prolifération :

5. Jour J : Stériliser les échantillons (Autoclave 20min à 121°C)
6. Préparer les plaques « adhérence » avec les échantillons immergés dans du PBS
7. Sortir la flasque de cellules de l'incubateur et aspirer le milieu
8. Rincer avec du PBS
9. Ajouter 2mL de trypsine pendant 1 min puis décrocher les cellules en frappant la flasque à l'horizontal
10. Bloquer la trypsine avec 10mL de médium et transférer dans un tube 15mL (en faisant des aller-retour avec la pipette)
11. Centrifuger le tube avec son contrepoids à 1500tr/min durant 5min
12. Aspiration du surnageant et ajout de 5mL de medium
13. Retourner le tube et tapoter le culot du tube pour décrocher les cellules et homogénéiser la suspension
14. Prélever 10µL de suspension cellulaire et 10µL de tripan bleu, mélanger et placer 15µL de ce mélange sur l'hématocytomètre sous une lamelle en verre
15. Compter les cellules dans chacun des quatre damiers extérieurs de la gravure et faire la moyenne et multiplier par 2 (à cause de la dilution du tripan bleu) et par 10 (car chaque damier contient 0.1µL) pour avoir la concentration en cellules par µL

16. Ajuster la concentration en fonction du nombre de cellules requises : 85000 cellules par échantillons, 48 échantillons et 12 contrôles PET, ainsi que 16 doses pour faire les courbes étalons, soit un total de $76 \times 85000 = 6460000$ cellules. Par sécurité, préparer 80 doses soit 6800000 cellules dans $80 \times 50\mu\text{L} = 4\text{mL}$ de médium
17. Aspirer le PBS dans les plaques avec les échantillons (faire attention à ne pas aspirer les films de PET)
18. Mettre une goutte de $50\mu\text{L}$ sur chaque échantillon et laisser incubé 25min dans l'incubateur (37°C , $5\%\text{CO}_2$)
19. Sortir 4 plaques pour les tests : Adhérence, prolifération 48h, 72h et 120h
20. Pendant ce temps préparer les courbes étalons, deux par plaques de test. Pour chaque courbes :
 - a. Mettre une goutte de $50\mu\text{L}$ avec 85000 cellules dans le puit 1 et compléter avec $450\mu\text{L}$ de médium
 - b. Mettre une goutte de $50\mu\text{L}$ avec 85000 cellules dans le puit 2 et compléter avec $950\mu\text{L}$ de médium
 - c. Mettre $500\mu\text{L}$ de médium dans les 4 puits suivant
 - d. Prélever $500\mu\text{L}$ de solution cellulaire (faire des allers-retours) dans le puit 2 qui contient 1mL et transférer dans le puit 3
 - e. Répéter l'opération du puits 3 à 4, du 4 à 5 et du 5 à 6 et jeter les derniers $500\mu\text{L}$
21. Mettre les plaques de test avec courbe en incubateur (1h)
22. Sortir les plaques avec les échantillons et les contrôles PET et ajouter du médium dans chacun des puits occupés et placer en incubateur pour 1h
23. Sortir toutes les plaques après 1h et laver $2 \times \text{PBS}$ les échantillons, les contrôles PET et les courbes étalons
24. Transférer les échantillons et les contrôles PET prévus pour le test d'adhérence dans la plaque d'adhérence avec les 2 courbes étalons et ajouter $500\mu\text{L}$ de résazurine ($1/5$ de résazurine avec $4/5$ de DMEM) dans tous les puits des courbes, sur les échantillons, les contrôles PET et dans 3 puits contrôles et mettre en incubateur pour 4h
25. Transférer les échantillons et les contrôles PET prévus pour le test de prolifération 48h dans la plaque prolifération 48h avec les 2 courbes étalons et ajouter $500\mu\text{L}$ de milieu dans tous les puits des courbes, sur les échantillons, les contrôles PET et mettre en incubateur pour 48h. Idem pour la plaque prolifération 72h et la plaque prolifération 120h.
26. Diviser le reste de cellules en trois doses et les placer dans 3 petites flasques avec 5mL de milieu pour respectivement 48h, 72h et 120h d'incubation (Ces cellules serviront pour faire les courbes étalons aux tests de prolifération)
27. Sortir la plaque du test d'adhérence après 4h d'incubation
28. TRANSFÉRER $400\mu\text{L}$ de résazurine dans une nouvelle plaque et réserver
29. Aspirer le reste de la résazurine et laver $2 \times$ au PBS
30. Mettre $500\mu\text{L}$ de formaldéhyde $3,7\%$ pendant 20min (laisser sous la hotte)
31. Pendant ce temps, lire la fluorescence (EX 485nm EM 590nm Sensibilité 85) et sauvegarder le fichier sous le format AAAAMMJJAd
32. Après les 20min dans le formaldéhyde, laver $2 \times \text{PBS}$ et conserver les échantillons et les contrôles PET dans le dernier bain de PBS, dans lequel on ajoute $20\mu\text{L}$ de Na Azide et emballer la plaque dans du papier aluminium pour conservation à 4°C
33. J+2 : Sortir 2h avant la fin du test de prolifération la plaque 48h avec les cellules

34. Décrocher les cellules, suspendre, centrifuger, aspirer surnageant, suspendre, compter et préparer courbes étalons dans une nouvelle plaque (P2), mettre en incubation 1h synchronisée avec la fin du test de prolifération
35. Sortir la plaque du test de prolifération 48h préparée au moment du test d'adhésion (P1) et P2, aspirer le milieu, laver tout 2xPBS et transférer les échantillons et les contrôles PET de la plaque P1 à P2.
36. Ajouter 500µL de solution de résazurine (1/5 de résazurine avec 4/5 de DMEM) dans tous les puits des courbes, sur les échantillons, les contrôles PET et dans 3 puits contrôles, de P2, idem sur dans les puits similaires de P1 et mettre les deux plaques en incubateur pour 4h
37. Sortir les plaques P1 et P2 après 4h d'incubation
38. TRANSFÉRER 400µL de résazurine de P1 dans une nouvelle plaque P1' et de P2 dans une nouvelles plaque P2', puis réserver
39. Aspirer le reste de la résazurine dans P2 et laver 2x au PBS
40. Mettre 500µL de formaldéhyde 3,7% pendant 20min (laisser sous la hotte)
41. Pendant ce temps, lire la fluorescence (EX 485nm EM 590nm Sensibilité 85) des deux plaque P1' et P2' et sauvegarder les fichiers sous le format AAAAMMJJ1 et AAAAMMJJ2
42. Après les 20min dans le formaldéhyde, laver 2xPBS et conserver les échantillons et les contrôles PET dans le dernier bain de PBS, dans lequel on ajoute 20µL de Na Azide et emballer la plaque dans du papier aluminium pour conservation à 4°C
43. J+3 : idem depuis étape 34 à étape 43 avec plaque et flasque prolifération 72h
44. J+3 : changer le milieu de la plaque et de la flasque prolifération 120h
45. J+5 : idem depuis étape 34 à étape 43 avec plaque et flasque prolifération 120h et etc. pour toute prolifération plus longue. Bien veiller à changer aux trois jours le milieu de culture et à ne pas dépasser le passage 5-6 pour les cellules devant servir aux courbes étalons.

Marquage DAPI/rhodamine-phalloïdine

1. Sortir du réfrigérateur les plaques contenant les échantillons
2. Aspirer le PBS
3. Perméabiliser les cellules avec une solution de TRITON-X-100 à 0,1% dans du PBS pendant 3 min à température ambiante
4. Laver 5x au PBS
5. Mettre dans les puits une solution de BSA à 3% dans du PBS pendant 30min à température ambiante et aspirer
6. Préparer dans l'obscurité une solution de DAPI (1 :2000) et de rhodamine-phalloïdine (1 :500), suffisamment pour déposer 60 gouttes de 50µL et de quoi remplir quelques puits, soit environ 5mL de solution
7. Marquer les cellules avec la solution de fluorophores durant 45min à 1h dans l'obscurité
8. Laver 5x au PBS
9. Conserver à 4°C dans le dernier bain de PBS et emballer des plaques dans de l'aluminium

Montage des échantillons sur lamelle de verre :

1. Sortir les plaques du réfrigérateur

2. Préparer les lamelles de verre, un bistouri, une pincette et le dako
3. Découper l'échantillon de son support et le placer sur une goutte de dako sur la lamelle en verre, recouvrir d'une autre goutte et d'une lamelle en verre
4. Celer les bords avec du ruban adhésif

Tests ELISA

Concentration des Anticorps

Anti CD54 (sheep) 1/200, soit diluer 200 X un aliquot de 20 μ L
 Anti CD142 (mouse) TF1 1/200, soit diluer 200 X un aliquot de 40 μ L
 Anti CD142 (mouse) TF5 1/200, soit diluer 200 X un aliquot de 40 μ L
 Anti sheep Peroxydase 1/5000, soit diluer 5000 X un aliquot de 40 μ L
 Anti mouse Alcaline Phosphatase 1/10000, soit diluer 10000 X un aliquot de 40 μ L

Préparation des substrats :

AMPLEX RED (en rouge) : Dissoudre 10mM d'Amplex Red dans du DMSO (MW=257,25, donc 5mg dans 1944 μ L de DMSO) et aliquoter

MUP (en bleu) : à faire au dernier moment : Peser la plus petite quantité de MUP et ajuster le volume de tampon pour avoir une concentration de 0,6mM (MW=300,1, donc ...)

MUP 4-Methylumbelliferyl phosphate est clivé en 4-methylumbelliférol, fluorescence max à pH 10.3, avec excitation max à 364 nm et émission à 448 nm. Fluorescence moins intense mais mesurable jusqu'à pH 5. Décalage max jusqu'à 330 nm.

Amplex Red est peroxydé en resorufine, avec excitation max à 563 nm et émission à 587 nm

Disposition des échantillons

	1	2	3	4	5	6	7	8
A		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl
B		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl
C		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl
D		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl
E		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl
F		PET	CK	PLA	PET	CK	PLA	Ctrl

Protocole ELISA

- Préparer PBS + BSA 1%
- Disposer au fond de 36 puits d'une plaque 48 puits les échantillons suivants
 - 6 échantillons PET vierges + EC en condition statique après Pro48h
 - 6 échantillons CK en condition statique après Pro48h

- 6 échantillons CK avec fibre de PLA en condition statique après Pro48h
- 6 échantillons PET vierges + EC en condition dynamique (+6h) après Pro48h
- 6 échantillons CK en condition dynamique (+6h) après Pro48h
- 6 échantillons CK avec fibre de PLA en condition dynamique (+6h) après Pro48h
- laver 5X au PBS
- Bloquer tous les puits avec du PBS + BSA 1% pendant 1h à 37°C (prévoir 6 contrôles)
- Pendant la dernière demi heure, préparer les Ac1 dans PBS + 1% BSA à la bonne concentration (voir C° Ac) : 50µL par puit, soit 18*50µL par Ac1 = 9 mL de PBS + 1% BSA et 45µL de Ac1
- Sortir la plaque de l'incubateur et laver 1X au PBS
- Recouvrir les puits de Ac1 et laisser incuber pendant 2h à 37°C
- Pendant la dernière demi heure préparer Ac2 dans PBS + 1% BSA à la bonne concentration (voir C° Ac)
- Sortir la plaque de l'incubateur et laver 3X au PBS
- Recouvrir les puits de Ac2 et laisser incuber pendant 2h à 37°C
- Pendant la dernière demi heure préparer substrat : 36*200µL=7,2 mL
 - exemple, 7,5mL de tampon substrat (Sodium Phosphate pH 7,4) + 75µL d'Amplex Red aliquoté + 2µL H₂O₂ 30%,
 - peser la plus petite quantité de MUP (MW=300,1) et ajuster le volume de tampon (tampon DEA à pH 9,8) pour une concentration de 0,6mM.
- Sortir la plaque de l'incubateur, aspirer et laver avec 3X tampon lavage (tris) ELISA
- Remplir les puits avec Substrat (MUP et Amplex dans tampons appropriés) et laisser incuber, faire lecture à 1h

Pour une campagne complète :

12 échantillons (3 PET, 3 Col, 3 CK et 3 PLA) pour adhérence 1h
 12 échantillons (3 PET, 3 Col, 3 CK et 3 PLA) pour prolifération 48h
 18 échantillons (6 PET, 6 CK et 6 PLA) pour ELISA statique
 18 échantillons (6 PET, 6 CK et 6 PLA) pour ELISA dynamique
 Soit 60 échantillons