**TABLE DES MATIÈRES**

Page

INTRODUCTION ..... 1

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE ..... 5
1.1 Contexte clinique ..... 5
1.1.1 Structure des artères ..... 5
1.1.2 L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) ..... 8
1.1.3 Traitements des anévrismes de l'aorte abdominale ..... 12
1.1.3.1 Réparation endovasculaire (EVAR) vs. chirurgie ouverte ..... 12
1.1.3.2 Problématiques liées à l'EVAR ..... 14
1.1.4 Les biomatériaux utilisés actuellement pour les EC ..... 17
1.1.5 Innovations industrielles ..... 19
1.1.6 Conclusion et stratégie à la base du projet ..... 21
1.2 Interactions biologiques avec les matériaux ..... 22
1.2.1 Interactions biomatériau/protéines ..... 22
1.2.2 Interactions cellules/ surface ..... 24
1.2.3 Réaction immunitaire et guérison ..... 27
1.3 Modification de surface des biomatériaux vasculaires ..... 29
1.3.1 Modifications physicochimiques ..... 30
1.3.1.1 Modification de surface par plasma ..... 30
1.3.1.2 Modifications par voie humide ..... 32
1.3.1.3 Limites de modifications physico-chimiques ..... 33
1.3.2 Fonctionnalisation par ajout de biomolécules ..... 34
1.3.2.1 Libération progressive ..... 35
1.3.2.2 Immobilisation non spécifique ou aléatoire ..... 36
1.3.2.3 Immobilisation spécifique ou orientée ..... 38
1.3.2.4 Sous-couche antiadhésive pour l'immobilisation de biomolécules ..... 41
1.4 Biomolécules pour l'ingénierie tissulaire et la guérison vasculaire ..... 43
1.4.1.1 Molécules de la MEC ..... 43
1.4.1.2 Facteurs de croissance pour cellules vasculaires ..... 48
1.5 Travaux disponibles dans la littérature présentant des revêtements bioactifs basés sur des facteurs de croissance pour favoriser la guérison autour des EC ..... 56

CHAPITRE 2 OBJECTIFS DU PROJET ..... 61

CHAPITRE 3 ÉVALUATION IN VITRO ET IN VIVO D'UN REVÊTEMENT BIOACTIF POUR ENDOPROTHÈSE COUVERTE BASÉ SUR LA CHONDROITINE SULFATE ET LE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME ..... 65
3.1 Mise en contexte ..... 65
3.2 ABSTRACT ..... 66

3.3 INTRODUCTION ..... 67
3.4 METHODS ..... 69
3.4.1 Coating preparation ..... 69
3.4.1.1 L-PPE:N deposition ..... 69
3.4.1.2 CS and EGF grafting ..... 69
3.4.2 Chemical and Mechanical Characterization ..... 69
3.4.2.1 Surface composition and morphology ..... 69
3.4.2.2 E-modulus and tensile strength ..... 70
3.4.3 Biological characterization ..... 70
3.4.3.1 Cell culture materials ..... 70
3.4.3.2 Cell survival on PET films ..... 70
3.4.3.3 AoSMC survival on ePTFE membranes ..... 71
3.4.3.4 Cell morphology on ePTFE membranes ..... 71
3.4.4 Durability of the coatings ..... 71
3.4.5 Coating transfer onto stent-grafts ..... 71
3.4.5.1 Coating procedure on SG ..... 72
3.4.5.2 Coating homogeneity and adhesion on SG ..... 72
*3.4.6 In vivo* implantation procedure ..... 72
3.4.7 Statistical analysis ..... 73
3.5 RESULTS ..... 74
3.5.1 Human vascular cell adhesion and survival on coated PET surfaces ..... 74
3.5.2 Transfer onto PTFE substrates ..... 76
3.5.2.1 Physical and Chemical characterization ..... 76
3.5.2.2 Coating adhesion and resistance to ePTFE SG deployment ..... 78
3.5.2.3 Biological characterization ..... 79
3.5.3 Stability of LP/CS/EGF coatings on ePTFE ..... 81
3.5.4 *In vivo* testing ..... 81
3.6 DISCUSSION ..... 84
3.7 CONCLUSION ..... 87

CHAPITRE 4 EFFETS BÉNÉFIQUES ADDITIFS DE LA CHONDROITINE SULFATE ET DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ DE FAÇON ORIENTÉE POUR LA SURVIE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES ..... 89
4.1 Mise en contexte ..... 89
4.2 Abstract ..... 91
4.3 Introduction ..... 92
4.4 Materials and methods ..... 94
4.4.1 Materials and reagents ..... 94
4.4.2 Kcoil and Ecoil-tagged EGF Production ..... 94
4.4.3 CS, CMD and EGF Immobilization ..... 95
4.4.3.1 Surface and Polymer Preparation ..... 95
4.4.3.2 Polymer Grafting on Aminated Silicon Surfaces and Aminated Microplates ..... 95

4.4.3.3 EGF Covalent Immobilization on CMD- and CS-coated surfaces ..... 96
4.4.3.4 Ecoil-Tagged EGF Capture on Kcoil Layers ..... 96
4.4.4 Physical and chemical characterization ..... 97
4.4.4.1 Ellipsometry ..... 97
4.4.4.2 Water contact angle ..... 97
4.4.4.3 Surface EGF quantification by ELISA ..... 97
4.4.5 Cellular assays ..... 98
4.4.5.1 Cell culture materials ..... 98
4.4.5.2 Cell survival in serum-free medium ..... 98
4.4.5.3 Cell apoptosis ..... 99
4.4.6 Statistical analysis ..... 99
4.5 Results ..... 100
4.5.1 Characterization of oriented EGF immobilization on CS via coiled-coil interaction ..... 100
4.5.2 ELISA quantification of immobilized EGF ..... 102
4.5.3 Bioactivity of the coatings ..... 104
4.5.3.1 Cell adhesion and survival ..... 105
4.5.3.2 Cell apoptosis. ..... 109
4.6 Discussion ..... 110
4.7 Conclusions ..... 114

CHAPITRE 5 CO-IMMOBILISATION CONTROLÉE DE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME ET DE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPITHÉLIUM VASCULAIRE POUR OPTIMISER LA SURVIE DES CELLULES VASCULAIRES ..... 115
5.1 Mise en contexte ..... 115
5.2 Abstract ..... 116
5.3 Introduction ..... 117
5.4 Materials and methods ..... 120
5.4.1 Materials and Reagents ..... 120
5.4.2 Kcoil, Ecoil-tagged EGF and Ecoil-tagged VEGF Production ..... 120
5.4.3 Chondroitin sulfate and Growth Factor Immobilization ..... 121
5.4.3.1 Chondroitin sulfate coating preparation ..... 121
5.4.3.2 E-EGF and E-VEGF Capture on Kcoil Layers ..... 121
5.4.4 Surface growth factor quantification by ELISA ..... 122
5.4.5 Stability of coiled-coil immobilization ..... 123
5.4.6 Cellular assays ..... 123
5.4.6.1 Cell culture materials ..... 123
5.4.6.2 Cell survival in serum-free medium ..... 124
5.4.7 Statistical analysis ..... 124
5.5 RESULTS ..... 125
5.5.1 Characterization of immobilized growth factors ..... 125
5.5.2 Bioactivity of immobilized growth factors ..... 130
5.5.2.1 HUVEC ..... 130

5.5.2.2 AoSMC ..... 132
5.6 DISCUSSION ..... 134
5.7 CONCLUSION ..... 138

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE ..... 141

CONCLUSION ..... 155

ANNEXE I STÉRILISATION DES REVÊTEMENTS L-PPEN et L-PPE:N+CS ..... 157

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 165

## LISTE DES TABLEAUX

Page


Tableau 1.1 Les principaux composants de la matrice extracellulaire et leur rôle ..... 7

Tableau 1.2 Dispositifs commercialisés pour améliorer la fixation des EC ..... 20

Tableau 1.3 Exemples d'utilisation plasma pour applications vasculaires ..... 31

Tableau 1.4 Groupes fonctionnels disponibles chez les acides aminés et nature chimique des surfaces nécessaires pour une immobilisation covalente ..... 37

Tableau 1.5 Exemples de revêtements développés à base de molécules de la MEC pour des applications vasculaires ..... 44

Tableau 1.6 Prix minimum approximatif des GAG ..... 48

Tableau 1.7 Facteurs de croissance impliqués dans la guérison ..... 49

Tableau 3.1 Evolution of surface composition during coating creation measured by X-ray photoelectronic spectroscopy (XPS) on ePTFE (n=6). Average ± standard deviation. - : not observed ..... 76

Tableau 3.2 Sequential grafting steps of LP, CS and EGF on PTFE film monitored by water contact angle (n=9) ..... 77

Table 4.1 Non-specific adsorption of EGF measured by ELISA. EGF was incubated at 100 nM (in PBS) for 1h on bare aminated microplate wells, CS and CMD ..... 104

Table 5.1 HUVEC single cell area after 2 days in serum-free medium (Mean ± SD; no statistical difference between groups) ..... 132

Table 5.2 AoSMC single cell area after 7 days in serum-free medium (mean + SD). *: Statistical difference with 20 nM E-EGF and 20 nM E-EGF + 0.1 nM E-VEGF conditions ($p < 0.05$) ..... 134

## LISTE DES FIGURES

Page


Figure 1.1 Structure de la paroi artérielle ..... 6

Figure 1.2 Anévrisme de l'aorte abdominale ..... 9

Figure 1.3 Voies de signalisation de l'apoptose menant à l'activation des caspases. Figure tirée de (Taylor, Cullen et al. 2008) ..... 10

Figure 1.4 Traitement de l'AAA par chirurgie ouverte (à gauche) et réparation endovasculaire (à droite). Figures tirées respectivement de (Azencott 2015) et de (Mayo-Foundation-for-Medical-Education-and-Research 2015) ..... 13

Figure 1.5 Les différents types d'endofuites après EVAR ..... 15

Figure 1.6 Endoprothèse couverte. ..... 16

Figure 1.7 Structures chimiques du PET et du PTFE ..... 18

Figure 1.8 Exemples d'endoprothèses récemment approuvées ..... 21

Figure 1.9 Régulation du comportement cellulaire par le microenvironnement ..... 25

Figure 1.10 Modèle de dimérisation des récepteurs tyrosines kinases ..... 27

Figure 1.11 La réponse inflammatoire de l'hôte après implantation d'un biomatériau ..... 28

Figure 1.12 Schéma présentant de techniques d'immobilisation de biomolécules et certaines de leurs limites ..... 34

Figure 1.13 Structure des peptides Ecoil et Kcoil ..... 40

Figure 1.14 Schéma illustrant l'utilité d'une sous-couche antiadhésive ..... 41

Figure 1.15 Les différentes isoformes de la chondroitine sulfate diffèrent ..... 46

Figure 1.16 Voies de signalisation de EGFR ..... 51

Figure 1.17 Voies de signalisation de VEGFR ..... 54

Figure 3.1 Human aortic smooth muscle cells adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by alamarBlue (a) and observed by cristal violet staining (b). Scale


Rapport-Gratuit.com

bars: 200µm. Statistical differences *, **: p<0.05 compared to PET at D4 and D7 respectively (n=12).....74

Figure 3.2 Human aortic fibroblasts adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by alamarBlue (a) and observed by cristal violet staining (b). Scale bars: 200µm. Statistical differences *, **: p<0.05 compared to PET at D4 and D7 respectively (n=12) .....75

Figure 3.3 SEM images displaying the surface morphology of ePTFE before (a) and after bioactive coating creation (b) .....77

Figure 3.4 Stress-strain curve of ePTFE with and without the bioactive coating (average calculated with n=6 for each condition).....78

Figure 3.5 Adhesion of the coating after passage through an insertion valve. Coating is stained using fuchsine acid .....79

Figure 3.6 Human aortic smooth muscle cells adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by cell count after Hoescht 33342 staining. Cell counts are normalized to the cell count on ePTFE at D0 for each experiment. Statistical differences *, **,***: p<0.05 compared to bare ePTFE at D0, D4 and D7 respectively (n=12).....80

Figure 3.7 Confocal microscope images of human aortic smooth muscle cells after 7 days. Nuclei were stained with Hoescht 33342 (blue) and actin cytoskeletons with phalloidin-Alexa 488 (green). Scale bars: 150 µm. (n=4) .....81

Figure 3.8 Exakt histological section (with hematoxylin and eosin staining) of an explanted stent graft showing the misfit created with a balloon catheter after implantation at the proximal neck to create a type I endoleak (double white arrow). Scale bar: 1mm. n.b some post-mortem intraluminal thrombus is present in the lumen (single black arrow).....82

Figure 3.9 (a) Transverse tissue sections taken at the middle of aneurysms for each dog, with control (first row) or bioactive SG (second row). Leak are indicated by double arrows and fresh thrombus by single dotted arrows. Scale bars: 5 mm. *n.b. some post-mortem intraluminal thrombus is present in the lumen.* (b) Example of endoleaks from dog #1, bioactive SG, detected on CT Scan (left) and histological sections stained by HPS (right) .....83

Figure 3.10 Maximal area (in percentage of the total aneurysm section) corresponding to leak and fresh thrombus for the 3 bioactive and 3 control stent-grafts ..... 84

Figure 4.1 Graphical abstract ..... 91

Figure 4.2 Schematic illustration of the grafting steps for the oriented EGF immobilization on CS and CMD. The grafting of CS or CMD layers on aminated surfaces was followed by the chemical grafting of cysteine-tagged Kcoil peptides using EMCH as heterobifunctional linker. Remaining EMCH thiol-reactive groups were deactivated using cysteine molecules. Ecoil-tagged EGF proteins were captured on the surface via the reversible E/K coiled-coil interaction ..... 101

Figure 4.3 Sequential grafting of Ecoil-EGF on CS-coated surfaces via coiled-coil interactions followed by dry thickness measured by ellipsometry. (a) APTES; (b) APTES+CS; (c) APTES+CS+EMCH+Kcoil+cysteine; (d) Ecoil-EGF capture on (c); (e) Ecoil-EGF removal after capture (as in d) with guanidium hydrochloride (5 M). As a negative control (g), Ecoil-EGF was incubated on (f) cysteine-blocked EMCH layers (no Kcoil). The reference was set as (0 nm, 0°) for a cleaned silicon wafer surface. ($n = 3$) ..... 102

Figure 4.4 Variation of EGF surface density on CS and CMD with Ecoil-tagged or untagged EGF concentration during incubation. Apparent surface densities for oriented and randomly grafted EGF were evaluated by direct ELISA ($n \geq 8$) ..... 103

Figure 4.5 VSMC adhesion after 24h in complete growth medium. VSMC adhesion was expressed (in %) as alamarBlue signal at D0 on each surface normalized to the signal at day 0 on PS (100%). Soluble EGF (Sol. EGF) was added at 10 ng/mL in culture medium. EGF surface densities on CS and CMD were identical, i.e. 1.5 and 45 fmol/cm$^2$ for random (Rand. EGF) and oriented (Ori. EGF) immobilization, respectively. Statistical difference noticed * $p < 0.005$ ..... 106

Figure 4.6 VSMC survival in serum-free conditions. After 24h in complete growth medium for adhesion (D0), cells were exposed to serum-free medium for 3, 5 or 7 days (D3, D5 and D7). VSMC survival (in %) was expressed as a ratio of alamarBlue signal at day 3, 5 and 7 to the signal at day 0 on the same surface. Soluble EGF (Sol. EGF) was added at 10 ng/mL in culture medium. EGF surface densities on CS and CMD were identical, i.e. 1.5 and 45 fmol/cm$^2$ for random (Rand. EGF) and oriented immobilization (Ori. EGF), respectively.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Statistical differences between random and oriented EGF on CS were *: $p = 0.01$ at D3, **: $p < 0.0001$ at day 5 and 7 ($n \geq 8$) ..... 107

Figure 4.7 VSMC density and homogeneity observed by crystal violet staining. After 24h adhesion in complete growth medium, cells were left for 7 days in serum-free conditions. Soluble EGF concentration (10 ng/mL) and surface EGF densities (1.5 fmol/cm$^2$ for random grafting and 45 fmol/cm$^2$ for oriented tethering) were identical for all substrates. ..... 108

Figure 4.8 Percentages of apoptotic and necrotic VSMC in serum-free conditions. After 8h in complete growth medium for adhesion, the cells were exposed to either complete (control) or serum-free (pro-apoptotic) medium for 14h. Apoptotic and necrotic cells were counted after Hoescht 33342/propidium iodide staining, and percentages were obtained by the ratio of apoptotic (or necrotic) cells over total number of cells. Statistical differences were *: $p < 0.005$ between CS and PS**: $p = 0.2$ between CS and random EGF (Rand. EGF) and ***: $p = 0.01$ between CS and oriented EGF (Ori. EGF) ($n = 8$) ..... 110

Figure 5.1 Concept of the Ecoil-tagged EGF (E-EGF, monomeric) and Ecoil-tagged VEGF (E-VEGF, dimeric) co-capture on Kcoil-decorated chondroitin sulfate (CS) ..... 122

Figure 5.2 Single capture (A) and simultaneous capture (B) of E-EGF and E-VEGF on Kcoil-functionalized CS surfaces. Relative ELISA signal as a function of growth factor incubation concentrations (Mean ± SD, n≥8) ..... 126

Figure 5.3 Non specific adsorption and coiled-coil mediated capture of E-EGF and E-VEGF on chondroitin sulfate. Relative ELISA signal as a function of growth factor incubation concentrations (Mean ± SD, n≥4) ..... 128

Figure 5.4 Sequential tethering of (A) 20 nM E-EGF or (B) 20 nM E-VEGF incubated over Kcoil-functionalized CS surfaces that had been pre-incubated with varying concentrations of (A) E-VEGF or (B) E-EGF. The data are presented as ELISA signal relative to a single capture of (A) 20 nM E-EGF and (B) 20 nM E-VEGF (without pre-incubation) ..... 129

Figure 5.5 Stability assay. Relative retention rates of E-EGF (A) and E-VEGF (B) after 3-day or 8-day treatments in cell culture conditions estimated by direct ELISA. The retention rates of E-EGF and E-VEGF after the ageing treatments are expressed relatively to the

signal obtained on fresh surfaces (Mean % ± SD, n≥3). 3-day treatment is comparable to HUVEC survival test: 1-day adhesion in complete medium EGM containing 2% FBS and 2-day survival in basal EBM. 8-day treatment is comparable to AoSMC survival test, 1-day adhesion in complete medium SmGM containing 5% FBS and 7-day survival in basal SmBM ..... 129

Figure 5.6 HUVEC survival after 2 days in serum-free medium. Ratio of metabolic activity estimated by resazurin assay at 2 days relative to initial adhesion (Mean ± SD; n = 12). *: Statistical difference with all other conditions ($p < 0.005$) ..... 131

Figure 5.7 Morphology of HUVEC after 2 days in serum-free medium, actin and nucleus staining. Scale bar: 200 µm ..... 131

Figure 5.8 AoSMC survival after 7 days in serum-free medium. Ratio of metabolic activity estimated by resazurin assay at 7 days compared to initial adhesion (Mean ± SD; n = 12). *: Statistical difference with all other conditions ($p < 0.005$), except with the co-incubation of E-EGF 20 nM and E-VEGF 1 nM, ($p = 0.18$) ..... 133

Figure 5.9 Morphology of AoSMC after 7 days in serum-free medium, actin and nucleus staining. Scale bar: 200 µm ..... 133

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

| | |
|---|---|
| AAA | Anévrisme de l'aorte abdominale |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Akt | Protéine kinase impliquée dans la régulation de l'apoptose |
| ANOVA | Analyse de la variance |
| AoAF | Fibroblastes aortiques (humains) |
| AoSMC | Cellules musculaires lisses aortiques (humaines) |
| APTES | (3-Aminopropyl)triethoxysilane |
| Bax | Protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (*Bcl-2 associated-X protein*) |
| Bcl-2 | Famille regroupant des protéines pro- ou anti-apoptotiques (*B-cell lynphoma 2*) |
| Bcl-xl | Protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma-extra large*) |
| BMP-2 ou 7 | Facteurs de croissance morphogéniques osseux 2 ou 7 (*Bone morphogenic factor 2 or 7*) |
| BSA | Albumine sérique bovine (*bovine serum albumin*) |
| CE | Marquage 'conforme aux exigences' européen |
| CMD | Dextrane carboxyméthylé (*carboxymethyl dextran*) |
| CS | Chondroitine sulfate |
| CT-Scan | Computed tomography scan |
| CMLV | Cellules musculaires lisses vasculaires (*vascular smooth muscle cells*) |
| EC | Endoprothèse couverte (*stent graft*) |
| ECM | Matrice extracellulaire *(extra cellular matrix)* |
| EDC | 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| Ecoil | Étiquette peptidique ayant une forte affinité pour l'étiquette Kcoil |

| | |
|---|---|
| E-EGF | EGF portant une étiquette Ecoil (Ecoil-EGF) |
| E-VEGF | VEGF portant une étiquette Ecoil (Ecoil-VEGF) |
| EGF | Facteur de croissance de l'épiderme (*epidermal growth factor*) |
| EGFR | Récepteur de l'EGF |
| ELISA | Titrage immunoenzymatique utilisant un anticorps adsorbé (*enzyme-linked immunosorbent assay)* |
| EMCH | Hydrazine d'acide N-ε-maleimidocaproïque |
| ERK (1/2) | Kinases régulées par les signaux extracellulaires (*extracellular signal-regulated kinases)* |
| EtOH | Éthanol |
| EVAR | Réparation endovasculaire des anévrismes *(endovascular aneurysm repair)* |
| FDA | *US Food and drug administration* |
| (b)FGF | Facteur de croissance (basique) des fibroblastes (*basic fibroblast growth factor*) |
| GAG | Glycosaminoglycane |
| GF | Facteur de croissance (*growth factor*) |
| Gnd/HCL | Chlorure de guanidium |
| HB-EGF | EGF se liant à l'héparine (*Heparin-binding EGF)* |
| HRP | Peroxydase de raifort (*Horseradish peroxidase*) |
| HT | Colorant Hoescht 33342 |
| HUVEC | Cellules endothéliales extraites d'une veine ombilicale humaine (*Human umbilical vein endothelial cells*) |
| $^{125}I$ | Iode 125, radioisotope de l'iode |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IGF | Facteur de croissance ressemblant à l'insuline (*Insulin-like growth factor*) |

| | |
|---|---|
| JAK/STAT | Enzyme janus kinase / Protéine transductrice de signal et activatrice de la transcription |
| Kcoil | Étiquette peptidique ayant une forte affinité pour l'étiquette Ecoil |
| LP ou L-PPE:N | Polyéthylène polymérisé par plasma basse pression riche en azote (*low-pressure plasma polymerized ethylene rich in nitrogen*) |
| Lys | Résidu lysine |
| MEC | Matrice extracellulaire (*extra cellular matrix*) |
| MES | Acide 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonique |
| MMP | Métallo protéinases de la matrice (*matrix metallo proteinases*) |
| Mw | Masse moléculaire moyenne en poids (*weight average molecular mass)* |
| NHS | *N*-hydroxysuccinimide |
| $NH_2$ | Groupement chimique amine primaire |
| NGF | Facteur de croissance des nerfs (*nerve growth factor*) |
| O.D. | Densité optique (*optical density*) |
| PBS | Tampon phosphate salin (*phosphate buffer saline*) |
| PDGF | Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*) |
| PET | Poly éthylène téréphtalate |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PG | Protéoglycanes |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PS | Polystyrène |
| (e)PTFE | Polytétrafluoroéthylène (expansé) (*expanded polytetrafluoro ethylene*) |
| PVA | Polyvinylamine |
| Ras | Enzyme de la guanosine triphosphate |

| | |
|---|---|
| SEM | Microscopie à balayage électronique (*scanning electronic microscopy*) |
| SG | *Stent graft*, endoprothèse couverte |
| TGF-α ou β | Facteur de croissance transformant α ou β *(transforming growth factor* α or *β)* |
| VEGF | facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor* |
| VEGFR | Récepteurs de VEGF (ex. VEGFR1 ou Flt1, et VEGFR2 ou KDR) |
| VSMC | Cellules musculaires lisses vasculaires (*vascular smooth muscle cells)* |
| WCA | Angle de contact avec l'eau (*water contact angle*) |
| XPS | Spectroscopie à rayons X (*X-ray photoelectron spectroscopy*) |

# INTRODUCTION

Aujourd'hui, à l'échelle mondiale, les maladies cardiovasculaires représentent le premier risque de mortalité (31 % des décès en 2012, (World-Health-Organization 2015)). Parmi ces maladies, on compte entre autre l'athérosclérose, les maladies des artères coronaires, l'hypertension, l'arythmie ou les anévrismes de l'aorte abdominale. Pour traiter ces maladies, les changements de style de vie ne suffisent pas toujours, et les cliniciens doivent souvent faire appel à la médication, à la chirurgie ou à la pose d'implants et de prothèses vasculaires pour soigner, soutenir ou remplacer les tissus malades.

Malgré des avancées technologiques indéniables, l'efficacité des implants utilisés est encore limitée par les biomatériaux synthétiques qui les composent, notamment en raison de leur incapacité à générer une réponse biologique adéquate. En particulier, la guérison tissulaire autour des implants vasculaires reste une problématique de taille, que cela soit autour des endoprothèses couvertes (tuyaux polymériques utilisés pour la réparation endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale), des prothèses vasculaires ou des matrices issues de l'ingénierie tissulaire. Ce manque de guérison peut conduire à des complications et même des ré-interventions qui nuisent à la qualité de vie des patients.

Dans le cas des endoprothèses couvertes, le manque de guérison s'explique non seulement par l'inertie des biomatériaux utilisés, mais aussi par le fait que l'implant est inséré dans un vaisseau malade présentant un milieu pro-apoptotique, c'est-à-dire favorisant la mort des cellules par apoptose, et une déplétion cellulaire marquée. Pour favoriser la guérison tissulaire dans l'anévrisme et l'intégration de l'implant dans le vaisseau, il est essentiel de contrer ces phénomènes.

Les progrès récents des techniques de modifications de surface ont permis d'ouvrir la voie à une nouvelle génération d'implants plus performants, dits non seulement biocompatibles (ne provoquant pas de réaction adverse) mais aussi bioactifs (ayant une action sélective sur les cellules de l'organisme). Par exemple, différentes méthodes d'immobilisation de facteurs de

Rapport-Gratuit.com

croissance ont été développées pour générer des réactions biologiques favorables autour des implants. Bien que prometteuses, ces techniques nécessitent cependant d'être encore améliorées afin de maximiser la bioactivité des revêtements, notamment par l'étude de l'impact des méthodes d'immobilisation et de la sous-couche sur la réaction biologique.

L'objectif général de ce projet est de développer et d'optimiser un revêtement bioactif en tirant parti de techniques innovantes d'immobilisation de facteurs de croissance pour favoriser la guérison autour des endoprothèses couvertes utilisées dans le traitement des anévrismes de l'aorte abdominale. Ce projet de doctorat se trouve donc à la jonction entre plusieurs domaines, appliquant des outils de science des matériaux et de chimie à des applications en biologie et en médecine.

Le chapitre 1 constitue une revue de littérature qui détaille l'état des connaissances quant à la pathophysiologie des anévrismes et la problématique clinique liée à leur traitement. De plus, les solutions étudiées actuellement pour la création de revêtements bioactifs, les molécules biologiques intéressantes pour notre application et les essais menés jusqu'à présent pour pallier le manque de guérison autour des endoprothèses couvertes seront exposées.

Après avoir établi l'état de l'art, les objectifs et les hypothèses du projet seront établis dans le chapitre 2.

Les méthodes utilisées pour atteindre ces objectifs ainsi que les résultats obtenus seront exposés aux chapitres 3, 4 et 5 dans les articles publiés ou soumis au cours de ce doctorat. Le premier article rapporte l'évaluation *in vitro* et *in vivo* d'un revêtement à base de chondroitine sulfate (CS) et de facteur de croissance de l'épiderme (EGF) obtenu par immobilisation covalente. Le second article présente l'intégration d'une méthode d'immobilisation par bioaffinité pour l'EGF permettant l'optimisation de l'efficacité du revêtement, ainsi qu'une étude de la synergie existant entre CS et EGF. Le troisième et dernier article est une ouverture sur les possibilités offertes par le système de capture orientée sur CS, en intégrant un second facteur de croissance, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF),

en plus de l'EGF, pour affiner les propriétés biologiques et possiblement étendre le champ d'application du revêtement à d'autres pathologies. L'annexe I présente des résultats préliminaires concernant l'effet des méthodes de stérilisation sur des revêtements aminés déposés par plasma (L-PPE:N) avant ou après immobilisation de CS.

Une discussion générale de la démarche adoptée, des résultats obtenus et des recommandations pour les étapes futures sera présentée dans le chapitre 6, suivie d'une conclusion générale.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

# CHAPITRE 1

# REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.1 Contexte clinique

### 1.1.1 Structure des artères

Transportant le sang du cœur vers les organes, les artères apportent aux tissus l'oxygène, les nutriments et les hormones essentiels à leur bon fonctionnement. Plus les artères sont proches du cœur, plus leur diamètre est élevé et plus elles sont épaisses. La structure de leurs parois leur confère la résistance mécanique et l'élasticité nécessaires pour supporter le flux sanguin. Au contraire, les capillaires qui s'infiltrent dans les tissus possèdent des parois fines qui permettent les échanges avec les cellules environnantes (Milnor 1990).

La paroi artérielle est composée de trois couches illustrées dans la Figure 1.1 : l'*intima*, la *media* et l'*adventice* dont les rôles respectifs sont présentés ci-dessous, d'après les revues (Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004, Nemeno-Guanzon, Lee et al. 2012).

L'*intima* est la partie située sur la lumière du vaisseau, qui regroupe l'endothélium et la limitante élastique interne. L'endothélium est une monocouche de cellules endothéliales arrangées de façon longitudinale reposant sur une couche de tissu conjonctif appelée membrane basale. Elle forme une membrane semi perméable et thromborésistante contrôlant l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des leukocytes et la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses.

La *media* est la couche la plus épaisse de l'artère. Constituée de couches circonférentielles de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), de fibres de collagène et d'élastine intercalées entre des feuillets d'élastine, elle donne sa résistance mécanique au vaisseau.

L'*adventice*, composée majoritairement de tissu conjonctif riche en collagène et de fibroblastes, relie le vaisseau aux tissus environnants et joue un rôle de médiation dans la réponse immunitaire et le remodelage vasculaire.

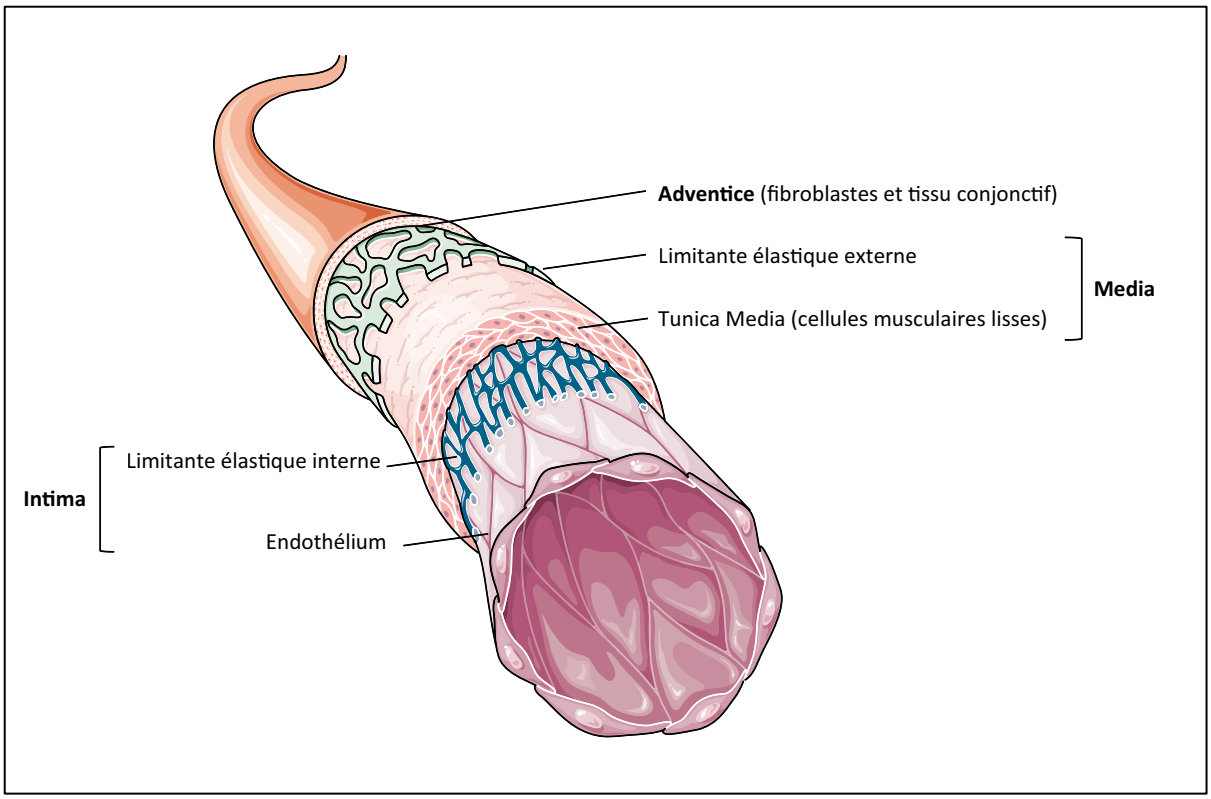



Figure 1.1 Structure de la paroi artérielle
Image tirée de (Servier-Medical-Art 2015)

La matrice extracellulaire (MEC), présente dans l'ensemble des tissus du corps, est un réseau complexe de glycoprotéines, glycosaminoglycanes, protéoglycanes, protéines et enzymes de dégradation. Produit par les cellules mésenchymales (CMLV, péricytes, fibroblastes), ce milieu dynamique est en constant renouvellement. La MEC joue à la fois le rôle de support pour les cellules, de lieu de stockage de facteurs de croissance; elle permet également le maintien de l'hydratation et la filtration des ions (Jacob, Badier-Commander et al. 2001, Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004).

Les principaux composants de la MEC vasculaire, qui confèrent leur caractère viscoélastique aux artères sont le collagène (majoritairement les types I et III), rigide, et l'élastine, extensible (Jacob, Badier-Commander et al. 2001). D'autres composants, tels que la fibronectine, la laminine, la vitronectine ou les glycosaminoglycanes (acides hyaluronique, chondroitine sulfate) sont également présents pour permettre le développement des tissus cellulaires (voir Tableau 1.1) (Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004).

Tableau 1.1 Les principaux composants de la matrice extracellulaire et leur rôle

| *Éléments de la MEC* | *Rôle* | *Exemple* |
|---|---|---|
| Protéines structurales | Support mécanique | Collagène, élastine |
| Protéines adhésives | Favorise l'attachement des cellules | Fibronectine, laminine |
| Glycosaminoglycanes (GAG) | Hautement hydrophiles, permettent le stockage de l'eau dans la MEC | Acide hyaluronique, héparane sulfate, dermatane sulfate, chondroitine sulfate |
| Facteurs de croissances | Signaux cellulaires protéiques induisant par exemple la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire | FGF, EGF, PDGF, VEGF |
| Protéoglycanes (complexes de GAG et protéines) | Stockage des facteurs de croissance | Aggrécan, perlecan, décorine, versican |
| Enzymes protéolytiques | Assurent le maintien de l'équilibre structural du vaisseau | Métallo-protéinases de matrice tels que collagénases, gélatinases |

Au cours du vieillissement ou du développement, la dérégulation de l'expression des molécules de la MEC vasculaire est impliquée dans différentes pathologies telles que l'athérosclérose, l'hypertension ou les anévrismes (Theocharis, Tsolakis et al. 1999, Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004).

### 1.1.2 L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA)

Un anévrisme est une dilatation localisée et irréversible d'un vaisseau menant à une augmentation supérieure à 50% du diamètre normal causée par l'affaiblissement de la paroi. Les anévrismes touchent 4 à 8% des hommes de plus de 65 ans (van Laake, Vainas et al. 2005, Nordon, Hinchliffe et al. 2011), et leur formation résulte de l'action conjuguée de changements moléculaires dans la paroi artérielle et de modifications hémodynamiques dans le vaisseau (Lasheras 2007). Certains facteurs de risques ont été identifiés, tels que le tabagisme, les antécédents familiaux, l'âge (au delà de 65 ans les risques augmentent), le sexe (les hommes ont plus de risques de développer un anévrisme que les femmes), l'hypercholestérolémie, l'hypertension et l'obésité (Vardulaki, Walker et al. 2000, Nordon, Hinchliffe et al. 2011). Même si certains facteurs de risques sont communs aux anévrismes et à l'athérosclérose, la relation entre ces deux pathologies n'est aujourd'hui pas clairement identifiée (Sakalihasan, Limet et al. 2005, Golledge and Norman 2010).

Dans un anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) (Figure 1.2), des altérations du tissu de la paroi aortique sont présentes à la fois au niveau des protéines structurales et au niveau cellulaire. Ces altérations sont basées sur trois principaux mécanismes: i) la présence de cellules inflammatoires, ii) l'apoptose cellulaire et iii) la protéolyse des protéines structurales.

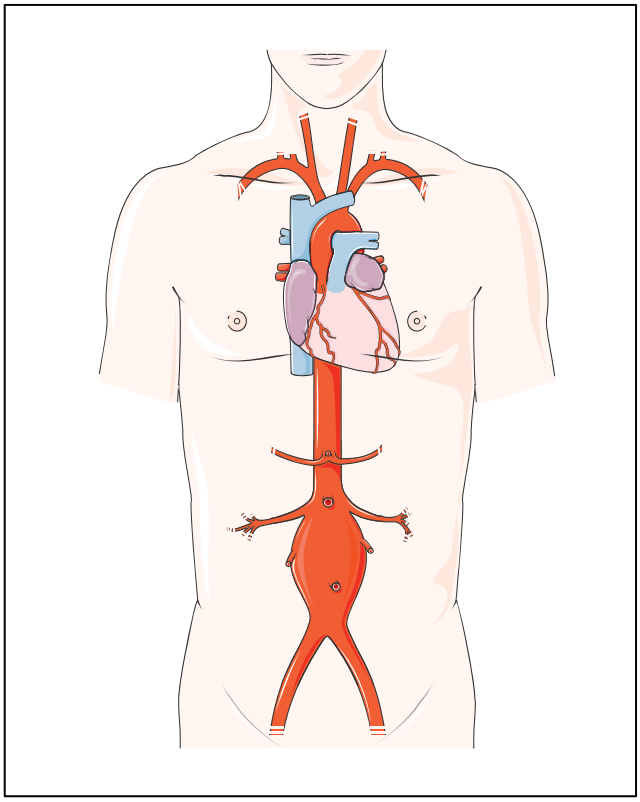


Figure 1.2 Anévrisme de l'aorte abdominale
Figure tirée de (Servier-Medical-Art 2015)

i) La paroi des anévrismes présente une infiltration de cellules inflammatoires, les macrophages et les lymphocytes T et B, qui libèrent des médiateurs cytotoxiques tels que les cytokines, la perforine et le ligand Fas (FasL) qui, à leur tour, peuvent déclencher l'apoptose des CMLV (Henderson, Gang et al. 1999, Choke, Cockerill et al. 2005). La présence de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire semble également jouer un rôle dans le processus de dégradation de la MEC par la production de nombreuses protéases (Ailawadi, Eliason et al. 2003).

ii) Du point de vue cellulaire, la réduction de la densité de cellules musculaires lisses vasculaires de la média va jouer un rôle important dans le développement des AAA car ces cellules ont un double rôle : protection contre l'inflammation et la protéolyse, et entretien de la paroi vasculaire à travers la production d'élastine et de collagène (Sakalihasan, Limet et al. 2005). La déplétion des CMLV de la média s'explique par un taux élevé d'apoptose observé

dans les anévrismes (Henderson, Gang et al. 1999). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui permet l'homéostasie des tissus dans un contexte sain. Elle peut être déclenchée par voie extrinsèque (ex. présence d'agents oxydants ou de cytokines pro-apoptotiques) ou intrinsèque (ex. hypoxie, privation de sérum) (Figure 1.3).

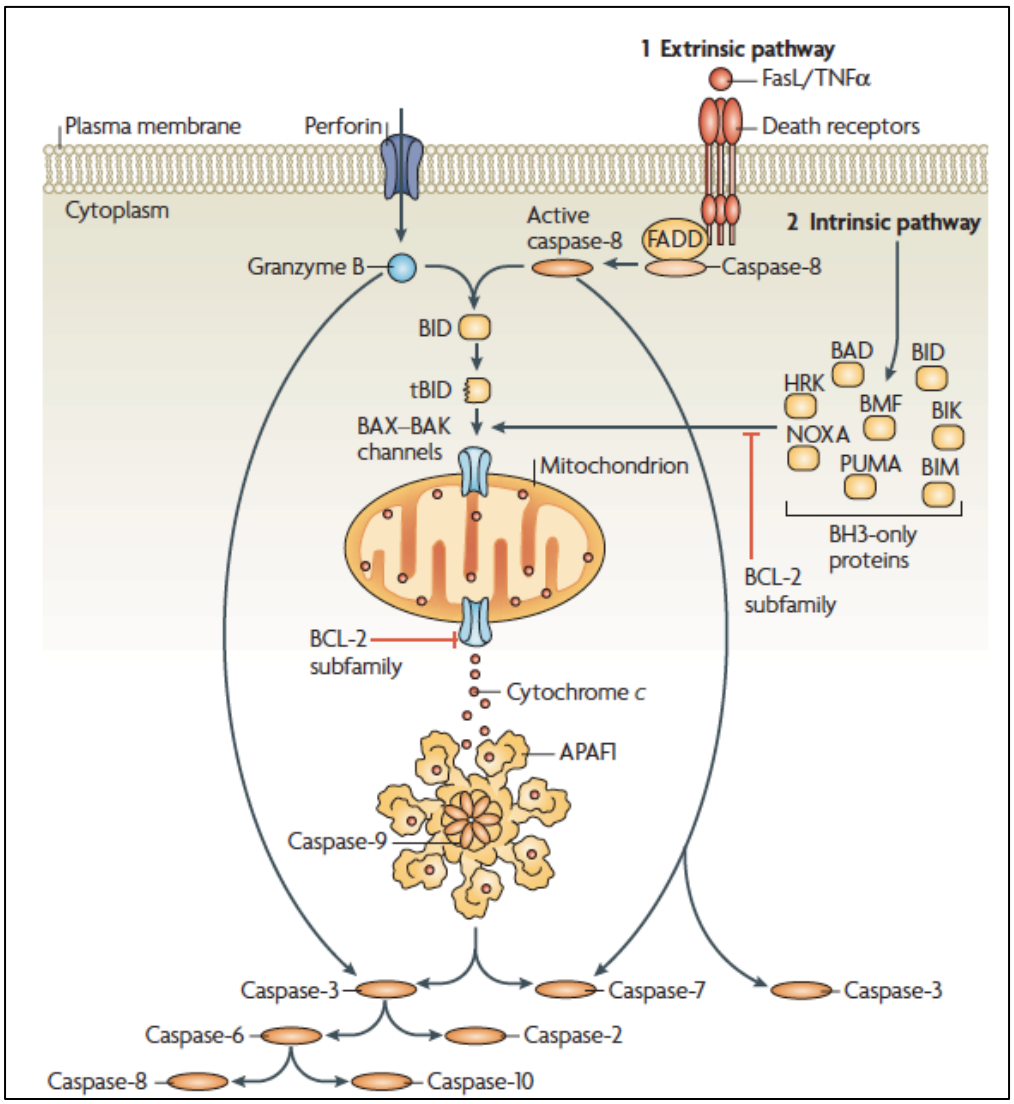



Figure 1.3 Voies de signalisation de l'apoptose menant à l'activation des caspases. Figure tirée de (Taylor, Cullen et al. 2008)

Cependant, lorsque ces stimuli sont présents de façon pathologique, tel que dans le cas des anévrismes, l'apoptose peut entrainer une déplétion cellulaire qui affecte la fonction des

tissus. La mort des cellules par apoptose fait intervenir une cascade d'activation de caspases, en particulier des caspases effectrices, dont le rôle est de cliver des protéines cellulaires importantes (les protéines du cytosquelette par exemple) et de déclencher la fragmentation de l'ADN chromosomique. Plusieurs marqueurs d'apoptose ont été décelés chez les CMLV des anévrismes, en particulier l'activation des caspases, l'augmentation du facteur de transcription p53 et de la protéine pro-apoptotique Bax de la famille des Bcl-2 (Rowe, Stevens et al. 2000, Durdu, Deniz et al. 2012).

iii) Dans un vaisseau sain, les protéines structurales de la paroi artérielle permettent de répartir uniformément les contraintes mécaniques pulsatiles exercées par le sang (Wills, Thompson et al. 1996). Dans le cas d'une aorte anévrismale, on assiste à une fragmentation des fibres d'élastine et de collagène qui s'ajoute à un déficit de GAG d'environ 60 % (Theocharis, Tsolakis et al. 1999, Ailawadi, Eliason et al. 2003). L'importante dégradation des protéines structurales est liée à une activité amplifiée des enzymes protéolytiques aussi appelées métallo-protéinases de matrice (MMP), par exemple les élastases (MMP-2, MMP-9 et MMP-12) et les collagénases (MMP-1, MMP-13). Dans un vaisseau sain, l'action des MMP est contrée par des inhibiteurs afin de maintenir un équilibre entre la fragmentation et la régénération des fibres. Dans le cas d'un AAA, à cause d'un déséquilibre entre ces enzymes et leurs inhibiteurs, le phénomène devient excessif et vient compromettre la résistance mécanique des parois (van Laake, Vainas et al. 2005).

Ces affaiblissements de la paroi aortique conduisent à une perte de l'intégrité mécanique de la paroi du vaisseau et à un élargissement irréversible qui modifie l'écoulement du sang dans l'aorte. La cinétique d'évolution des anévrismes varie beaucoup selon les patients, mais il est fréquent que la pression cyclique et les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin amènent à un élargissement progressif du vaisseau fragilisé (Lasheras 2007, Vorp 2007). Si l'anévrisme n'est pas détecté et pris en charge de façon préventive, il peut rompre soudainement lorsque la paroi du vaisseau ne peut plus résister au flux sanguin pulsatile. Le patient subit alors une hémorragie massive et ses chances de survie deviennent faibles - environ 3% d'après une étude de (Aburahma, Woodruff et al. 1991). Lorsqu'un AAA est

Rapport-Gratuit.com

diagnostiqué chez un patient, un suivi est effectué par imagerie, pour permettre au médecin d'évaluer le risque de rupture et le risque de complications lors d'une intervention en fonction de l'état de santé du patient. Généralement, lorsque le diamètre de l'AAA excède 5 cm ou que l'augmentation dépasse 0.5 cm/an les médecins recommandent une intervention chirurgicale ou endovasculaire, tel que développé dans la prochaine section (Brown, Zelt et al. 2003) .

*Un anévrisme est une dilatation irréversible d'un vaisseau résultant d'une interaction complexe entre des changements biologiques à l'échelle moléculaire et cellulaire, qui diminuent la résistance du vaisseau, et des contraintes biomécaniques exercées par le flux sanguin qui tendent à élargir l'anévrisme et peuvent mener à sa rupture.*

### 1.1.3 Traitements des anévrismes de l'aorte abdominale

#### 1.1.3.1 Réparation endovasculaire (EVAR) vs. chirurgie ouverte

La première procédure qui a été mise en place pour le traitement des anévrismes est la chirurgie ouverte (Figure 1.4). L'opération consiste à faire une incision dans l'abdomen, localiser le col de l'anévrisme et son étendue, clamper l'aorte ainsi que les artères iliaques, ouvrir le sac anévrismal dans la longueur, puis suturer une prothèse vasculaire tissée (tube simple ou bifurcation selon la localisation de l'anévrisme) aux extrémités distale et proximale sur le vaisseau sain. Enfin, le sac anévrismal est refermé autour de l'implant et suturé à son tour (Creech 1966, Schermerhorn 2009). Chez les patients ayant peu de risques de complications cardio-pulmonaires dus à l'anesthésie et l'intervention, le traitement des AAA par chirurgie ouverte reste courant du fait de sa durabilité (seulement 1.7% de ré-interventions durant les 4 années post opératoires) (Schermerhorn 2009).

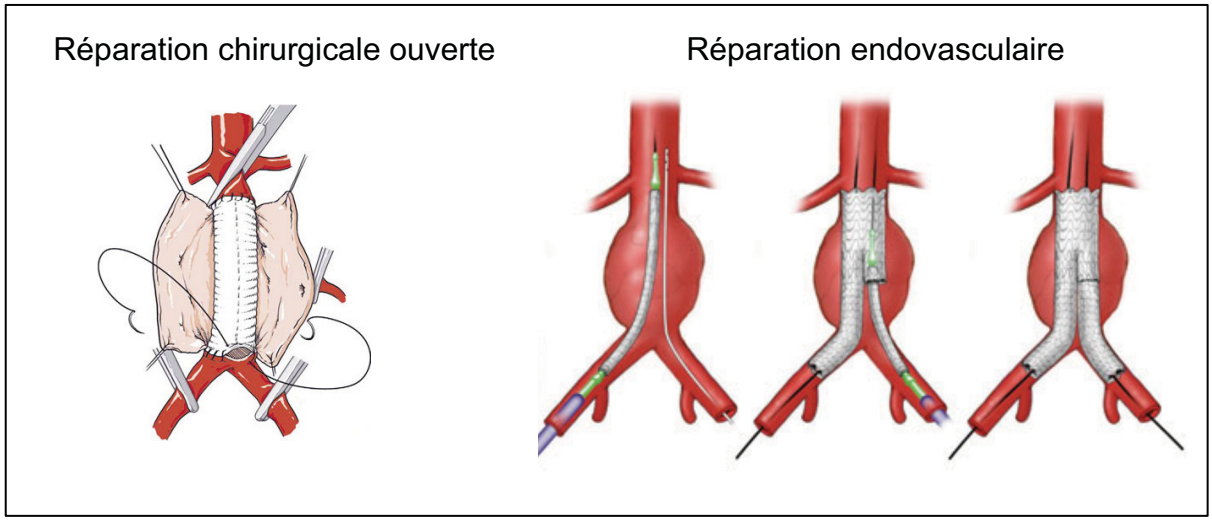



Figure 1.4 Traitement de l'AAA par chirurgie ouverte (à gauche) et réparation endovasculaire (à droite). Figures tirées respectivement de (Azencott 2015) et de (Mayo-Foundation-for-Medical-Education-and-Research 2015)

Cependant, pour permettre de traiter les patients fragiles (âge, pathologies respiratoires ou vasculaires, etc.) pour qui le traitement chirurgical présente des risques élevés en raison des possibles complications péri- et post-opératoires, un traitement endovasculaire des anévrismes (EVAR, pour *endovascular aneurysm repair*) a été développé (Parodi, Palmaz et al. 1991, Volodos 2013). Introduit chez l'humain pour la première fois en 1991 par Parodi, l'EVAR consiste à introduire par voie transfémorale à l'aide de cathéters une endoprothèse couverte (EC, ou *stent graft* en anglais) composée d'une structure extensible en métal recouverte d'une enveloppe en polymère (Figure 1.4) (Parodi, Palmaz et al. 1991). L'EC est déployée dans l'aorte à l'aide d'un cathéter ballon, et dilatée de manière à assurer un contact avec le vaisseau au niveau des collets, ce qui permet d'exclure l'anévrisme de la circulation sanguine (Schermerhorn 2009).

Depuis son approbation en 1999 par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour l'utilisation aux États Unis, les bons résultats obtenus par l'EVAR dans plusieurs études internationales randomisées (faible mortalité périopératoire, convalescence plus courte, traitement de patients fragiles) ont rapidement fait passer cette technique au premier plan (Schermerhorn, Bensley et al. 2012, Buck, van Herwaarden et al. 2014). À titre d'exemple,

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

l'EVAR représentait 77% des traitements d'AAA en 2008 aux États Unis chez les patients couverts par Medicare (Schermerhorn, Bensley et al. 2012).

Cependant, contrairement au traitement chirurgical qui remplace définitivement la portion anévrismale du vaisseau par une prothèse polymérique entrainant peu de ré-opérations, l'EVAR redirige le flux sanguin mais n'élimine pas l'anévrisme. C'est pourquoi les patients traités par EVAR nécessitent un suivi régulier pour s'assurer de la stabilité de l'endoprothèse couverte dans le vaisseau et surveiller l'apparition de complications nécessitant une opération subséquente (Buck, van Herwaarden et al. 2014).

#### 1.1.3.2 Problématiques liées à l'EVAR

*Complications post opératoires*

Une étude datant de 2010 a recensé grâce à un suivi par CT-scan qu'après 5 ans, 41% des anévrismes traités par EVAR continuent de s'élargir après la pose de l'EC : l'EVAR ne constitue donc pas pour l'instant une solution définitive aux AAA (Wyss, Brown et al. 2010). En moyenne, 9 % des patients ayant subi une EVAR nécessitent une intervention secondaire dans les quatre ans qui suivent la procédure (Schermerhorn 2009). La ré-intervention peut aller du placement d'un *stent* supplémentaire (2 à 5 % des patients pour chaque année post-opératoire) à la conversion chirurgicale (1 à 3 % des cas après 4 ans) (Schermerhorn 2009, Moulakakis, Dalainas et al. 2010). Ces interventions secondaires sont dues pour la plupart à des complications telles que les endofuites (10 à 30 % des patients (van Beek, Reimerink et al. 2014, Zhou, Blay et al. 2014)) et la migration de l'endoprothèse couverte (16 % des patients avec endoprothèse couverte à fixation passive (Litwinski, Donayre et al. 2006)) ou encore une thrombose à l'intérieur de l'implant. Différents types d'endofuites ont été identifiés (Figure 1.5). D'après une revue récente de Sidloff et collègues, les endofuites de types II, dues à un apport de sang par des artères collatérales, sont les plus fréquentes mais ont le plus souvent une évolution lente et entrainent de faibles risques de rupture (< 1%) donc ne nécessitent pas de traitement immédiat mais plutôt un surveillance régulière (Sidloff,

Stather et al. 2013, Green, Sidloff et al. 2014). En revanche, les fuites de type I, dues à une mauvaise apposition de l'EC au collet proximal et/ou au collet distal, entrainent de hauts risques de rupture car elles créent un accès direct au flux sanguin de l'aorte vers le sac anévrismal, et nécessitent souvent des ré-interventions immédiates (Buth, Harris et al. 2003).

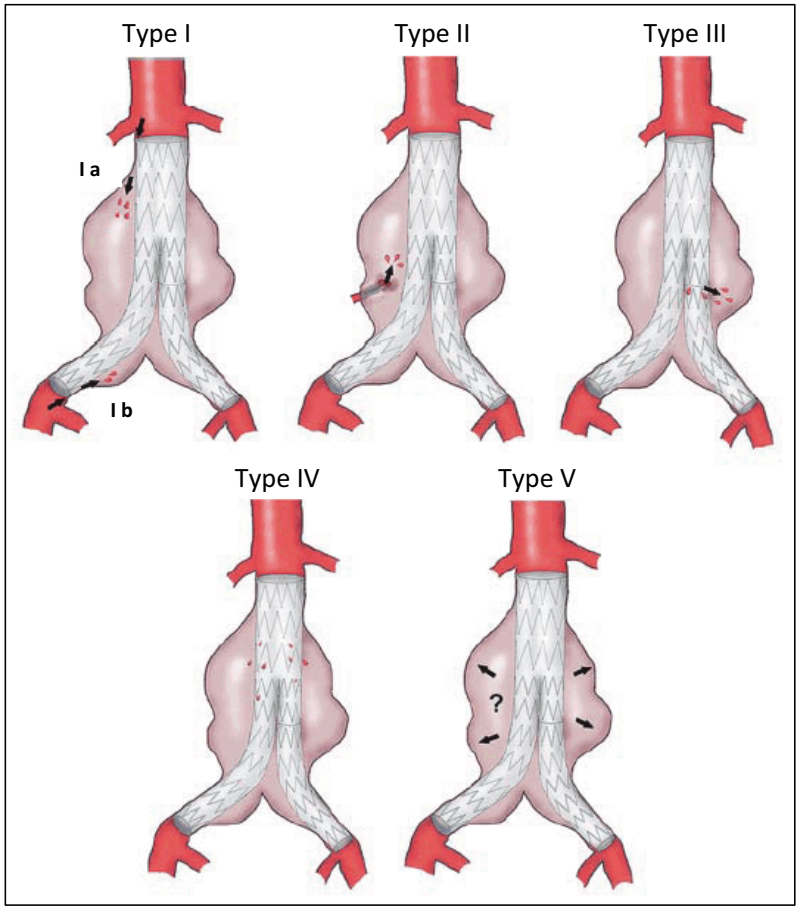



Figure 1.5 Les différents types d'endofuites après EVAR
Figure adaptée de (Greiner, Grommes et al. 2013)

*Les causes: défaillances mécaniques et manque de guérison*

Ces complications peuvent être liées à des facteurs mécaniques (mauvaise implantation, défaillance des matériaux de l'EC menant à l'apparition de fuites de type III (Jones, Vallabhaneni et al. 2014), utilisation chez des patients aux artères étroites et tortueuses

(Hobo, Buth et al. 2006), etc.), mais également à un manque de guérison et une mauvaise incorporation de l'EC dans le vaisseau. En effet, d'après l'analyse de prothèses explantées, la formation de tissu cellularisé est insuffisante. À la place, il se forme à la surface de l'implant et dans la cavité anévrismale un thrombus riche en fibrine généralement dépourvu de CMLV, de fibroblastes et de collagène, qui contient des cellules immunitaires géantes et des macrophages, ce qui indique une réaction immunitaire due à la présence d'un corps étranger (*foreign body reaction*) (McArthur, Teodorescu et al. 2001, Xue and Greisler 2003, Major, Guidoin et al. 2006). Hormis la section métallique proximale de l'EC (*bare stent*) qui s'attache au vaisseau par des crochets (Figure 1.6), l'implant est uniquement apposé au vaisseau et n'est pas incorporé aux tissus vasculaires. Dans les cas où l'implant n'est pas apposé parfaitement au collet, par exemple à cause de la tortuosité du vaisseau, de thrombus intraluminal ou de la progression de l'anévrisme au cours du temps, un manque d'étanchéité peut apparaitre au collet (fuites de type I, Figure 1.5), nécessitant une intervention secondaire pour prévenir les risques de rupture.

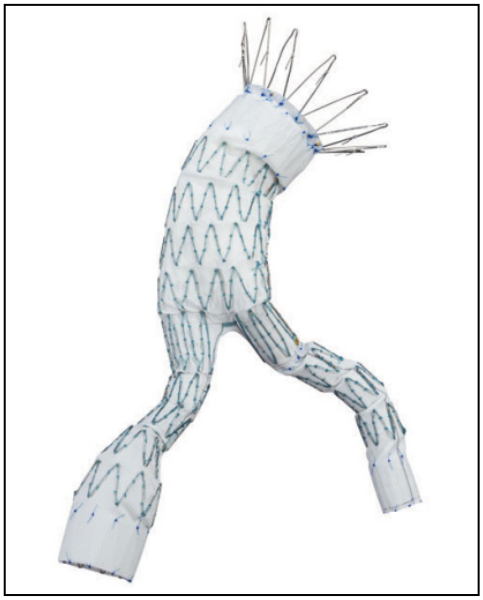


Figure 1.6 Endoprothèse couverte.
Image tirée de (Cook 2015)

Le manque de colonisation cellulaire à la surface de l'implant peut s'expliquer par trois facteurs majeurs. Tout d'abord, la pathologie du vaisseau anévrismal (déficit de CMLV, dégradation de la MEC, inflammation), qui peut continuer d'évoluer en dépit de la présence de l'EC et s'étendre au niveau des collets sains. Ceci conduit à une mauvaise fixation de l'EC au vaisseau et potentiellement à des endofuites ou une migration de l'EC. Deuxièmement, la présence de l'EC isole la paroi de l'anévrisme du flux sanguin et diminue donc l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules vasculaires, ce qui peut accentuer l'apoptose des CMLV présente dans les anévrismes. Enfin, tel qu'il sera présenté dans la section suivante, les matériaux des EC utilisées actuellement ne possèdent pas d'action biologique spécifique qui permettrait de contrer la déplétion des CMLV par apoptose, et d'encourager la prolifération des CMLV et des fibroblastes, deux types cellulaires cruciaux pour la guérison et la production de MEC nécessaires à la fixation de l'EC.

*D'une façon générale, les complications liées à l'EVAR sont dues à une mauvaise apposition de l'implant dans le vaisseau, à des défaillances mécaniques et/ou à la guérison déficiente autour des EC. Cette dernière se traduit par un attachement défaillant entre l'implant et la paroi aortique : d'après les observations des endoprothèses couvertes explantées, il n'y a pas ou peu de formation de tissu cellulaire organisé comportant des fibroblastes et des cellules musculaires lisses à la surface des implants actuels.*

### 1.1.4 Les biomatériaux utilisés actuellement pour les EC

Les biomatériaux actuellement utilisés pour la couverture des endoprothèses sont les mêmes que ceux utilisés pour les prothèses vasculaires classiques, c'est à dire le polyéthylène téréphtalate tissé (PET ou Dacron®) et le poly(tétrafluoroéthylène) expansé (ePTFE, Gore-tex) (Xue and Greisler 2003, Desai, Eaton-Evans et al. 2010).

Le PET est un polymère aromatique de la famille des polyesters (Figure 1.7) issu de la polycondensation d'acide téréphtalique et d'éthylène glycol qui peut être tissé (*woven*) ou

tricoté (*knitted*). Il est utilisé depuis la fin des années 1950 pour la fabrication d'implants et de prothèses vasculaires (Xue and Greisler 2003).

Le ePTFE est un fluoropolymère chimiquement inerte (Figure 1.7) utilisé depuis les années 1960 dans le domaine médical, entre autres pour la fabrication de valves cardiaques et d'implants vasculaires. La présence de fluor, hautement électronégatif, minimise les interactions avec les composants du sang majoritairement chargés négativement (Xue and Greisler 2003).

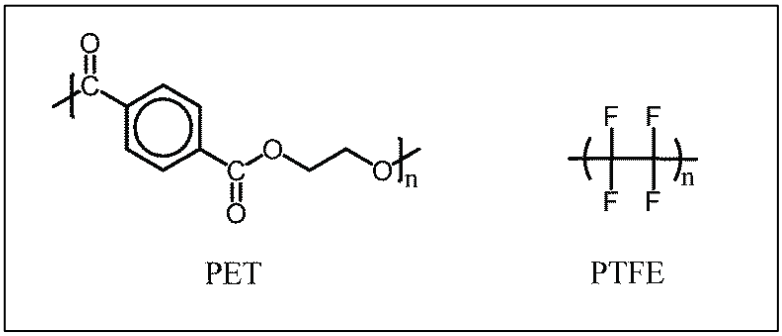



Figure 1.7 Structures chimiques du PET et du PTFE
Figure adaptée de (Ren, Feng et al. 2015)

Le PET et le PTFE sont des polymères hydrophobes hautement cristallins, ce qui prévient leur hydrolyse dans les conditions physiologiques et leur confère une durabilité appropriée aux applications biomédicales (Xue and Greisler 2003). Ces matériaux ont été sélectionnés car il est facile de les mettre en forme et d'ajuster leur porosité, ainsi que pour leurs propriétés mécaniques et leur bonne hémocompatibilité (Santos, Rodrigues et al. 2012). Cependant, ces matériaux ne promeuvent pas les interactions cellule/surface spécifiques nécessaires à l'adhésion, la migration et la survie cellulaire (Marois, Sigot-Luizart et al. 1999, Lerouge, Major et al. 2007, Gigout, Ruiz et al. 2011). Ce manque d'interactions se traduit *in vivo* par une absence de tissu cellulaire organisé à la surface de l'implant ainsi que par la formation d'un amas riche en fibrine et en cellules inflammatoires.

L'absence de colonisation cellulaire s'explique en partie par leur hydrophobicité qui limite l'adsorption de protéines adhésives de la MEC et tend à dénaturer celles qui sont adsorbées, en particulier dans le cas du PTFE. En l'absence d'interactions cellules/MEC, les cellules ne reçoivent pas les signaux dont elles ont besoin pour adhérer et survivre, ce qui déclenche un mécanisme de mort cellulaire appelé anoïkis (Michel 2003).

*Les propriétés de surfaces des polymères utilisés pour les EC, associées au contexte pro-apoptotique du vaisseau anévrismal constituent la base du manque de guérison et du manque d'étanchéité observés entre la paroi aortique et l'endoprothèse couverte.*

### 1.1.5 Innovations industrielles

Les nouvelles générations d'endoprothèses couvertes mises sur le marché par les fabricants misent principalement sur l'amélioration du design pour une meilleure fixation mécanique au niveau du col de l'anévrisme et une plus grande adaptabilité à l'anatomie du patient, ainsi que la réduction du profil afin d'étendre leur utilisation aux artères tortueuses (Bersin 2011, Arko, Nussbaum et al. 2012). Quelques exemples d'innovations récemment approuvées pour utilisation aux États Unis (FDA) ou en Europe (marquage CE) sont présentés dans le Tableau 1.2.

Les endoprothèses développées par Trivascular et Endologix (Figure 1.8) en particulier, visent à adapter la structure de l'EC à la morphologie du vaisseau à traiter. Ces deux prothèses possèdent en effet des parties qui sont remplies de polymère après implantation pour combler l'espace entre le vaisseau et l'EC, ce qui permet d'obtenir un scellé étanche et d'éviter les endofuites (en particulier de type I) lors de l'implantation.

Cependant, la couverture de ces deux produits (y compris l'enveloppe des parties qui sont remplies de PEG) qui est en contact avec les tissus du vaisseau est réalisée en PTFE, un matériau hautement hydrophobe qui ne permet pas la colonisation cellulaire et ne promeut pas la guérison, tel que décrit plus haut. Les problématiques observées avec les EC classiques

risquent donc d'apparaitre à long terme avec ces nouvelles prothèses, puisque l'ajustement de la structure qui est réalisé lors de l'implantation en remplissant avec du polymère ne favorise pas d'attachement biologique. Ainsi, si la pathologie s'étend aux collets ou que l'anévrisme continue de se dilater, des fuites pourront apparaitre puisque la structure de ces EC ne s'adapte pas à la morphologie de l'anévrisme au cours du temps : une fois l'implantation terminée elle ne peut être ajustée à nouveau.

Tableau 1.2 Dispositifs commercialisés pour améliorer la fixation des EC
Données tirées de (Melas, Perdikides et al. 2012, Buck, van Herwaarden et al. 2014, De Donato, Setacci et al. 2014)

| *Approbation* | *Compagnie* | *Dispositif* | *But* |
|---|---|---|---|
| 2011 (FDA, CE) | Aptus EndoSystems | HeliFX EndoStaple : Agrafes métalliques hélicoïdales pour endoprothèse | Fixer l'EC au vaisseau |
| 2012 (FDA) | Cook | Zenith: Endoprothèse couverte multibranche ou 'fenestrée' | Étendre l'utilisation de l'EVAR aux AAA suprarénaux et éviter la migration |
| 2012 (FDA) | Trivascular | Ovation Prime: Endoprothèse couverte avec des anneaux de ePTFE dans lequels un polymère (polyéthylène glycol, PEG) est injecté après déploiement<br>Figure 1.8 a | Améliorer la fixation et éviter les endofuites aux collets |
| 2013 (CE) | Endologix | Système Nellix: Endoprothèse couverte incluse dans sac de ePTFE qui est rempli de polymère (polyéthylène glycol, PEG) après déploiement<br>Figure 1.8 b | Améliorer la fixation et éviter les endofuites en comblant la cavité anévrismale |

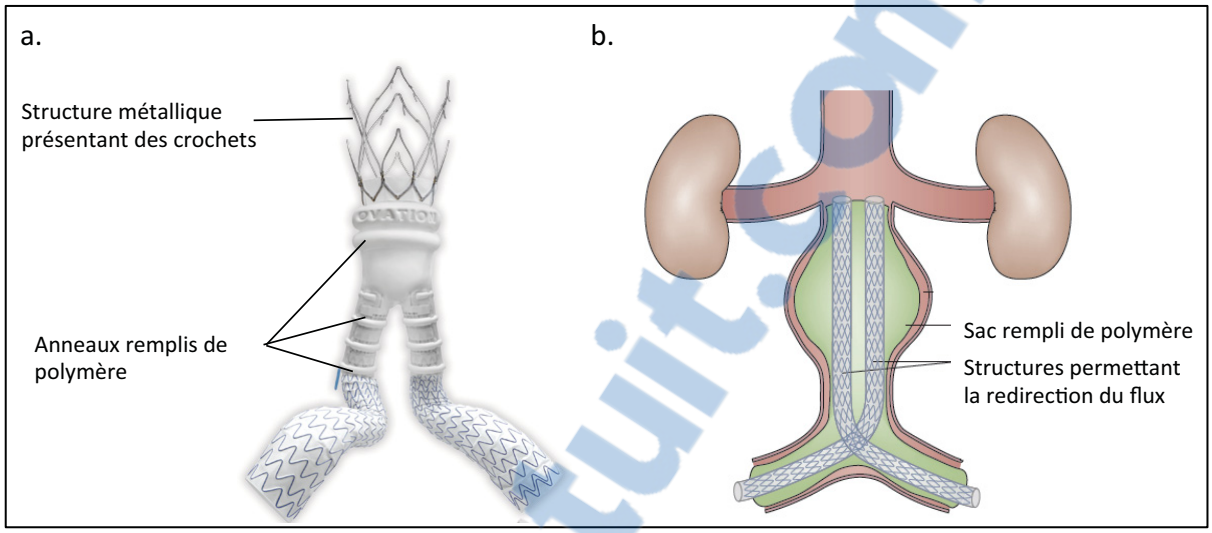



Figure 1.8 Exemples d'endoprothèses récemment approuvées
a. Endoprothèse couverte Ovation Prime de la compagnie Trivascular
b. Schéma de principe du système Nellix de la compagnie Endologix
Figures tirées respectivement de (Trivascular 2015) et (Buck, van Herwaarden et al. 2014)

*Actuellement, les seules approches proposées par l'industrie pour favoriser une meilleure fixation et l'étanchéité au niveau des collets consistent à modifier la forme de l'endoprothèse et/ou à ajouter des éléments remplis de polymère pour s'adapter à l'anatomie du patient. Aucun traitement bioactif permettant une guérison tissulaire n'est pour l'instant disponible.*

### 1.1.6 Conclusion et stratégie à la base du projet

Après analyse du contexte clinique actuel, il apparait que l'EVAR est une avancée technologique très prometteuse qui permet de traiter les anévrismes de l'aorte abdominale de manière peu invasive. Cependant, cette technique reste controversée à cause de fréquentes complications à moyen et long termes, telles que les endofuites et la migration de l'implant. Ces complications semblent au moins en partie liées au manque de guérison tissulaire autour des EC qui mène à une fixation et un scellé imparfait au niveau des collets et permet la progression de la pathologie. L'amélioration de la guérison autour des endoprothèses

Rapport-Gratuit.com

couvertes est une problématique qui n'a pas encore été résolue et qui représenterait pourtant un argument majeur pour le maintien et la généralisation de l'EVAR.

L'une des stratégies pour y parvenir serait de modifier les propriétés de surface des matériaux utilisés pour la couverture de l'endoprothèse car ceux-ci, actuellement très hydrophobes, ne permettent pas la colonisation cellulaire et la lutte contre le phénotype pro-apoptotique des CMLV de l'anévrisme. Pour cela, il est utile de comprendre quelles sont les interactions qui ont lieu entre la surface de l'EC et les tissus après implantation dans l'anévrisme ainsi que les mécanismes de guérison vasculaires en général. Ces connaissances seront nécessaires pour concevoir un revêtement qui induit une réponse cellulaire spécifique afin de contrer le contexte pathologique des AAA.

*Pour améliorer l'efficacité à long terme de l'EVAR, notre stratégie est de modifier les propriétés de surface de la paroi externe des endoprothèses couvertes de façon à renforcer l'attachement de l'implant dans les tissus et favoriser la guérison de l'anévrisme, tout en conservant les propriétés mécaniques du matériau.*

## 1.2 Interactions biologiques avec les matériaux

Pour mieux comprendre quelles modifications doivent être apportées à la surface des EC pour générer une guérison adéquate, il est important de rappeler les différents phénomènes qui régissent les interactions entre un matériau implanté et l'organisme.

### 1.2.1 Interactions biomatériau/protéines

Lorsqu'un matériau est mis en contact avec un milieu biologique, des interactions dynamiques entre les protéines du milieu et la surface vont avoir lieu. Dans le cas d'un implant vasculaire, le matériau entre en contact immédiat avec le plasma sanguin, composé majoritairement d'eau et d'une large variété de protéines (albumine, protéine du complément,

fibrinogène, immunoglobulines, fibronectine, etc.) qui vont s'adsorber sur la surface du matériau (Ratner, Hoffman et al. 2004, Schmidt, Waldeck et al. 2009). L'effet Vroman décrit l'adsorption séquentielle des protéines solubles qui a lieu lorsqu'un matériau est mis en contact avec le sang : les petites protéines présentes à une concentration élevée dans le milieu sont généralement les premières à s'adsorber, puis celles-ci sont peu à peu remplacées par d'autres protéines ayant une plus forte affinité pour le substrat (Vroman and Adams 1969, Vroman, Adams et al. 1977, Brash 1996, Schmidt, Waldeck et al. 2009).

La nature, la quantité et la conformation des protéines adsorbées dépendent à la fois des propriétés des protéines présentes (concentration, hydrophobicité, taille, charge, rigidité, stabilité) et des propriétés de surface du matériau (énergie de surface, charge, topographie, composition chimique) (Schmidt, Waldeck et al. 2009). L'adsorption se fait par une combinaison d'interactions hydrophobes (agrégation de groupements ou molécules apolaires pour minimiser leurs contacts avec l'eau), de liaisons ioniques (dues à l'attraction entre des ions de charges opposées) ou de liaisons électrostatiques faibles de type interaction de Van der Waals (interaction entre les dipôles électriques de deux molécules) (Schmidt, Waldeck et al. 2009); elle peut engendrer une dénaturation des protéines qui empêche leur reconnaissance par les cellules. La nature et la conformation des protéines adsorbées va ensuite déterminer l'hémocompatibilité et la thrombogénicité de la surface (ex. adsorption de fibrinogène, recrutement de plaquettes, dépôt de fibrine, formation de thrombus), la réponse immunitaire (ex. adsorption de protéines du complément, activation de la cascade du complément, recrutement de cellules immunitaires) ainsi que la colonisation par les cellules (ex. adsorption de fibronectine ou de vitronectine, création d'un réseau de MEC pour accueillir les cellules), tel que détaillé dans la section suivante (Schmidt, Waldeck et al. 2009).

Dans le cas de matériaux hydrophobes, les protéines du plasma possédant des domaines hydrophobes viennent s'adsorber, le plus souvent de façon irréversible, pour former un film qui fera l'intermédiaire entre le substrat et le sang (Vroman and Adams 1969, Vroman, Adams et al. 1977, Brash 1996). En particulier, il a été montré que les matériaux

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

hydrophobes favorisent l'adsorption de l'albumine par rapport à l'adsorption de la fibronectine, un protéine qui permet l'adhésion cellulaire (Grainger, Pavon-Djavid et al. 2003). De plus, les interactions hydrophobes qui se forment peuvent dénaturer les protéines adsorbées, ce qui conduirait à une perte de structure et de fonction de ces protéines (Vermeer, Giacomelli et al. 2001, Gray 2004). Ces différents éléments sont cohérents avec la mauvaise colonisation cellulaire observée sur les EC en PET et ePTFE.

### 1.2.2 Interactions cellules/ surface

Afin de détecter les signaux présents dans leur microenvironnement, les cellules possèdent des récepteurs membranaires tels que les intégrines, les syndécanes, les récepteurs de facteurs de croissance ou les cadhérines. Ces récepteurs se lient à des ligands spécifiques (Figure 1.9) qui peuvent être présents dans les liquides physiologiques sous forme soluble (ex. hormones, interleukines, certains facteurs de croissance) ou présents dans le tissu conjonctif (ex. molécules de la MEC telles que collagène, laminine, fibronectine). Ainsi, le couplage d'un récepteur avec son ligand déclenche une cascade de réactions biochimiques menant à l'expression de gènes qui permettent de modifier le comportement cellulaire (prolifération, différenciation, survie, etc.) (Schlessinger 2000, Lutolf and Hubbell 2005).

Dans le cas d'un biomatériau, la nature de la surface va déterminer le type de protéines adsorbées, donc l'environnement avec lequel vont interagir les cellules. En effet, lorsque le matériau favorise l'adsorption de protéines adhésives (fibronectine, vitronectine) à partir du plasma, la surface est reconnue par le biais des intégrines des cellules et l'adhésion cellulaire peut avoir lieu (Schmidt, Waldeck et al. 2009). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui servent de médiateurs à la fois pour les interactions cellules-cellules et cellules-substrat. Ces protéines sont constituées de deux sous-unités, α et β, et reconnaissent spécifiquement certains ligands, le plus souvent composés de motifs peptidiques présents dans les molécules de la MEC telles que la fibronectine, la laminine ou la vitronectine (Hynes 1987, Albelda and Buck 1990, Humphries, Byron et al. 2006). Une fois les intégrines couplées avec leur ligand, un changement de conformation a lieu dans leur

domaine cytoplasmique, ce qui expose des sites de fixation pour des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire telles que les MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*)(Yamada and Miyamoto 1995, Bokel and Brown 2002). L'aggrégation de plusieurs intégrines hétérodimériques couplées avec leur ligand conduit, selon la nature des intégrines, à l'accumulation locale de protéines du cytosquelette, de kinases ou de signaux de transduction, permettant par exemple d'activer les voies de signalisation ERK, Ras, JNK ou de créer des points d'adhésion focale (Yamada and Miyamoto 1995).

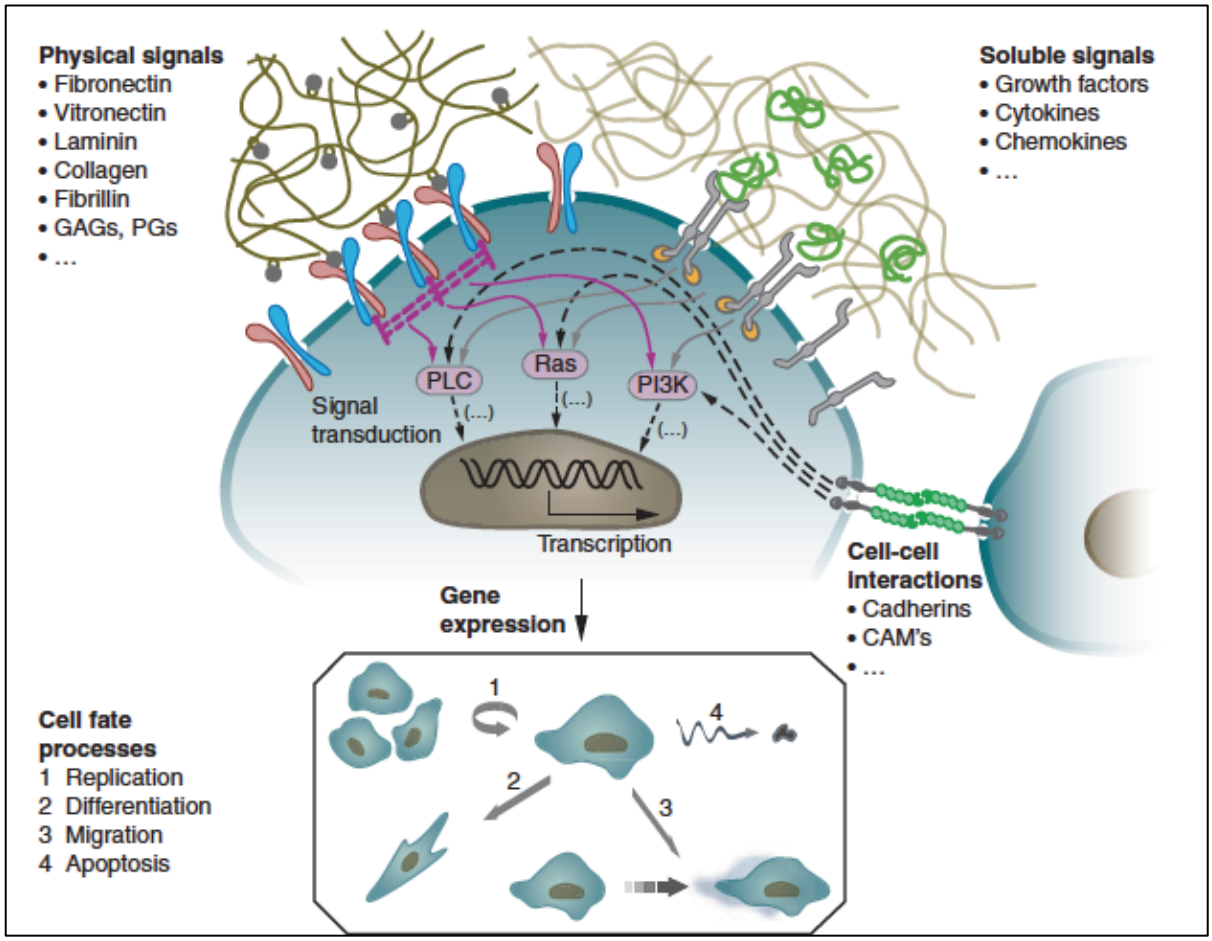



Figure 1.9 Régulation du comportement cellulaire par le microenvironnement
Figure tirée de (Lutolf and Hubbell 2005)

Pour améliorer l'efficacité d'un implant, il est possible de diriger la réponse biologique en modifiant l'adsorption des protéines et/ou en immobilisant sur sa surface des biomolécules

choisies qui seront reconnues par les récepteurs cellulaires (intégrines, récepteurs de facteurs de croissance, etc.).

L'immobilisation de molécules de la MEC ou de facteurs de croissance représente une piste prometteuse pour la conception d'un revêtement favorisant une réponse cellulaire ciblée, dans notre cas la survie des cellules vasculaires. Les molécules d'intérêt pour notre projet, détaillées dans la section 1.4, comprennent en particulier des facteurs de croissance favorisant la guérison. Pour mieux comprendre le mode d'action d'un revêtement incluant ces protéines, il est essentiel de connaitre les mécanismes cellulaires impliqués dans la reconnaissance du facteur de croissance par son récepteur.

Les récepteurs de facteurs de croissance sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, composés de trois domaines: un domaine extracellulaire qui reconnait le ligand soluble (facteur de croissance, tel que EGF, VEGF, FGF, PDGF, etc..), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui transmet le signal biologique aux protéines cibles intracellulaires (Schlessinger and Ullrich 1992). Pour être activés, ces récepteurs dimérisent (ou multimérisent) en présence de leurs ligands, ce qui conduit à une trans-phosphorylation de leur domaine cytoplasmique et à l'activation des voies de signalisation intracellulaires spécifiques (Figure 1.10). On notera que certains récepteurs reconnaissent plusieurs facteurs de croissance (par exemple, le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme, EGFR, reconnait à la fois EGF, HB-EGF, TGF-α, l'épiréguline, l'amphiréguline, etc.), et que certains facteurs de croissance activent plusieurs récepteurs (le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF est un ligand pour VEGFR1- ou Flt-1-, et VEGFR2- ou KDR). Cela implique que plusieurs facteurs de croissance peuvent avoir un même effet biologique par l'activation d'un même récepteur, et également qu'un même facteur de croissance peut être impliqué dans plusieurs effets biologiques (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008). L'activation de ces récepteurs par les facteurs de croissance permet entre autres de réguler l'angiogénèse (exemple: VEGF), la guérison (exemple: EGF), la migration cellulaire (exemple: facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF) (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008).

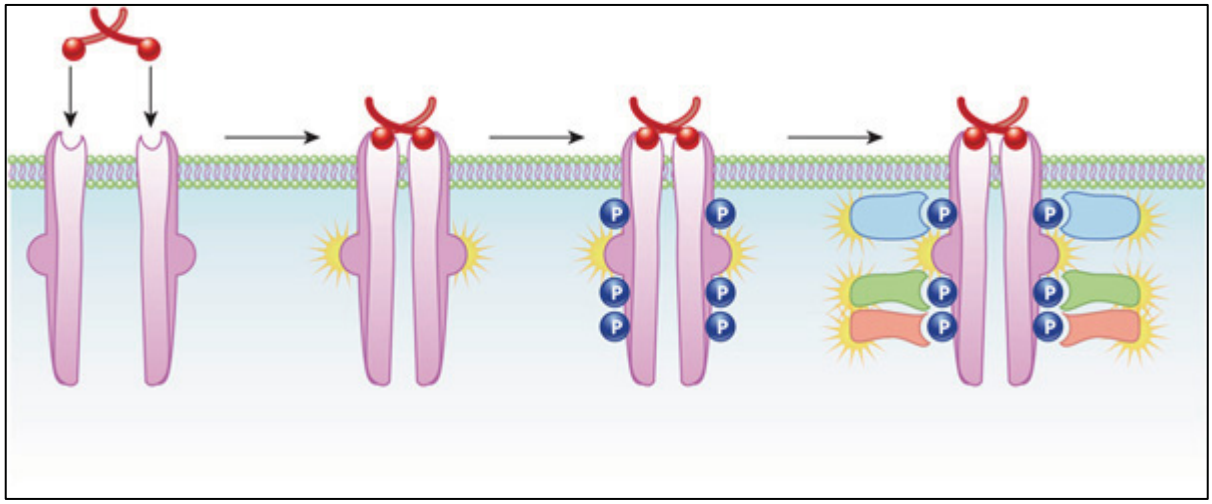



Figure 1.10 Modèle de dimérisation des récepteurs tyrosines kinases
Figure tirée de (NatureEducation 2010)

### 1.2.3 Réaction immunitaire et guérison

Suite à l'implantation d'un dispositif médical, le mécanisme naturel de guérison se déclenche, faisant intervenir le système immunitaire de l'hôte. Cette réaction immunitaire se déroule en plusieurs étapes illustrées dans la Figure 1.11.

La guérison autour d'un implant, lorsqu'elle a lieu, se déroule en plusieurs étapes dont l'ampleur et la durée dépendent de la nature du biomatériau implanté ainsi que du système immunitaire de l'hôte. Tout d'abord, tel que présenté plus haut, des protéines s'adsorbent et un thrombus se forme sur la surface de l'implant. L'accumulation de fibrine, de plaquettes et de facteur de croissance par le contact avec le sang provoque une activation de la réponse immunitaire et des cascades de coagulation - en particulier le système du complément - c'est la période d'inflammation aigue. Par la suite, l'inflammation devient chronique. Les cellules en contact avec l'implant vont produire des facteurs chimiques pour coordonner la réponse inflammatoire. Des macrophages, des monocytes et des lymphocytes se concentrent sur le site d'implantation et un tissu de granulation riche en capillaires se forme autour de l'implant.

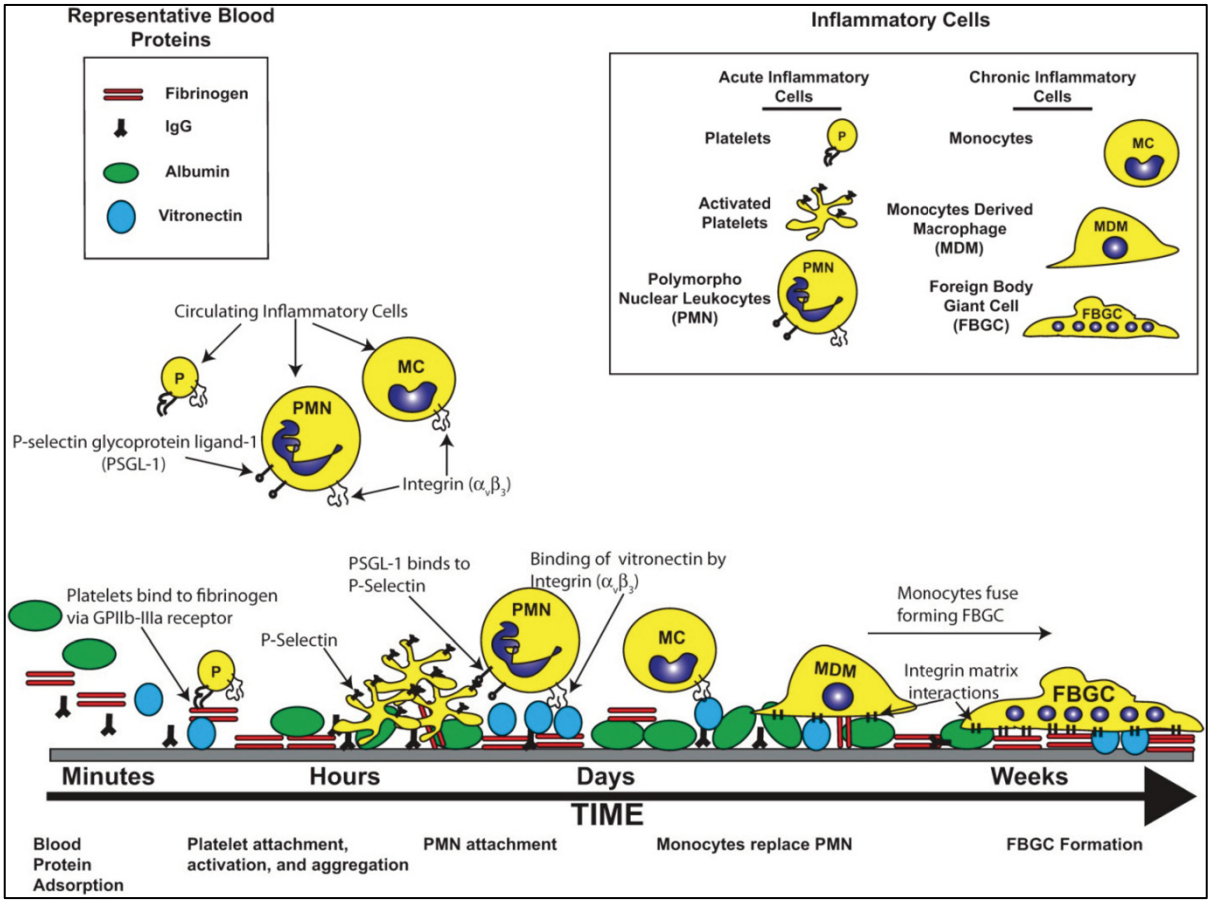



Figure 1.11 La réponse inflammatoire de l'hôte après implantation d'un biomatériau
Figure tirée de (Slee, Christian et al. 2014)

Une réaction au corps étranger se déclenche grâce, entre autres, aux neutrophiles et aux macrophages. Ces cellules secrètent des facteurs chimiotactiques qui attirent les fibroblastes sur le site. Ainsi, la plupart du temps, l'organisme développe une capsule fibreuse autour de l'implant et les tissus environnants redeviennent progressivement sains et dépourvus d'inflammation.

Dans le cas des EC, la guérison complète avec formation de tissu sain (non inflammatoire) ne se produit pas. Au contraire, on constate la présence de cellules inflammatoires et la présence de thrombus non organisé dans la cavité, même plusieurs années après l'implantation (McArthur, Teodorescu et al. 2001, Major, Guidoin et al. 2006). Tel qu'abordé dans la section 1.1, ce manque de guérison peut s'expliquer à la fois par la pathologie du vaisseau

anévrismal (déficience de cellules, milieu pro-apoptotique) et par la nature des biomatériaux utilisés pour les EC (hydrophobes, ne favorisant pas l'adhésion cellulaire).

Pour apporter à l'EC des propriétés favorisant la guérison dans la cavité anévrismale, il est nécessaire de créer des interactions spécifiques qui vont permettre, entre autres, de lutter contre l'environnement pro-apoptotique par la promotion de l'adhésion et la survie des cellules vasculaires ainsi que la production de MEC pour sceller l'implant à la paroi du vaisseau. En particulier, la présence de fibroblastes et de CMLV dans la cavité pourrait permettre une contraction de l'anévrisme autour de l'EC et ainsi l'élimination des risques de complications dues au mauvais attachement de l'EC dans le vaisseau (endofuite, migration). L'obtention de ces nouvelles propriétés biologiques pourrait se faire par la création d'un revêtement sur la surface externe de l'endoprothèse couverte.

*Le matériau utilisé pour l'EC et ses propriétés de surface (charge, énergie de surface, composition chimique, topographie) influencent l'adsorption de protéines et déterminent ainsi la réaction biologique qui sera déclenchée après implantation.*

## 1.3 Modification de surface des biomatériaux vasculaires

La création d'implants vasculaires efficaces implique des propriétés de volume et de surface très spécifiques. Tel que détaillé précédemment, les matériaux utilisés couramment pour les implants vasculaires, tels que le PET et le PTFE, possèdent des propriétés mécaniques adaptées mais leurs propriétés de surface sont inadéquates aux besoins cliniques. L'une des approches les plus communes pour améliorer l'intégration des implants est de préparer la structure de l'implant avec un (des) matériau(x) qui possède(nt) les propriétés de volume attendues (élasticité, résistance mécanique, porosité, ...), puis de traiter la surface pour obtenir les propriétés physicochimiques et biologiques nécessaires pour remplir le rôle biologiques de l'implant dans l'organisme (Chu, Chen et al. 2002, Kapadia, Popowich et al. 2008).

### 1.3.1 Modifications physicochimiques

Les modifications physicochimiques des surfaces peuvent être utilisées (i) seules pour adapter les paramètres de surface du matériau de l'implant à l'application ou (ii) pour créer des groupements réactifs nécessaires à l'immobilisation de biomolécules (Goddard and Hotchkiss 2007).

Parmi les différentes méthodes de modification de surface existantes pour les polymères, nous détaillerons celles qui sont les plus pertinentes à notre application, c'est-à-dire les traitements par plasma et les traitements par voie humide.

#### 1.3.1.1 Modification de surface par plasma

L'utilisation de plasmas pour modifier la surface de biomatériaux est très répandue, comme en témoignent les revues spécialisées dans la modification de surface des polymères pour applications biomédicales (Ratner 1993, Favia and d'Agostino 1998, Chu, Chen et al. 2002, Desmet, Morent et al. 2009).

Les procédés plasma, et plasma basse pression en particulier, ont pour avantage de mener à l'obtention de compositions très particulières - parfois difficiles à atteindre par les autres procédés physico chimiques, de permettre l'utilisation des substrats de nature très variées et enfin de permettre une réaction rapide et à sec, un point important pour les possibles applications industrielles (Ratner 1993). Les limites de ces méthodes sont les coûts du dispositif sous vide, le vieillissement des surfaces et la création d'une large gamme de groupements réactifs sur la surface. Les traitements par plasma peuvent être utilisés pour réaliser (descriptions basées sur les revues (Favia and d'Agostino 1998) et (Chu, Chen et al. 2002)):

- Des dépôts chimiques assistés par plasma ou *plasma-enhanced chemical vapor deposition* (PE-CVD), un procédé durant lequel un film fin (10 nm - 10 µm) est

généré sur la surface à partir des précurseurs introduits sous forme de gaz dans la chambre plasma

- Des traitements de la surface par ajout de fonctions chimiques aux chaines existantes (appelé parfois fonctionnalisation) à l'aide de gaz tels que $O_2$, $N_2$, $H_2$, $NH_3$ ou $CO_2$ et de gaz inertes (Ar, He), ou encore par réticulation de molécules déjà présentes sur la surface.
- Une combinaison des deux procédés précédents. Le traitement de la surface du polymère peut par exemple permettre d'augmenter l'adhésion d'une couche mince déposée sur le substrat (Lerouge, Barrette et al. 2015).
- Une attaque de la surface par ablation ('*etching*') grâce à des espèces actives générées dans le plasma peut permettre de nettoyer la surface pour des traitements ultérieurs ou encore de créer des reliefs à l'échelle micrométrique grâce à des masques pour favoriser certaines interactions avec les tissus.

Selon l'application souhaitée, ces modifications de surface par plasma peuvent conduire à une utilisation directe (exemples présentés dans le Tableau 1.3).

Tableau 1.3 Exemples d'utilisation plasma pour applications vasculaires

| *Objectif de la modification* | *Exemples d'utilisation du plasma* |
|---|---|
| Modification de l'hémocompatibilité | Couche mince de fluoropolymères (Garfinkle, Hoffman et al. 1984) |
| | Couche mince de siloxane (Silver, Lin et al. 1999) |
| Orienter l'adhésion et la croissance cellulaire | Traitement à l'ammoniac (Pu, Williams et al. 2002) |
| | Couche mince de polyéthylène riche en azote sur PET et PTFE (Lerouge, Major et al. 2007, Gigout, Ruiz et al. 2011) |

En particulier, l'ajout de groupement fonctionnels de type acide carboxylique ou amine primaire sur des surfaces s'est montré utile pour augmenter l'adsorption de protéines du sérum facilitant l'adhésion de certaines cellules (Steele, Dalton et al. 1995).

Rapport-Gratuit.com

Lorsque le plasma est utilisé comme première étape en vue d'une immobilisation de biomolécules, des groupements réactifs tels que les carboxyles, les hydroxyles, les amines et les aldéhydes peuvent être créés sur la surface (Sarra-Bournet, Turgeon et al. 2006, Siow, Britcher et al. 2006, Goddard and Hotchkiss 2007) par fonctionnalisation de la surface ou par un dépôt de couche mince.

En particulier, l'équipe du Pr Wertheimer à l'École Polytechnique de Montréal a développé un revêtement riche en amines primaires déposé par polymérisation plasma basse pression à partir d'éthylène et d'ammoniac. Ce revêtement, appelé L-PPE:N pour *Low-pressure plasma polymerized ethylene doped in nitrogen* a montré une bonne stabilité en milieu physiologique, une bonne biocompatibilité et un taux d'amines primaires élevé permettant un greffage subséquent de biomolécules (Lerouge, Major et al. 2007, Truica-Marasescu and Wertheimer 2008, Ruiz, St-Georges-Robillard et al. 2010, Gigout, Ruiz et al. 2011).

#### 1.3.1.2 Modifications par voie humide

Tout comme le plasma, la chimie en solution est une méthode courante pour la fonctionnalisation de surface des biomatériaux polymériques. Elle a pour avantage de ne nécessiter aucun équipement coûteux et de produire une surface présentant de groupements fonctionnels ciblés. Cependant, elle implique souvent des temps de réaction longs et des produits chimiques corrosifs (solutions basiques ou acides) qui nécessitent des rinçages abondants pour éliminer tous les résidus toxiques pour les cellules.

De nombreuses études rapportent la modification du PET par introduction de groupements tels que des hydroxyles par hydrolyse des chaînes de polymère en milieu basique (Mougenot, Koch et al. 1996), des groupements carboxyles par hydrolyse en milieu basique puis oxydation (Marchand-Brynaert, Deldime et al. 1995), ou encore des amines (aminolyse) par réaction avec un composé aminé après introduction de groupements carboxyles (Noel, Liberelle et al. 2013). Dans le cas du PTFE, la modification de surface par voie humide pour

des applications biomédicales est peu envisageable en raison des solvants organiques très agressifs requis pour surmonter l'inertie chimique du polymère (Lin, Hsu et al. 2000).

La fonctionnalisation par voie humide, tout comme les méthodes par plasma, permettent d'introduire des groupements réactifs qui peuvent être utilisés par la suite pour immobiliser des molécules d'intérêt. En particulier, l'équipe du Pr De Crescenzo à l'École Polytechnique de Montréal a mis au point une méthode permettant d'obtenir des groupements amines primaires sans modifier les propriétés mécaniques du PET par greffage covalent d'un polymère aminé, le polyvinylamine, ou PVA (Noel, Liberelle et al. 2013). Cette technique s'est par la suite montrée efficace pour immobiliser des peptides favorisant l'adhésion cellulaire à la surface du PET (Noel, Hachem et al. 2015).

#### 1.3.1.3 Limites de modifications physico-chimiques

La modification des paramètres physico-chimiques de la surface d'un matériau par l'introduction de groupements réactifs affecte la réaction biologique après implantation. En effet, tel que détaillé dans la section 1.2.1, les protéines qui s'adsorbent à la surface d'un implant dépendent de la charge et de la nature chimique de la surface (Schmidt, Waldeck et al. 2009). En introduisant des groupements chargés positivement ou négativement, il est donc possible de moduler l'adsorption de protéines et ainsi d'influencer indirectement l'adhésion ou la prolifération cellulaires (Lee, Jung et al. 1994, Schmidt, Waldeck et al. 2009). Cependant, ces effets biologiques sont peu spécifiques puisque dépendants des protéines présentes dans le milieu. Pour avoir un effet ciblé sur les cellules, on immobilise généralement des biomolécules qui vont interagir avec les cellules de façon spécifique grâce aux récepteurs membranaires (ex. intégrines, récepteurs de facteur de croissance) (Ito 2009, Mieszawska and Kaplan 2010). Cela permet de déclencher des cascades de signalisation chez un type de cellules ciblé et par conséquent de favoriser une réponse tissulaire adaptée à l'application.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

*Les méthodes physico-chimiques de fonctionnalisation de surface mènent à des applications biologiques peu spécifiques puisque leur effet principal est de modifier l'adsorption des protéines sur la surface des biomatériaux. Cependant, ces techniques sont très utiles pour créer des groupements réactifs nécessaires à l'immobilisation subséquente de biomolécules.*

### 1.3.2 Fonctionnalisation par ajout de biomolécules

L'ajout de molécules bioactives à la surface des matériaux permet d'optimiser l'efficacité de ces derniers en fonction de l'application à laquelle ils sont destinés. De nombreuses revues détaillent les méthodes d'immobilisation possibles pour les biomolécules (Rusmini, Zhong et al. 2007, Ito 2009, Masters 2011, Ito and Tada 2013). Le choix de la méthode à utiliser dépend de la stabilité désirée, de la nature du matériau, de la nature de la biomolécule d'intérêt, ainsi que de la densité et de l'orientation nécessaire pour les molécules sur la surface nécessaire. On distingue notamment les techniques pour libération progressive et celles pour immobilisation stable des biomolécules à la surface (Figure 1.12).

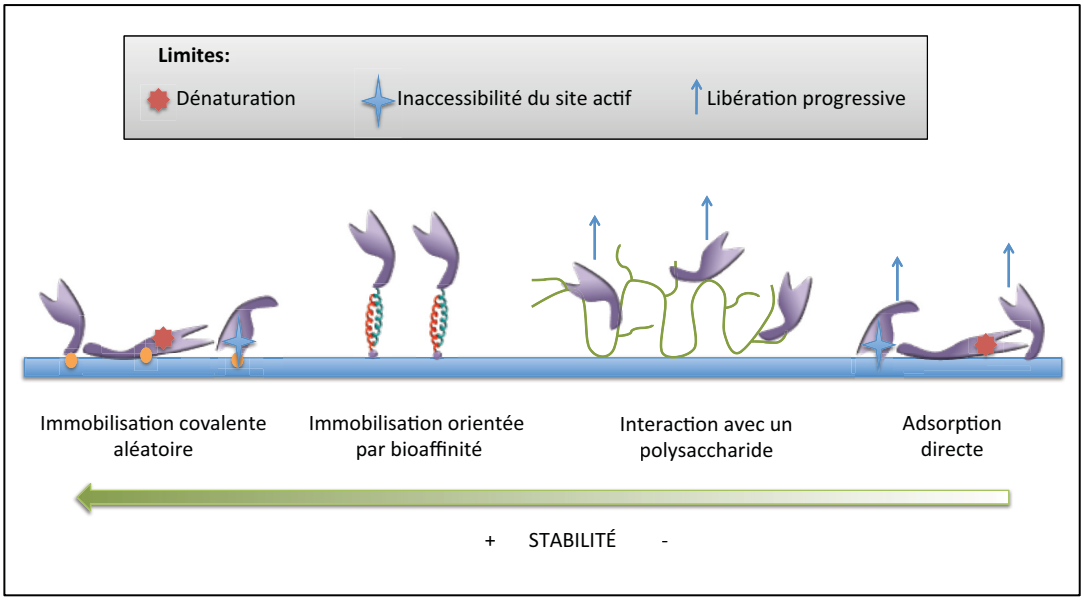



Figure 1.12 Schéma présentant de techniques d'immobilisation de biomolécules et certaines de leurs limites

#### 1.3.2.1 Libération progressive

L'une des techniques les plus utilisées pour conférer des propriétés bioactives à des matériaux est de lier la biomolécule à la surface de façon réversible pour qu'une libération progressive ait lieu après l'implantation. Cela peut être atteint par différentes techniques:

i) L'adsorption 'physique' simple: Cette technique qui peut être considérée comme une méthode d'immobilisation temporaire, présente l'avantage d'être très simple car la biomolécule est attachée à la surface par simple incubation en solution. En présence de milieu physiologique, la protéine est libérée progressivement grâce à un remplacement par d'autres protéines. L'adsorption se fait par des interactions ioniques ou hydrophobes avec le substrat. Cependant, la surface obtenue est hétérogène et les protéines peuvent être dénaturées lors de l'adsorption, donc perdre leur bioactivité (Rusmini, Zhong et al. 2007).

ii) L'intégration des composés actifs dans une matrice ou sur une surface, suivie d'une libération par diffusion, érosion, action enzymatique ou liens hydrolysables tels que des ponts disulfures (Heller 1980, Saito, Swanson et al. 2003, Mukherjee, Santra et al. 2008, Formiga, Pelacho et al. 2010): Cette technique demande une charge élevée en molécules bioactives pour réaliser un revêtement possédant un effet prolongé, ainsi qu'une formulation relativement complexe pour éviter un relargage brutal (*burst release*) du composé actif. Peu adaptée à des revêtements pour des implants de grande taille tels que les endoprothèses couvertes, cette méthode présente cependant des intérêts pour la formulation de nanoparticules de polymère permettant la livraison locale de protéines ou de médicaments (Mukherjee, Santra et al. 2008, Formiga, Pelacho et al. 2010, Ishihara, Kaneko et al. 2014, Vulic and Shoichet 2014).

iii) Les interactions biologiques entre des polysaccharides et des facteurs de croissance (Vulic and Shoichet 2014): Utilisant les interactions naturelles basées sur une haute densité de charge et la complémentarité de certains domaines chez les facteurs de croissance et les polysaccharides, ce type d'immobilisation permet de préserver la bioactivité des facteurs de

croissance et d'allonger leur temps de demi-vie comparé aux facteurs de croissance solubles (Roghani, Mansukhani et al. 1994, Sakiyama-Elbert and Hubbell 2000). Le relargage des protéines peut s'effectuer sous l'effet d'un équilibre dynamique entre la forme soluble et la forme liée au polysaccharide, ou par l'action d'enzymes (Rifkin and Moscatelli 1989). L'un des polysaccharides utilisés fréquemment pour ce type d'application est l'héparine. En effet, de nombreux facteurs de croissance possèdent une affinité élevée pour l'héparine, tels que VEGF, β-FGF, TGF-β, NGF, PDGF (Vulic and Shoichet 2014). En particulier, plusieurs études pour la fonctionnalisation d'endoprothèses couvertes ont utilisé l'interaction entre l'héparine et le β-FGF (van der Bas, Quax et al. 2002, Kajimoto, Shimono et al. 2008) (voir 1.5).

#### 1.3.2.2 Immobilisation non spécifique ou aléatoire

L'immobilisation des protéines sur une surface conduit à une action plus efficace comparée à celle des protéines relarguées par libération progressive, car elle permet d'atteindre une forte densité locale de protéines, ainsi que de l'activation des récepteurs membranaires tout en prévenant l'internalisation de la protéine dans la cellule. Ceci confère à la surface un effet plus durable (Fan, Au et al. 2007, Masters 2011). Pour procéder à l'immobilisation, l'une des techniques les plus simples est le greffage covalent direct de biomolécules sur une surface pré-fonctionnalisée avec des groupements réactifs tels que des amines primaires, des carboxyles ou des thiols, par exemple suite à une fonctionnalisation par voie humide ou un dépôt de couche mince par plasma (Rusmini, Zhong et al. 2007, Vallières, Petitclerc et al. 2007, Masters 2011). En effet, les protéines possèdent toutes une extrémité amine (N terminal) et une extrémité acide carboxylique (C terminal), ainsi que des groupes fonctionnels présents sur certaines chaînes latérales de leurs résidus. Ces groupements chimiques peuvent être activés et utilisés pour le greffage à la surface des biomatériaux (Tableau 1.4).

Tableau 1.4 Groupes fonctionnels disponibles chez les acides aminés et nature chimique des surfaces nécessaires pour une immobilisation covalente
Traduit de (Rusmini, Zhong et al. 2007)

| *Groupes fonctionnels latéraux* | *Acides aminés* | *Surfaces* |
|---|---|---|
| -NH2 | Lys, hydroxyl-Lys | Acide carboxylique |
| | | Ester activé (NHS) |
| | | Epoxy |
| | | Aldéhyde |
| -SH | Cys | Maléimide |
| | | Pyridyil disulfide |
| | | Vinyl sulfone |
| -COOH | Asp, Glu | Amine |
| -OH | Ser, Thr | Epoxy |

Pour permettre la réaction de greffage, des agents de couplage vont être utilisés pour réagir de façon ciblée avec certains groupements chimiques: les carbodiimides (par exemple, l'EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) et le N-hydrosuccinimide (NHS) activent les groupements carboxyles, alors que le Di-tert-butyl peroxide (DTBP) et l'anhydride glutarique se lient aux amines primaires (Cutler and García 2003, Vallières, Petitclerc et al. 2007, Chuang and Masters 2009).

Il est également possible d'intercaler un 'bras espaceur', molécule destinée à garder une distance fixe entre le support et la protéine à greffer (Vallières, Petitclerc et al. 2007, Ito 2008, Sharon and Puleo 2008), pour diminuer l'encombrement stérique sur la surface et permettre une meilleure accessibilité des biomolécules pour les cellules. Cependant, lorsque la biomolécule greffée possède plusieurs groupements réactifs de même nature (par exemple, l'EGF possède trois groupements amine, l'un sur le N-terminal et les deux autres sur les chaînes latérales des deux résidus Lysine), on observera une immobilisation aléatoire impliquant ces différents groupements réactifs et une orientation variée de la biomolécule sur la surface. Il est possible que certaines des orientations observées conduisent à une perte de

bioactivité de la molécule par dénaturation (ex: modification de sa conformation ou implication d'un résidu du site actif dans la liaison covalente avec la surface), ou à cause d'une orientation du site actif qui le rend inaccessible aux cellules (Figure 1.12).

#### 1.3.2.3 Immobilisation spécifique ou orientée

Pour remédier à ces problèmes, des méthodes d'immobilisation permettant une orientation uniforme et une bioactivité optimale des protéines ont été développées (Rusmini, Zhong et al. 2007). Il existe par exemple des méthodes covalentes impliquant la fonctionnalisation préalable de la biomolécule et /ou de la surface par des étapes de chimie organique (la chimie 'click', la cycloaddition Diels Alder, le procédé Staudiger) (Rusmini, Zhong et al. 2007), ou des méthodes non covalentes basées sur la bioaffinité de peptides utilisant des biomolécules produites par le biais du génie génétique, tel qu'illustré dans la Figure 1.12. Dans le cadre de ce projet, c'est le second type d'immobilisation spécifique qui a été sélectionné.

*Immobilisation par bioaffinité*

L'immobilisation orientée de biomolécules par bioaffinité repose sur l'interaction spécifique existant entre une étiquette d'affinité et un support préalablement traité avec un élément complémentaire à l'étiquette. Ce type d'immobilisation nécessite dans un premier temps l'ajout de l'étiquette d'affinité à la biomolécule (par greffage chimique ou via l'expression d'une biomolécule de fusion liant la biomolécule d'intérêt à l'étiquette produite par des techniques de biologie moléculaire). On retrouve ce type d'immobilisation dans des systèmes utilisant le couple biotine-streptavidine, un couple de molécules à forte affinité qui est largement utilisé en biotechnologie pour les tests ELISA, la détection et la purification de protéines (Lu, Chen et al. 2008, Liberelle, Bartholin et al. 2010), mais également dans des systèmes utilisant le couple polyhistidine/ions métalliques, le couple domaine Fc des immunoglogulines G/protéine A ou G, et dans les interactions peptidiques de types coiled-coil (Boucher 2010).

La stabilité de ces interactions, même si elle n'égale pas celle d'une liaison covalente, permet toutefois de résister à de fortes variations de température, de pH, et même parfois à la présence de détergents (Holmberg, Blomstergren et al. 2005). L'avantage de ces modes d'immobilisation est la spécificité et la sélectivité : l'immobilisation aura toujours lieu précisément entre les étiquettes d'affinité complémentaires, ce qui permet une disposition et une orientation très régulières des protéines greffées sur la surface et une amélioration de la bioactivité de ces dernières par rapport au greffage covalent dont l'orientation est aléatoire (Liberelle, Boucher et al. 2010). La nature et la position de ces étiquettes d'affinité sur les biomolécules sont des paramètres cruciaux, car elles peuvent entraîner une perte de la bioactivité des biomolécules (Boucher, St-Laurent et al. 2008).

En particulier, la technique d'immobilisation orientée utilisée dans ce projet est basée sur des interactions super-hélice ou 'coiled-coil'. Cette technique est basée sur la complémentarité des peptides Ecoil et Kcoil (Figure 1.13), dont les motifs respectifs sont composés des séquences d'acides aminés EVSALEK et KVSALKE répétées cinq fois et qui se présentent chacun sous la forme d'une hélice α (Chao, Houston et al. 1996, Chao, Bautista et al. 1998). Lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre, ces deux peptides forment un complexe coiled-coil hétérodimérique stable ($K_D$ entre 60 pM et 5 nM en fonction de la protéine fusionnée) et hautement spécifique grâce aux interactions entre les différents résidus des chaines peptidiques (liaisons ioniques entre les résidus chargés E et K, et interactions hydrophobes entre les résidus apolaires L et V, Figure 1.13) (Chao, Houston et al. 1996, Chao, Bautista et al. 1998).

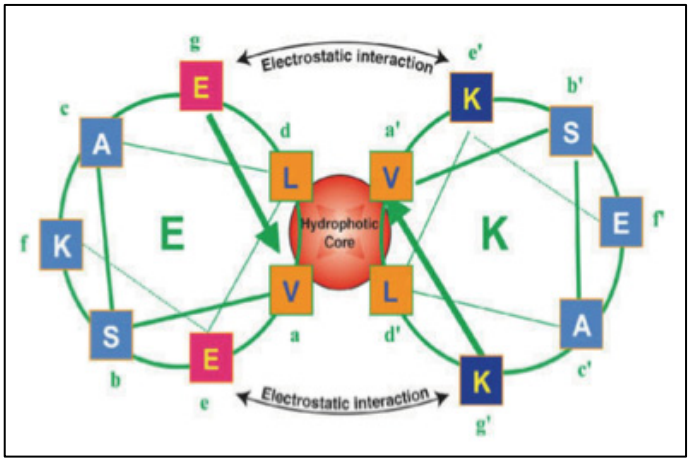



Figure 1.13 Structure des peptides Ecoil et Kcoil
Figure tirée de (Boucher, St-Laurent et al. 2010)

La technique d'immobilisation développée dans le groupe de recherche du Pr De Crescenzo à l'école Polytechnique fait intervenir le greffage covalent de l'un des coils portant un groupement terminal cystéine (Kcoil) par voie chimique sur le substrat. Ensuite, la biomolécule d'intérêt couplée à l'autre coil (Ecoil) produite grâce au génie génétique est mise en contact avec la surface, et grâce à la forte affinité du complexe coiled-coil, la biomolécule est capturée et s'immobilise de façon spécifique sur la surface. Des résultats obtenus sur les cellules humaines de carcinome épidermoïde (A-431) et sur les cellules humaines de la cornée (HCE-2) ont montré que le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) immobilisé par le couple Ecoil/Kcoil conduit à une activation plus efficace des récepteurs EGF, une meilleure adhésion et une accélération de la prolifération comparé à l'EGF greffé de manière aléatoire (Boucher, Ruiz et al. 2010, Liberelle, Boucher et al. 2010). Le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) portant une étiquette Ecoil a également été produit et immobilisé avec succès grâce à ce couple de peptides, permettant d'améliorer la survie des cellules endothéliales (HUVEC) (Murschel, Liberelle et al. 2013). Les avantages de l'immobilisation de biomolécules par interactions coiled-coil sont une haute conservation de la bioactivité, la possibilité d'avoir une densité de biomolécules très élevée sur la surface, et une grande disponibilité de la biomolécule grâce à la longueur du motif coiled-coil qui agit comme un bras espaceur (Boucher, Liberelle et al. 2009).

#### 1.3.2.4 Sous-couche antiadhésive pour l'immobilisation de biomolécules

Outre la technique d'immobilisation utilisée pour lier une biomolécule à la surface d'un matériau, la nature de la couche sous-jacente constitue également un paramètre important pour la bioactivité. En effet, pour maximiser la visibilité de la biomolécule d'intérêt fixée sur la surface, une stratégie consiste à limiter l'adsorption non spécifique de protéines du milieu physiologique qui se produit lorsque le matériau est implanté (Delaittre, Greiner et al. 2012, Noel, Hachem et al. 2015). L'utilisation de polymères antiadhésifs (*low fouling* ou *non fouling*) permet de réduire drastiquement l'adsorption des protéines (Figure 1.14). Elle permet également d'obtenir une immobilisation contrôlée de la protéine d'intérêt en minimisant son adsorption directe sur la surface. Ceci améliore l'efficacité de l'immobilisation puisque toutes les protéines ajoutées en solution seront disponibles pour interagir de façon ciblée avec la surface (ex. lien covalent, interactions coiled-coil).

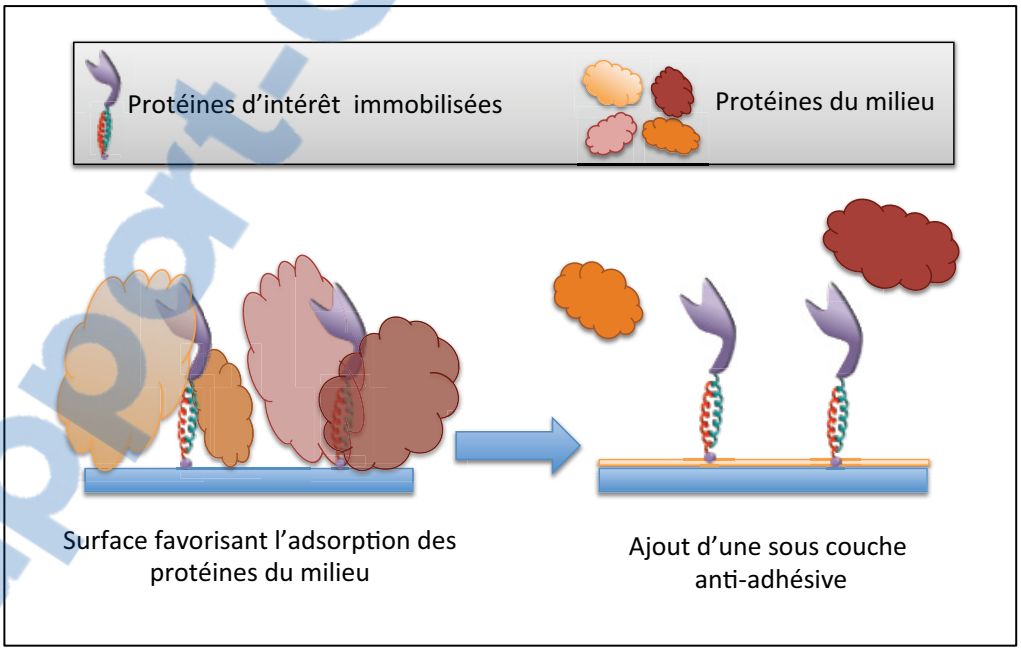



Figure 1.14 Schéma illustrant l'utilité d'une sous-couche antiadhésive pour l'immobilisation de protéines

Les paramètres que l'on retrouve chez les polymères antiadhésifs synthétiques ou naturels sont l'hydrophilicité, une charge globale neutre (soit non chargé, soit charges compensées sur

Rapport-Gratuit.com

chaque monomère) et la capacité de créer des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau (Chen, Li et al. 2010). La structure de la molécule a également une importance, car les surfaces présentant des chaines flexibles alignées permettent d'allier un effet de répulsion stérique à l'hydratation de la surface (Chen, Li et al. 2010).
Le polymère le plus répandu pour prévenir l'adsorption de protéines est le polyéthylène glycol (PEG) (Delaittre, Greiner et al. 2012). Ce polymère synthétique a été utilisé pour la conception de nombreux biomatériaux (lentilles cornéennes, dispositifs vasculaires, etc.)(Deible, Petrosko et al. 1999, Kingshott, Thissen et al. 2002). Cependant, le PEG prévient également l'adhésion cellulaire, il doit donc être combiné avec des peptides biomimétiques si l'on veut permettre l'adhésion cellulaire (Delaittre, Greiner et al. 2012).

Certains polysaccharides naturels tels que le dextrane ou les glycosaminoglycanes présentent également des propriétés antiadhésives.

Le dextrane est un polysaccaride composé d'unités de glucose, fortement hydrophile et de charge neutre, dont la masse moléculaire peut varier. Il est utilisé dans de nombreuses applications en biotechnologies (lubrifiant pour lentilles cornéennes, surface antiadhésive pour les biocapteurs, etc) (Kalachandra and Shah 1987, Martwiset, Koh et al. 2006), et peut être immobilisé sur des surfaces par ses groupements hydroxyles ou par l'ajout de carboxyles (Massia, Stark et al. 2000, Monchaux and Vermette 2007, Liberelle, Merzouki et al. 2013).

Certains glycosaminoglycanes chargés négativement, tels que l'héparine et la chondroitine sulfate, ont également démontré des propriétés antiadhésives sélectives envers les protéines du plasma anioniques grâce à la répulsion électrostatique, ce qui leur confère des propriétés antithrombogéniques (Keuren, Wielders et al. 2003) tout en permettant l'adhésion cellulaire (Baldwin and Kiick 2010, Charbonneau, Ruiz et al. 2012, Hoshi, Van Lith et al. 2013, Thalla, Fadlallah et al. 2014). En particulier, l'héparine est communément utilisée pour ses propriétés anticoagulantes dans les implants vasculaires et les dispositifs en contact avec le sang (Sakiyama-Elbert , Niimi, Ichinose et al. 1999, Aksoy, Hasirci et al. 2008).

En résumé, l'ajout d'une sous-couche de polymères antiadhésifs présente l'avantage de prévenir l'adsorption non-spécifique de protéines du plasma et d'aider à la bioactivité des facteurs de croissance immobilisés. Cependant, la plupart des polymères antiadhésifs tendent à diminuer l'adhésion cellulaire qui est pourtant essentielle pour que l'interaction entre les cellules et les facteurs de croissance immobilisés puisse avoir lieu. La nature de la sous-couche utilisée semble donc cruciale pour assurer une réponse biologique optimale, soit dans notre cas pour la création d'un revêtement qui favorise la survie cellulaire à la surface des EC.

*Dans le cadre de ce projet, l'immobilisation orientée de facteurs de croissance par le couple d'étiquettes de haute affinité Ecoil et Kcoil semble très adaptée pour la création d'un revêtement bioactif en raison de la grande stabilité des liens formés et de la bioactivité améliorée apportée par l'orientation. De plus, l'ajout d'une sous-couche antiadhésive pourrait permettre d'améliorer la visibilité des facteurs immobilisés tout en évitant l'adsorption de protéines du plasma.*

## 1.4 Biomolécules pour l'ingénierie tissulaire et la guérison vasculaire

### 1.4.1.1 Molécules de la MEC

*Généralités*

De nombreuses molécules de la MEC ont été utilisées pour créer des revêtements de surface destinés à des implants vasculaires (Tableau 1.5). Ces molécules naturelles ont été choisies pour leur capacité à interagir avec les facteurs de croissance, à favoriser l'adhésion cellulaire ou encore à diminuer l'adhésion plaquettaire.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau 1.5 Exemples de revêtements développés à base de molécules de la MEC pour des applications vasculaires

| *Molécule utilisée pour le revêtement* | *Utilité* | *Études* |
|---|---|---|
| Héparine | Diminuer l'adhésion des plaquettes et favoriser l'adhésion des cellules endothéliales | (Hoshi, Van Lith et al. 2013) (Zhu, Ming et al. 2005) |
| | Libérer progressivement des facteurs de croissance | (Wissink, Beernink et al. 2000) (van der Bas, Quax et al. 2002) |
| Collagène | Sceller des prothèses textiles | (Guidoin, Marceau et al. 1989) |
| | Favoriser l'adhésion cellulaire | (van der Bas, Quax et al. 2002) (Charbonneau, Gautrot et al. 2007) |
| Fibronectine | Favoriser adhésion cellulaire | (Vallières, Petitclerc et al. 2007) |
| Perlecan | Diminuer l'adhésion des plaquettes et favoriser l'adhésion des cellules endothéliales | (Lord, Yu et al. 2009) |
| Gélatine | Augmenter l'adhésion cellulaire sur l'extérieur des prothèses | (Kito and Matsuda 1996) |
| Acide hyaluronique/ Chondroitine sulfate/Héparine | Diminuer l'adhésion de la fibrine et l'endothélialisation sur l'intérieur des prothèses | (Kito and Matsuda 1996) |
| Chondroitine sulfate | Augmenter l'adhésion et diminuer l'apoptose des cellules musculaires lisses | (Charbonneau, Gautrot et al. 2007) |

*Chondroitine sulfate*

Pour notre application centrée sur l'amélioration de la guérison autour des endoprothèses couvertes par la lutte contre l'apoptose des CMLV, une molécule de la MEC se démarque parmi les autres: la chondroitine sulfate (CS). En effet, la chondroitine sulfate est un polysaccharide hydrophile du groupe des glycosaminoglycanes possédant plusieurs isoformes (Figure 1.15), qui est présent dans les tissus conjonctifs et qui détient un certain nombre de propriétés adéquates à notre application.

- Structure et propriétés

La structure de CS est constituée d'un enchainement de motifs d'acide D-glucuronique et de D-galactosamine reliés par des liaisons β 1-3 (Figure 1.15), dont la taille varie selon sa provenance (CS d'origine bovine: Mw= 20-26 kDa; CS extraite de cartilage de requin: Mw= 64-70 kDa)(Volpi 2007). La présence de groupements chargés tels que les carboxylates et les sulfates lui confère une charge globale négative à pH physiologique et une haute solubilité dans l'eau. Sa forte interaction avec l'eau, sa charge et son degré de sulfatation lui confèrent des propriétés anticoagulantes (McGee and Wagner 2003), ainsi que des propriétés antiadhésives pour les protéines du plasma et les plaquettes (Keuren, Wielders et al. 2003, Thalla, Fadlallah et al. 2014). De plus, certaines isoformes de CS (CS-B, CS-E en particulier) démontrent des affinités avec certains facteurs de croissance (Nandini, Mikami et al. 2004) qui dépendent également du nombre et de la position des groupements sulfates (Gama, Tully et al. 2006, Rawat, Gama et al. 2008).

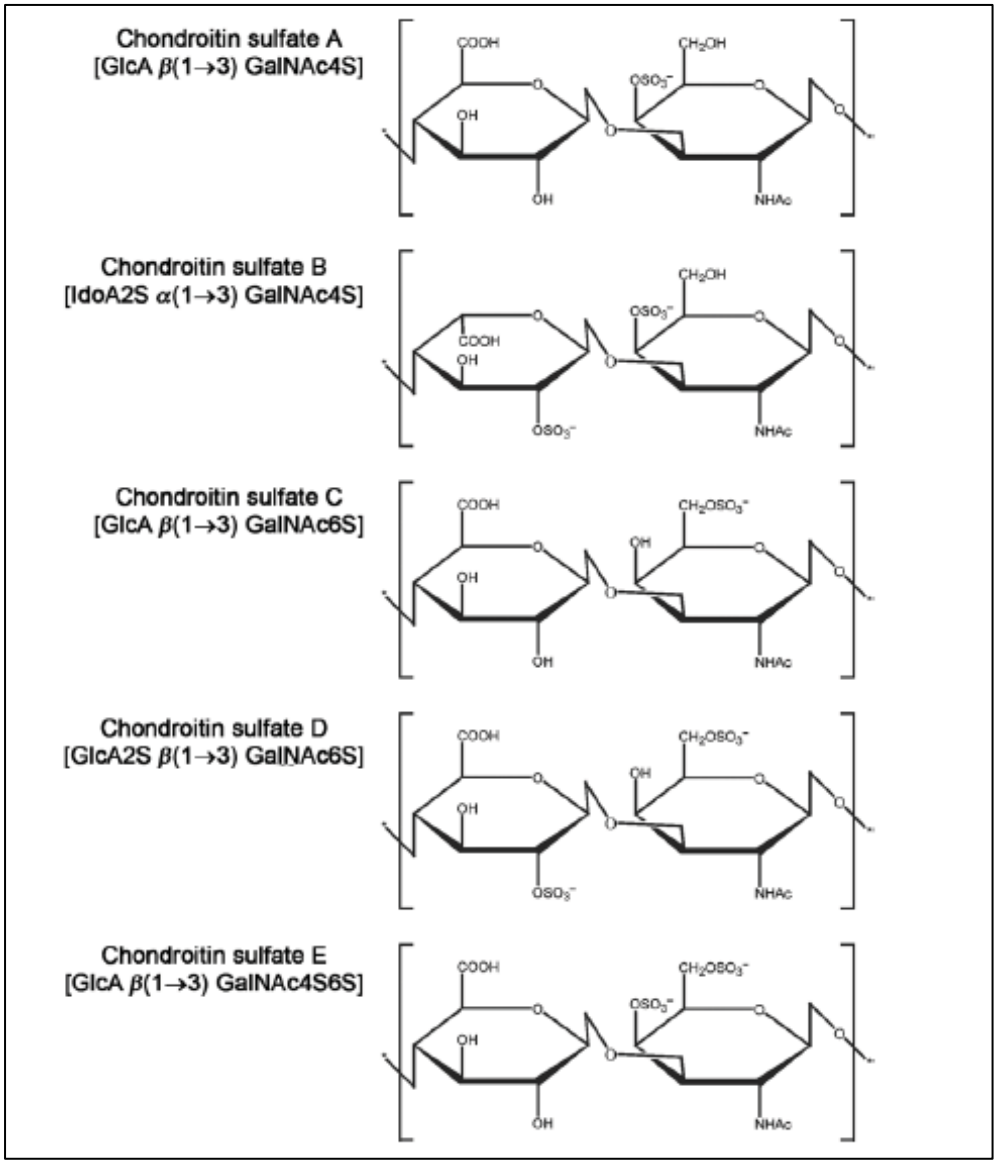



Figure 1.15 Les différentes isoformes de la chondroitine sulfate diffèrent principalement par le nombre et la position des groupements sulfates
Figure tirée de (Volpi 2006)

- Effet sur les cellules de la paroi vasculaire

Tout d'abord, la CS favorise les processus de guérison grâce à une augmentation de la motilité des fibroblastes (Zou, Jiang et al. 2009) et une action anti inflammatoire (Iovu, Dumais et al. 2008). Cette molécule a également été identifiée parmi les médiateurs relargués

par les cellules endothéliales vasculaires apoptotiques, et il a été prouvé qu'elle déclenche une résistance à l'apoptose chez les CMLV et les fibroblastes à travers l'amplification de la phosphorylation de ERK1/2 ou de la voie de signalisation PI3K respectivement, qui engendrent l'augmentation du médiateur anti-apoptotique Bcl-xl (Raymond, Desormeaux et al. 2004). Elle a montré des effets anti-apoptotiques sur les CMLV lorsqu'elle est réticulée avec du collagène sur une surface de PET (Charbonneau, Gautrot et al. 2007), et lorsqu'elle est greffée via ses groupements carboxyles sur une surface riche en amines primaires (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). De plus, tel que mentionné plus haut, la CS possède des propriétés antiadhésives sélectives: elle réduit l'adsorption des protéines du plasma telles que l'albumine, l'immunoglobuline, l'antithrombine et le fibrinogène (Keuren, Wielders et al. 2003, Thalla, Fadlallah et al. 2014). Elle permet néanmoins l'adhésion des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires (Charbonneau, Gautrot et al. 2007, Thalla, Fadlallah et al. 2014).

- Applications pour des revêtements

Très présente dans les tissus conjonctifs, la chondroitine sulfate est très bon marché par rapport aux autres glycosaminoglycanes (Tableau 1.6). De plus, la chaîne de CS possède un groupement carboxyle par unité de disaccharide, ce qui permet de la réticuler efficacement de façon covalente par une chimie carbodiimide (EDC/NHS) sur des surfaces riches en amines primaires, tel que démontré par l'équipe du Pr Sophie Lerouge (Charbonneau, Gautrot et al. 2007, Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Enfin, ses propriétés antiadhésives envers les protéines du plasma sanguin (Keuren, Wielders et al. 2003, Thalla, Fadlallah et al. 2014) permettraient de préserver la visibilité d'un facteur de croissance immobilisé à sa surface.

Tableau 1.6 Prix minimum approximatif des GAG
tirée de (Sigma-Aldrich 2015)

| *Glycosaminoglycane* | *Prix minimum /g (CAD)* |
|---|---|
| Chondroitine sulfate | 15 |
| Heparane sulfate | 100 |
| Acide hyaluronique | 550 |
| Dermatane sulfate | 2000 |

*Sa structure chimique, ses propriétés biologiques ainsi que son faible coût font de la chondroitine sulfate une candidate très intéressante pour la création de revêtements anti-apoptotiques et pour l'immobilisation de facteur(s) de croissance.*

#### 1.4.1.2 Facteurs de croissance pour cellules vasculaires

Les principaux facteurs de croissance impliqués dans la guérison vasculaire, ainsi que dans la prolifération, la survie et la migration des cellules vasculaires sont détaillés dans le Tableau 1.7. Ces protéines à l'action ciblée représentent des candidats de choix pour la création d'un revêtement qui favoriserait la guérison autour des endoprothèses couvertes. En particulier, EGF et de VEGF possèdent un effet sur la survie des cellules vasculaires (Tableau 1.7), ils présentent donc un grand intérêt pour la construction de notre revêtement bioactif. Le rôle biologique de ces deux facteurs de croissance est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

Tableau 1.7 Facteurs de croissance impliqués dans la guérison
Basé sur (Bennett and Schultz 1993, Werner and Grose 2003, Dreux, Lamb et al. 2006, Barrientos, Stojadinovic et al. 2008, Shibuya 2011)

| Facteur de croissance | Taille (kDa) *Structure* | Rôle dans la guérison vasculaire | Cellules cibles vasculaires | Récepteur(s) impliqué(s) |
|---|---|---|---|---|
| EGF | 6 *Monomère* | Ré-épithelialisation Prolifération, survie et migration | Cellules endothéliales Macrophages Fibroblastes CMLV | EGFR (appelé aussi ErbB1) |
| FGF | 16-18 *Monomère* | Formation de tissu de granulation Ré-épithelialisation Formation et remodelage de la MEC | Fibroblastes Cellules endothéliales CMLV | FGFR |
| TGF-β | 25 *Homodimère* | Ré-épithelialisation Effet pro- ou anti-proliératif selon le contexte | Plaquettes Macrophages Lymphocytes Fibroblastes | TGFR1 TGFR2 TGFR3 |
| PDGF | 28-35 *dimères* (AA, AB ou BB) | Prolifération et migration Formation de tissu de granulation | Plaquettes Macrophages Cellules endothéliales Fibroblastes | PDGFR-α PDGFR- β |
| VEGF | 45 *Homodimère* | Angiogénèse Prolifération, survie et migration | Cellules endothéliales | VEGFR1 VEGFR2 |
| IGF | 7.5 *Monomère* | Prolifération | Cellules endothéliales, fibroblastes | IGFR1 IGFR2 |

*EGF*

L'EGF est une protéine comprenant 53 acides aminés dont la structure présente 3 boucles maintenues par des ponts disulfures qui sont nécessaires à sa bioactivité (Bennett and Schultz 1993). Cette protéine produite par de nombreuses cellules, notamment par les plaquettes au niveau des lésions, fait partie d'une famille regroupant entre autres l'EGF, l'analoque de l'EGF se liant à l'héparine (HB-EGF), le facteur de croissance transformant alpha (TGF-α), l'épireguline, l'amphiréguline, la betacelluline, l'épigène, et 6 neurégulines (Bennett and Schultz 1993, Barrientos, Stojadinovic et al. 2008).

Le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) induit la croissance et la survie de nombreux types cellulaires grâce à son activité mitogénique et anti apoptotique, et il peut également provoquer la différenciation dans certains tissus, deux propriétés qui lui confèrent un rôle important dans la guérison tissulaire (Njieha and Shalaby 1992). En particulier, l'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) par son ligand EGF mène à l'activation de trois voies de signalisation qui favorisent la survie (Figure 1.16): PI3K/Akt, RAS/ERK et JAK/STAT (Dreux, Lamb et al. 2006). L'interaction entre EGFR et EGF a été estimée par une constante de dissociation ($K_D$) de 175 nM (Dawson, Berger et al. 2005). En plus de son rôle sur la prolifération et la survie cellulaire, l'EGF permet également d'augmenter la motilité cellulaire pour la fermeture des blessures par l'activation des voies de signalisation de ERK 1 et 2 (Maheshwari, Brown et al. 2000, Kurten, Chowdhury et al. 2005).

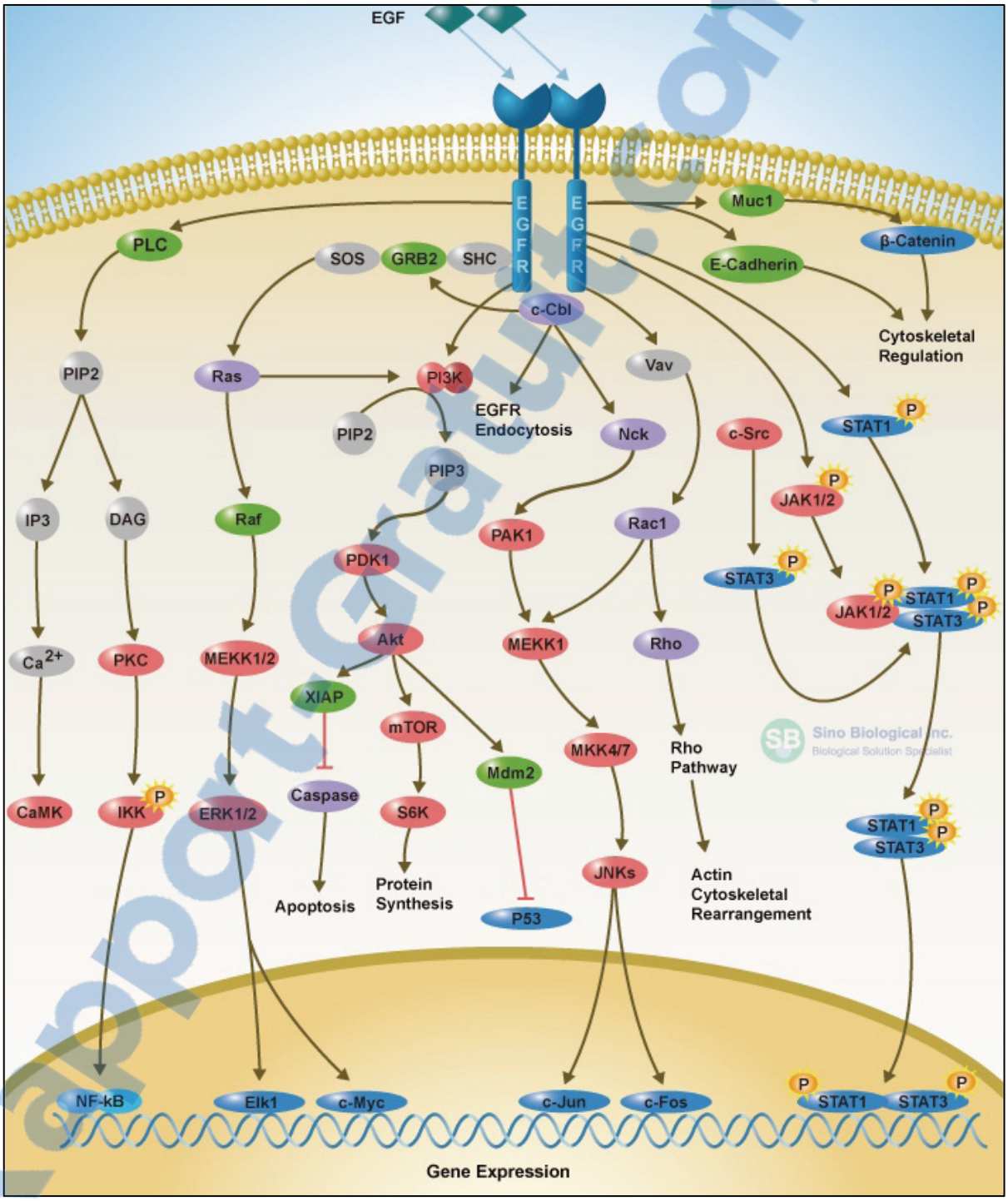



Figure 1.16 Voies de signalisation de EGFR
Figure tirée de (Sino-Biological-Inc 2012)

Des études utilisant EGF pour réaliser des revêtements bioactifs ont montré que les propriétés biologiques d'EGF sont conservées et même prolongées lorsqu'il est immobilisé sur une surface : en effet, l'immobilisation permet d'activer des signaux intracellulaires de type ERK durant des périodes beaucoup plus longues que l'EGF en solution (Fan, Au et al. 2007, Caplan and Shah 2009). Le greffage covalent via ses groupements amines primaires produit une orientation aléatoire des molécules d'EGF sur la surface du fait de la présence de trois groupes amines primaires distincts sur la chaine de l'EGF. Cependant, malgré cet arrangement aléatoire qui modifie leur accessibilité par les cellules, les molécules d'EGF induisent la croissance des CMLV (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Une immobilisation orientée de l'EGF par l'utilisation de peptides coiled-coil a permis d'obtenir un effet biologique plus important que l'immobilisation covalente aléatoire de l'EGF (Boucher, Liberelle et al. 2009, Le, Lenferink et al. 2009, Liberelle, Boucher et al. 2010).

Enfin, l'EGF peut influer sur l'adhésion cellulaire, cependant son effet est controversé dans la littérature : certaines études font part d'une diminution de l'adhésion en présence d'EGF (Xie, Pallero et al. 1998, Maheshwari, Wells et al. 1999), d'autres font part du contraire (Berliner, Aharanov et al. 1981, Boucher, Ruiz et al. 2010).

Dans une étape précédente du projet (doctorat de C. Charbonneau), une méthode d'immobilisation de chondroitine sulfate et de facteur de croissance de l'épiderme par greffage covalent carbodiimide sur des surfaces riches en amines primaires a été développée. Les résultats obtenus sur les cellules animales (CMLV embryonnaires de rat, A7R5) ont montré une amélioration de la croissance et de la résistance à l'apoptose (Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012). De plus, le greffage de l'EGF sur CS ne semble pas avoir affecté la bioactivité et l'effet anti-apoptotique de CS: lorsque des cellules dont les récepteurs EGF avaient été bloqués ont été exposées à une surface de CS+EGF, une réponse similaire aux surfaces de CS seule a été obtenue (Charbonneau, Liberelle et al. 2011).

*VEGF*

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, ou VEGF-A) est une protéine constituée de deux chaînes identiques, qui existe sous plusieurs isoformes ($VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$). La forme la plus importante, $VEGF_{165}$, est composée de deux chaînes de 165 acides aminés amenant un poids moléculaire total de 38 kDa (Shibuya 2011). Le VEGF joue un rôle multiple dans le processus de guérison, notamment grâce à l'angiogenèse et le remodelage des tissus, la prolifération (effet mitogène), la survie (effet anti-apoptotique) et la migration des cellules endothéliales ainsi que la production de collagène (Bao, Kodra et al. 2009, Formiga, Pelacho et al. 2010). Cette action du facteur de croissance s'effectue grâce à l'interaction avec les récepteurs VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR/Flk-1) présents sur la membrane des cellules endothéliales. En particulier, la liaison de VEGF avec le récepteur VEGFR-2 mène à l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt, MEK/Erk MAPK et eNOS/NO, tel qu'illustré dans la Figure 1.17. L'affinité du facteur de croissance avec ces deux récepteurs a été estimée avec une constante de dissociation de l'ordre de 1-10 pM pour VEGFR-1 et d'environ 100 pM pour VEGFR-2 (Shibuya 2011).

Dans le domaine des biomatériaux, le VEGF a jusqu'ici été principalement utilisé pour i) favoriser l'endothélialisation de prothèses vasculaires (Crombez, Chevallier et al. 2005, Zhou, Liu et al. 2009, Shin, Lee et al. 2012, Zhang, Jia et al. 2013) ou ii) favoriser la vascularisation de structures 3D en ingénierie tissulaire (Zisch, Lutolf et al. 2003, Koch, Yao et al. 2006, Shen, Shoichet et al. 2008, Seyednejad, Ji et al. 2012). Pour immobiliser VEGF sur les biomatériaux, différentes techniques ont été utilisées, telles que le greffage covalent utilisant la chimie carbodiimide (Shen, Shoichet et al. 2008) ou l'addition de Michael (Zisch, Lutolf et al. 2003, Shin, Lee et al. 2012); ou encore l'adsorption électrostatique sur des molécules chargées négativement comme l'albumine par exemple (Crombez, Chevallier et al. 2005) ou l'héparine (Zhou, Liu et al. 2009), et plus récemment, au sein du laboratoire De Crescenzo, par le système de peptides coiled-coil (Murschel, Liberelle et al. 2013).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

En particulier, l'immobilisation de VEGF par le système coiled-coil s'est montrée stable et a permis de conserver la bioactivité de la protéine et d'induire la survie cellulaire chez les cellules endothéliales vasculaires (Murschel, Liberelle et al. 2013).

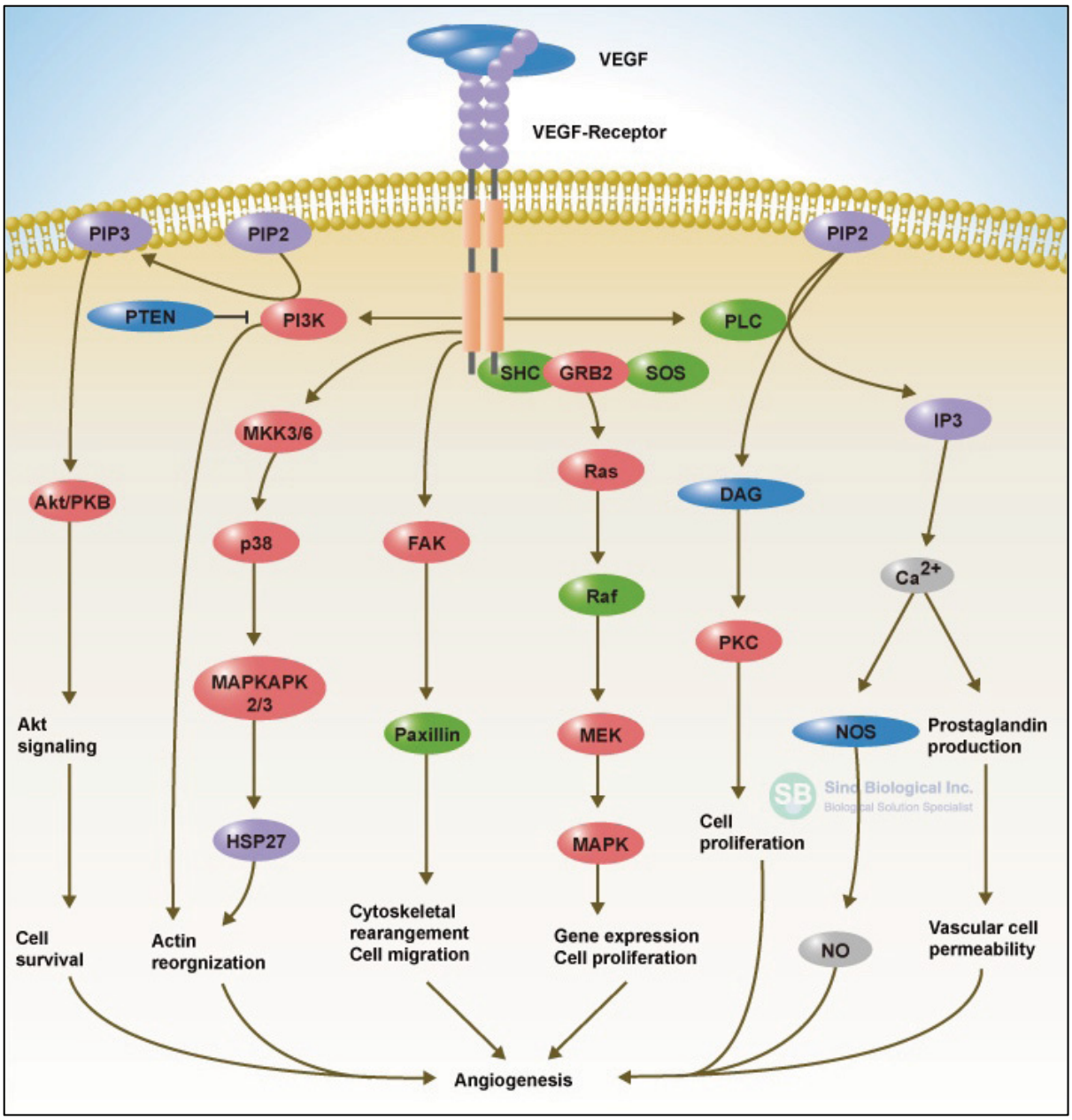



Figure 1.17 Voies de signalisation de VEGFR
Figure tirée de (Sino-Biological-Inc 2012)

*Combinaison CS/EGF/VEGF ?*

Les processus naturels tels que la guérison sont complexes et mettent en jeu différents types de cellules ainsi que de nombreux facteurs solubles permettant de guider ces cellules dans les différentes étapes (survie, migration, prolifération, production de MEC, etc.)(Bennett and Schultz 1993, Werner and Grose 2003). De plus, pour que les facteurs de croissance puissent être efficaces dans l'activation de leurs récepteurs respectifs, les cellules nécessitent souvent une activation préalable de leurs intégrines, récepteurs régulant d'adhésion, avec des molécules de la MEC (Schultz and Wysocki 2009).

Dans une démarche biomimétique, certaines études ont cherché à combiner plusieurs facteurs de croissance avec des molécules de la MEC pour se rapprocher des conditions physiologiques et ont observé une synergie des facteurs de croissance VEGF-FGF (Nillesen, Geutjes et al. 2007) et VEGF-b-FGF-EGF (Assal, Mie et al. 2013). Poursuivant cette même approche, une combinaison de CS avec EGF et VEGF pourrait associer les propriétés anti-apoptotiques de ces trois molécules avec les propriétés anti-thrombotiques de CS et présenter un potentiel de guérison important pour notre application. En particulier, puisqu'EGF et VEGF activent tous deux des voies de signalisation menant à la survie et à la prolifération cellulaire (ex. PI3K/Akt, ERK1/2), un effet additif ou synergétique pourrait être observé lorsque les deux facteurs sont co-immobilisés. À notre connaissance, la combinaison de ces deux facteurs de croissance a rarement été étudiée. Assal et al. ont démontré une amélioration de l'angiogénèse en présence d'une combinaison FGF-VEGF-EGF mais la combinaison binaire EGF-VEGF n'était pas incluse dans l'étude (Assal, Mie et al. 2013). Semino et al. ont pour leur part identifié l'influence de l'EGF dans la morphogénèse induite par l'activation de VEGFR, VEGF régulant la prolifération des HUVEC alors qu'EGF influence leur migration (Semino, Kamm et al. 2006). Une étude détaillée de la combinaison EGF/VEGF quant à la survie des cellules vasculaires permettrait donc d'approfondir les connaissances disponibles et pourrait être utile dans le contexte de la régénération tissulaire autour des EC.

*Les facteurs de croissance EGF et VEGF, tous deux impliqués dans le processus naturel de guérison, présentent des propriétés de choix pour l'élaboration de revêtements pour les implants vasculaires. En particulier, EGF présente des propriétés anti-apoptotiques envers les CMLV et les fibroblastes qui pourraient être avantageuses pour la création d'un revêtement pour la surface extérieure des endoprothèses couvertes. VEGF, quant à lui, pourrait être utilisé du fait de ses propriétés mitogènes et anti-apoptotiques envers les cellules endothéliales pour la création d'un revêtement sur la surface luminale des endoprothèses couvertes. De plus, la combinaison de ces deux facteurs de croissance pourrait apporter un effet synergique qui permettrait de se rapprocher des conditions physiologiques de la guérison.*

## 1.5 Travaux disponibles dans la littérature présentant des revêtements bioactifs basés sur des facteurs de croissance pour favoriser la guérison autour des EC

Il existe peu de travaux dans la littérature concernant la modification de surface des endoprothèses couvertes pour améliorer la guérison après réparation endovasculaire d'un anévrisme de l'aorte abdominale. Les travaux que nous avons recensés sont résumés dans la liste suivante:

- Deux études ont été publiées par le groupe de **van der Bas** (van der Bas, Quax et al. 2002, van der Bas, Quax et al. 2004). Le concept étudié est la modification d'un implant en Dacron (PET) avec un revêtement de collagène, d'héparine et de facteur de croissance des fibroblastes, le b-FGF. Le collagène est réticulé sur l'EC avec EDC/NHS puis de l'héparine est à son tour liée au collagène par la même chimie. Le facteur de croissance b-FGF est ensuite capturé grâce à son affinité pour l'héparine. L'étude décrit un relargage progressif de b-FGF pendant au moins 28 jours grâce à la capture par l'héparine.

Des tests de culture d'artères porcines et humaines *ex vivo* montrent que b-FGF ajouté en solution augmente la formation de néo-intima sur l'artère alors que VEGF ou PDGF n'induisent pas de formation de néo-intima. De la même façon, une néo-intima se forme à la

surface de morceaux de Dacron fonctionnalisé lorsque le b-FGF est présent dans revêtement collagène/héparine/b-FGF.
Des résultats *in vivo* obtenus dans un modèle porcin aortique et thoracique sans anévrisme montrent une augmentation de la formation de néo-intima à la surface de l'EC et un attachement EC bioactif à la paroi vasculaire dès 4 semaines.

- Le groupe **Tabata et Kusanagi** a également utilisé le relargage de b-FGF pour améliorer l'incorporation de l'EC dans le vaisseau (Tabata, Nagano et al. 1999, Kusanagi, Matsui et al. 2007). Dans ces études, un implant en polyester a été recouvert d'un hydrogel de gélatine réticulé avec du glutaraldéhyde puis imprégné de b-FGF. Des résultats *in vivo* dans un modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat montrent qu'après 15 jours, 95% du b-FGF a été libéré. Dans un modèle porcin d'implantation dans l'aorte sans anévrisme, toutes les EC (contrôles en polyester, hydrogel, ou hydrogel + b-FGF) étaient complètement recouvertes de néo-intima (coté paroi) et de tissu fibreux (coté luminal) et incorporées à la paroi du vaisseau. Cependant, l'épaisseur de nouveau tissu cellularisé (néo-intima) formé entre la paroi vasculaire et l'EC était plus élevée pour le groupe présentant du b-FGF.

Dans le même groupe, une étude de (Zhong, Matsui et al. 2009) a utilisé le même hydrogel de gélatine pour libérer un plasmide d'expression de la β-galactosidase. Des résultats d'essais *in vivo* chez le lapin par implantation dans l'aorte montrent le relargage rapide du plasmide le premier jour puis un déclin du relargage jusqu'à 7 jours. La transduction du gène a fonctionné, cependant l'apposition de l'EC sur le vaisseau s'est révélée inégale, ce qui a conduit à une transduction hétérogène dans les tissus de la paroi de l'aorte et d'une cinétique de relargage non optimale.

- Une étude du groupe **Kajimoto et al.** (Kajimoto, Shimono et al. 2008) présente un revêtement pour EC composé d'une couche d'élastine/ héparine et de b-FGF capturé par l'héparine. Des EC en ePTFE fonctionnalisées avec ce revêtement ont été testées *in vivo* dans modèle canin par implantation dans l'aorte sans anévrisme. Les résultats montrent qu'aucune des EC n'a migré. Les EC bioactives étaient fermement attachées au vaisseau et une néo-

intima recouvrait l'intérieur du EC au collet proximal, alors que les EC contrôles étaient faiblement attachées au vaisseau et qu'aucune néo-intima n'était présente à leurs collets. La prolifération de cellules dans l'épaisseur du ePTFE était 6 fois plus élevée dans le groupe bioactif que dans groupe contrôle.

Dans la même étude, un modèle canin avec implantation dans un anévrisme obtenu par ajout d'un patch veineux sur l'aorte a également été testé. Des trous avaient été percés dans la membrane d'ePTFE pour créer des endofuites de type III. Après 2 semaines, la fibrose dans l'anévrisme chez les animaux du groupe bioactif était environ deux fois plus élevée que dans le groupe contrôle. De plus, pour le groupe bioactif, la présence de CMLV ou de myofibroblastes, ainsi que de collagène mature a été observée dans la cavité anévrismale.

En conclusion, ces études ont démontré que les revêtements bioactifs basés sur le principe de libération progressive de b-FGF possèdent une bonne efficacité pour la création de néo-intima à la surface de l'EC. Cependant, deux points sont critiques:

- Sélectionné pour ses propriétés pro-prolifératives, le facteur de croissance a permis la création de néo intima dans des modèles de vaisseaux non athérosclérotiques et des modèles d'anévrisme par patch veineux. Pour se rapprocher de la situation clinique, l'effet d'un revêtement basé sur l'action du b-FGF devrait être étudié dans des vaisseaux reproduisant la pathophysiologie des AAA, en particulier le phénotype pro-apoptotique et la déplétion des CMLV;
- La libération progressive de facteur de croissance présente l'avantage de permettre au facteur de diffuser dans l'anévrisme et ainsi d'atteindre les tissus de la paroi anévrismale à distance de l'endoprothèse couverte. Cependant, la cinétique de dégradation du revêtement doit être optimisée pour assurer un effet durable, et la haute concentration en facteur de croissance nécessaire pour une libération durable pourrait induire un coût élevé pour l'EC.

*Peu d'études sont disponibles dans la littérature concernant le développement d'un revêtement bioactif qui favoriserait la guérison autour des EC. De plus, tous les revêtements qui ont été développés sont basés sur le b-FGF et ne prennent pas en compte le phénotype pro-apoptotique des CMLV dans l'anévrisme. Un revêtement ciblé pour la pathologie des AAA constituerait donc une avancée importante pour la prochaine génération d'EC.*

# CHAPITRE 2

## OBJECTIFS DU PROJET

Tel que discuté dans la revue de littérature, l'endoprothèse couverte idéale possèderait non seulement des propriétés mécaniques lui permettant d'être déployée sur le site de l'anévrisme par voie endovasculaire et de résister au flux sanguin, mais elle possèderait également la capacité de:

- Minimiser la formation de thrombus à la surface externe de l'implant pour permettre aux biomolécules immobilisées d'interagir avec les cellules;
- Favoriser l'adhésion, la croissance et la survie cellulaire en conditions pro-apoptotique pour favoriser une incorporation de l'implant dans les tissus et contrecarrer la déplétion cellulaire dans la paroi vasculaire au niveau des collets;
- Promouvoir la guérison vasculaire autour de l'endoprothèse couverte en favorisant la fibrose et la formation d'un tissu cellulaire organisé dans la cavité anévrismale.

***L'objectif général*** *de ce projet est de développer un revêtement bioactif pour améliorer la guérison vasculaire autour des endoprothèses couvertes sans nuire aux propriétés mécaniques des matériaux utilisés pour la structure de ces implants.*

***Hypothèse générale :*** *Un revêtement anti-apoptotique basé sur CS, EGF et potentiellement VEGF, permettrait une meilleure intégration de l'EC dans le vaisseau et ainsi une diminution des complications qui ont lieu post-implantation.*

**Objectif 1 :** Caractériser le potentiel d'un revêtement à base de chondroitine sulfate et d'EGF à induire un processus de guérison des tissus vasculaires lorsqu'il est déposé sur des matériaux réalistes grâce à une couche de polymère déposé par plasma riche en amines primaires (L-PPE:N). Cet objectif constitue la suite du projet initié dans le groupe du Pr Lerouge, puisque le revêtement conçu à base de CS et EGF par chimie covalente a généré *in vitro* des résultats très encourageants sur les cellules vasculaires de rat (Charbonneau, Liberelle et al. 2011).

Rapport-Gratuit.com

***Hypothèses à vérifier :***

- *Les propriétés anti-apoptotiques du revêtement CS+EGF s'appliquent aux cellules vasculaires humaines.*

- *La méthode de dépôt par plasma du L-PPE:N permet de transférer le revêtement bioactifs sur des substrats 3D en PTFE.*

- *Le revêtement CS+EGF permet d'améliorer la guérison tissulaire autour des implants et d'éliminer les endofuites.*

Pour répondre à ces hypothèses, les sous-objectifs seront les suivants:

1a. Évaluer le revêtement L-PPE:N+CS+EGF obtenu par greffage covalent pour l'amélioration de l'adhésion et la survie en milieu pro-apoptotique des cellules musculaires lisses et des fibroblastes humains sur des matériaux typiquement utilisés pour les endoprothèses couvertes (PET, PTFE).

1b. Évaluer les propriétés mécaniques des matériaux fonctionnalisés par le revêtement bioactif et s'assurer que la durabilité du revêtement est suffisante pour permettre la fabrication et la distribution du produit.

1c. Transférer le revêtement sur des substrats tubulaires 3D, les endoprothèses couvertes, et vérifier l'homogénéité du revêtement ainsi que sa résistance à la procédure d'implantation.

1c. Évaluer la guérison induite par le revêtement bioactif ainsi que sa capacité à éliminer les endofuites lors d'essais *in vivo* réalisés par implantation d'endoprothèses couvertes dans un modèle animal d'anévrisme de l'aorte abdominale.

**Objectif 2 :** Optimiser la bioactivité du revêtement CS+EGF en intégrant une immobilisation de type *'coiled-coil'* pour le facteur de croissance et analyser la potentielle synergie CS+EGF. Cette étape du projet intègre la technologie développée dans le groupe du Pr De Crescenzo au revêtement élaboré précédemment.

***Hypothèses à vérifier :***

- *L'utilisation de CS comme sous-couche de l'EGF apporte un avantage en terme de bioactivité comparé à d'autres polysaccharides aux propriétés antiadhésives.*

- *L'immobilisation orientée d'EGF sur CS permet d'augmenter sa bioactivité et de rendre le revêtement plus efficace que l'immobilisation covalente aléatoire.*

- *L'immobilisation orientée d'EGF offre une meilleure efficacité de capture et permet d'utiliser moins de facteur de croissance que l'immobilisation covalente.*

Pour vérifier la validité de ces hypothèses, nos sous-objectifs seront les suivants:

2a. Vérifier la faisabilité d'une immobilisation *'coiled-coil'* de l'EGF sur CS.

2b. Comparer la bioactivité d'EGF lorsqu'il est immobilisé sur CS ou sur un autre polysaccharide, le dextrane carboxyméthylé.

2c. Comparer le revêtement CS+EGF obtenu par immobilisation orientée et celui précédemment obtenu par greffage covalent en termes de réponse cellulaire.

**Objectif 3 :** Élaborer un revêtement qui allierait la bioactivité de deux facteurs de croissance - EGF et VEGF- à la faible thrombogénicité de CS.

***Hypothèses à vérifier :***

- *Le système 'coiled-coil' permet la co-immobilisation orientée et contrôlée d'EGF et VEGF sur CS.*

- *La co-immobilisation d'EGF et de VEGF ne nuit pas à leur bioactivité respective.*

- *La co-immobilisation d'EGF et de VEGF produit une synergie chez les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.*

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Pour tester ces hypothèses, nos sous-objectifs seront les suivants:

3a. Vérifier la faisabilité d'une co-immobilisation orientée d'EGF et VEGF sur CS.

3b. Caractériser les surfaces obtenues par incubation de différentes quantités d'EGF et de VEGF sur une surface de CS fonctionnalisée avec des peptides Kcoil.

3b. Évaluer la bioactivité d'un revêtement alliant CS, EGF et VEGF sur la survie les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

Les trois chapitres suivants présentent les travaux réalisés pour répondre à ces différents objectifs.

# CHAPITRE 3

# ÉVALUATION IN VITRO ET IN VIVO D'UN REVÊTEMENT BIOACTIF POUR ENDOPROTHÈSE COUVERTE BASÉ SUR LA CHONDROITINE SULFATE ET LE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME

Pauline Lequoy MSc,[a,b] Houman Savoji MSc,[a,c] Bachir Saoudi PhD,[a,c] Antony Bertrand-Grenier MSc,[a] Michael R. Wertheimer PhD,[c] Gregory De Crescenzo PhD,[d] Gilles Soulez MD MSc[a,e,f] and Sophie Lerouge PhD[a,b] *

[a] Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Montréal (Qc)

[b] Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure, Montréal (Qc)

[c] Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, Montréal (Qc)

[d] Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal (Qc)

e Department of Radiology, Radiation-Oncology and Nuclear Medicine, University of Montreal, Montréal (Qc)

f Department of Radiology, CHUM-Notre Dame, Montréal (Qc).

**Article soumis à la revue Journal of Journal of Vascular and Interventional Radiology en août 2015.**

## 3.1 Mise en contexte

Le but de ce premier article, intitulé en anglais '*In vitro and in vivo evaluation of a bioactive coating for stent-grafts based on chondroitin sulfate and epidermal growth factor'* est de répondre au 1er objectif spécifique de ce doctorat: 'Caractériser le potentiel d'un revêtement à base de chondroitine sulfate et d'EGF à induire un processus de guérison des tissus vasculaires lorsqu'il est déposé sur des matériaux réalistes grâce à une couche de polymère déposé par plasma riche en amines primaires (L-PPE:N).' Ce travail a été réalisé de façon majoritaire par P. Lequoy (design et réalisation des expériences, traitement des résultats, préparation des figures et du manuscrit) et se place dans la continuité des travaux de doctorat de Cindy Charbonneau (Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012).

Les travaux relatifs à cet article ont été présentés aux conférences World Biomaterials Congress (2012) et Society for Biomaterials Annual Meeting (2013).

## 3.2 ABSTRACT

***Purpose*:** To evaluate the potential of a bioactive coating based on chondroitin sulfate (CS) and tethered epidermal growth factor (EGF) for the improvement of healing around stent-grafts (SG).

***Methods*:** The impact of the bioactive coating, deposited on polyethylene terephtalate films (PET), on cell survival was tested *in vitro* on human vascular cells. After being transferred onto a more "realistic" material (expanded poly(tetrafluoroethylene), ePTFE), the durability and mechanical behaviour of the coating in addition to cell survival were studied. Preliminary *in vivo* testing was performed in a canine iliac aneurysm model reproducing type I endoleaks (3 animals, 6 aneurysms with 1 control and 1 contralateral bioactive SG).

***Results*:** The CS and EGF coatings significantly increased survival of human smooth muscle cells and fibroblasts, compared with bare PET or ePTFE ($p<0.05$). The coating also displayed good durability over 30 days according to ELISA and cell-survival tests. The tensile properties of ePTFE were not affected by the coating, allowing its transfer onto commercial SG for *in vivo* testing. According to CT-scan and macroscopic examinations, no difference was observed in endoleak persistence at three months, but the bioactive coating deposited on the abluminal surface of the SG (exposed to the vessel wall) increased the percentage of healed tissue in the aneurysm. Moreover, no adverse effect such as neointima formation or thrombosis was observed.

***Conclusion*:** The bioactive coating promoted *in vitro* cell survival, displayed good durability and was successfully transferred onto a commercial SG. Preliminary *in vivo* results suggest improved healing around bioactive SG, and they deserve further experimentation in a more realistic model of endovascular aneurysm repair.

## 3.3 INTRODUCTION

Biomaterials currently used in stent-grafts (SG) for the endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms (AAA), mainly polyethylene terephthalate (PET) and poly(tetrafluoroethylene) (PTFE), fail to stimulate cell growth and tissue healing (McArthur, Teodorescu et al. 2001, Szilagyi 2001, Major, Guidoin et al. 2006, Nutley, Guidoin et al. 2011). This is particularly true when they are deployed in the pro-apoptotic environment of a diseased aneurysmal vessel, which is characterized by changes in extracellular matrix composition, presence of inflammatory cells, vascular cell depletion, and lack of oxygen and nutrients after SG insertion (Wills, Thompson et al. 1996, Henderson, Gang et al. 1999). This at least partly explains the observed inadequate healing around SG after endovascular aneurysm repair (EVAR), that is, the lack of organized tissue formation in the cavity, and poor incorporation of the polymer graft into the surrounding wall of the blood vessel (Malina, Lindblad et al. 1998, Major, Guidoin et al. 2006). The deficit of tissue formation on the SG abluminal side could play a role in the occurrence of endoleaks and endotension that affect 10-30% of patients (van Beek, Legemate et al. , Zhou, Blay et al. 2014), and in SG migration observed in 16% of patients treated by SG (Litwinski, Donayre et al.). Presence of bare stent, hooks or barbs at proximal neck helps preventing SG migration by providing strong attachment to the vessel (Malina, Lindblad et al. 1998, Brunkwall 2008, Melas, Saratzis et al. 2010). However, their action is purely mechanical. They do not promote complete biological seal at proximal and distal necks and thus cannot prevent neck dilatation associated with delayed endoleak(Matsumura and Moore 1998, Cao, Verzini et al.).

Polymers such as PET and PTFE are generally chosen for SG due to their mechanical properties, stability, and hemocompatibility that limits thrombus formation on the luminal side. However, these polymers, more specifically PTFE, are unfavorable for cell growth or biological integration. Modification of PTFE surface properties has thus generated a growing interest. The decrease of surface hydrophobicity has been shown to improve cell adhesion and growth (Pu, Williams et al. 2002), while immobilization of biomolecules is an efficient mean to elicit more specific biological responses, such as the improvement of vascular grafts

endothelialization (Crombez, Chevallier et al. 2005, Chuang and Masters 2009). In the case of EVAR with SG, immobilization of biomolecules could be used to counter aneurysmal degeneration and promote healing around the abluminal side of the SG, thereby preventing late occurence of type I endoleaks and migration of SG.

In that endeavour, the general aim of our work has been to develop and test the effect of a bioactive coating that can counter the pro-apoptotic environment observed in the aneurysm sac while promoting colonization of the implant by VSMC and fibroblasts, two cell types responsible for extracellular matrix production and mechanical integrity of the vessel (Wills, Thompson et al. 1996).

To that purpose, two different bioactive molecules were selected: (i) chondroitin sulfate (CS), a glycosaminoglycan of the extracellular matrix that participates in the integrity of the arterial wall in normal aortas (Theocharis, Tsolakis et al. 1999, Theocharis, Theocharis et al. 2002) and exhibits anti-apoptotic properties (Raymond, Desormeaux et al. 2004); and (ii) epidermal growth factor (EGF), a major actor of wound-healing (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008) presenting both anti-apoptotic and pro-proliferative properties (Njieha and Shalaby 1992, Ying, Zhang et al. 2007). These molecules, when immobilized on 2D polymeric substrates were shown to decrease apoptosis and increase proliferation of rat VSMC (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). The primary objective of the present study was to demonstrate the potential of this coating to improve tissue growth at the SG external surface. This was first demonstrated in vitro on PET and expanded PTFE, and then in vivo on a canine iliac aneurysm model after creating the coating on the external surface of a PTFE-based commercial SG (Soulez, Lerouge et al. 2007). Secondary objectives were to analyze the durability of the coating and confirm the absence of impact on elastic properties of the SG, as a first step towards possible transfer onto commercial SG.

## 3.4 METHODS

### 3.4.1 Coating preparation

#### 3.4.1.1 L-PPE:N deposition

Before grafting CS and EGF covalently, primary amine ($NH_2$) groups were created on the polymer substrates (ePTFE and PET, see below) by means of a 100 nm-thick coating of ($NH_2$)-rich plasma polymer, here designated as LP, which was deposited using a low-pressure radiofrequency glow discharge reactor (Lerouge, Major et al. 2007).

#### 3.4.1.2 CS and EGF grafting

The immobilization of CS and EGF on LP surfaces was achieved through carbodiimide chemistry using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-Hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON).(Charbonneau, Ruiz et al. 2012) Surfaces were exposed to a 1% w/v chondroitin-4-sulfate (CS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) solution containing 40 % v/v ethanol, 50 mM MES, 22.8 mM EDC, and 4.6 mM NHS for 1h. After PBS and water rinsing, CS-modified surfaces were disinfected by immersion in 70% v/v ethanol for 5 min. Then, the carboxyl groups were activated by a solution containing the same concentration of ethanol, EDC and NHS as before. After rinsing, a 100 nM aqueous solution of recombinant human EGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ) was incubated on CS-modified surfaces for 1h.

### 3.4.2 Chemical and Mechanical Characterization

#### 3.4.2.1 Surface composition and morphology

Surface composition of the coating on ePTFE was characterized using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) broad-scan spectra, performed in a VG ESCALAB 3MkII instrument at 0° emission angles. Charging was corrected by referencing all peaks with respect to the

carbon ($C^{1s}$) peak at binding energy (285 eV). The wettability of the various coatings was assessed by static water contact angle (WCA) measurements with a VCA OptimaXE setup (AST products, Billerica, MA). Three measurements were taken on each sample, using Milli-Q water as the probe liquid (2 µL drop size). Scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-3600N) was used to evaluate whether coating deposition altered the surface morphology and porosity of the ePTFE substrate.

#### 3.4.2.2 E-modulus and tensile strength

Traction tests were used to determine Young's modulus (E) and tensile strength of ePTFE before and after coating deposition, using a Bose Electroforce 3200 system (Eden Prairie, MN) with a deformation rate of 5%/s.

### 3.4.3 Biological characterization

#### 3.4.3.1 Cell culture materials

Human aortic smooth muscle cells (AoSMC), human aortic adventitial fibroblasts (AoAF) and their respective complete growth media were purchased from Lonza (Walkersville, MD). For conditions designated as 'EGF solution', PET samples with LP/CS coatings were placed in contact with serum-free culture medium containing 10 ng/mL of EGF (renewed every 2 days). For all cell culture experiments, tissue culture polystyrene (TCPS) plates were used as controls (Corning Inc., Corning, NY).

#### 3.4.3.2 Cell survival on PET films

Cells were seeded on bare and coated PET films (50 µm thick, Goodfellow, Huntingdon, England), at 40 000 cells/ $cm^2$ in complete growth medium. 24h after initial cell seeding, the surfaces were washed with PBS and serum-free medium was added. At each time-point, cell metabolic activity was probed using the alamarBlue assay (Invitrogen, Burlington, ON). Cell

density and homogeneity were also evaluated via crystal violet staining, followed by image capture.

#### 3.4.3.3 AoSMC survival on ePTFE membranes

To assess cell survival on more realistic ePTFE membranes (100 µm thick, Zeus, Orangeburg, SC), direct counting of nuclei was performed. AoSMC were left to adhere on ePTFE discs for 24h. The surfaces were rinsed with PBS and serum-free medium was added. After 4 and 7 days, nuclei were stained.(Charbonneau, Ruiz et al. 2012) Three images were captured for each sample using fluorescence microscopy, and cells were counted on each image.

#### 3.4.3.4 Cell morphology on ePTFE membranes

After 7 days in serum-free medium, AoSMC seeded as described in the previous section were fixed in paraformaldehyde and stained.(Charbonneau, Liberelle et al. 2011) Specimens were then observed via confocal microscopy (Olympus FV1000MPE).

### 3.4.4 Durability of the coatings

The EGF surface density of LP/CS/EGF coatings on ePTFE was evaluated by direct ELISA immediately after preparation, or after 1 day, 1 week and 1 month under three different aging conditions (dry at room temperature (RT) or 4˚C; and in PBS at 37˚C) using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). The optical absorbance was measured at 630 nm to evaluate the bioactivity of the coating after aging, and cell survival experiments were performed after 1 month of aging under the conditions cited above.

### 3.4.5 Coating transfer onto stent-grafts

The bioactive LP/CS/EGF coating was created on commercial SG from Atrium Medical Corp., which consists of a tubular structure formed by two ePTFE layers encapsulating a

Rapport-Gratuit.com

stainless steel stent (Advanta V12, 6 mm diameter, 59 mm length, Atrium Medical Corp., Hudson, NH).

#### 3.4.5.1 Coating procedure on SG

Atrium SG were deployed using a balloon catheter, then inserted on top of a rotatable ceramic cylinder in the plasma deposition chamber. The coating was created as described above so as to obtain a uniform 150 nm coating thickness on the outer surface. CS and EGF were successively grafted by immersion in the solutions just prior SG implantation under a sterile hood. The SGs were disinfected by immersion in EtOH 70% v/v for 5 minutes between CS and EGF grafting. Coated and control SG were left to dry under s sterile hood and placed in sterile tubes for transportation to the operation room.

#### 3.4.5.2 Coating homogeneity and adhesion on SG

To ensure that adhesion of the coating on ePTFE was sufficient for *in vivo* insertion, the first steps of the endovascular procedure were simulated by dipping a coated SG in PBS for 5 min before inserting it through the valve of a catheter sheath (Hemaquet 8F, Medtronic). After passage through the valve, the coating was made visible by dipping the SG for 4 min into a 0.35 %w/v acid fuchsine in 33%v/v acetic acid solution.

### *3.4.6* *In vivo* implantation procedure

Preliminary *in vivo* testing of LP/CS/EGF coatings was performed in a canine bilateral iliac aneurysm model that reproduces persistent type I endoleaks after EVAR.(Soulez, Lerouge et al. 2007) All procedures were approved by the institutional animal committee, in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, and performed under general anesthesia. Three mongrel dogs weighing 25–30 kg were subjected to surgical construction of bilateral iliac aneurysms without collateral, using an autologous jugular vein patch.

After a recovery period of 8 weeks, the SG was inserted by a carotid approach under fluoroscopy, and expanded to 110% of the nominal arterial diameter (median 6 mm). In each

dog, a LP/CS/EGF-modified SG was randomly implanted in one aneurysm, a control (unmodified) SG being implanted in the contralateral aneurysm. On both sides, plastic deformation of the SG was created at its proximal end by inflating a 3.5 mm diameter Savvy balloon catheter (Cordis Corp.) alongside the SG.(Soulez, Lerouge et al. 2007) This formed a type I endoleak in all aneurysms, with inflow occurring through the misfit (~1–2 mm gap) at the proximal neck, as confirmed by angiography.

After 3 months, percutaneous transfemoral angiography (Koordinat 3D II, Siemens) and CT-scan (Sensation 64, Siemens) were performed to evaluate the presence and types of endoleaks. The dogs were then sacrificed by barbiturate overdose; the aneurysms were fixed in buffered formalin, freezed in liquid nitrogen, and cut into 5 mm-thick transverse sections (Exakt cutting system, Exakt Gmbh, Norderstedt, Germany) taking care to preserve the interface between the tissue and SG. On macroscopic sections, the sizes of areas corresponding to a leak, healed tissue, and fresh thrombus (clusters of coagulated blood showing absence or poor cell organization) were calculated after segmentation and expressed as a percentage of the total area. Some sections were sent for conventional histology after careful removal of SG metallic parts and stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS). Other sections were dehydrated, embedded in acrylic resin (Technovit 7200; Heraeus-Kulzer, Armonk, NY, USA), cut, and polished into 30 µm sections that were then stained with hematoxylin and eosin.

### 3.4.7 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation. Statistics were assessed by one-way ANOVA with Tukey's HSD post-hoc testing. For continuous variables measured in aneurysms implanted with active and control SGs, a paired student t-test with equal variances was used, p-values less than 0.05 being considered significant.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## 3.5 RESULTS

### 3.5.1 Human vascular cell adhesion and survival on coated PET surfaces

Cell adhesion and survival of AoSMC and AoAF on the different surfaces are presented in Figure 3.1 and 3.2. In Figure 3.1 a and Figure 3.2 a, signals are normalized to the initial metabolic activity observed on PET after adhesion (D0). The consistency of metabolic activity with the number of residual cells on the surface was confirmed by crystal violet staining (Figure 3.1 b and Figure 3.2 b).

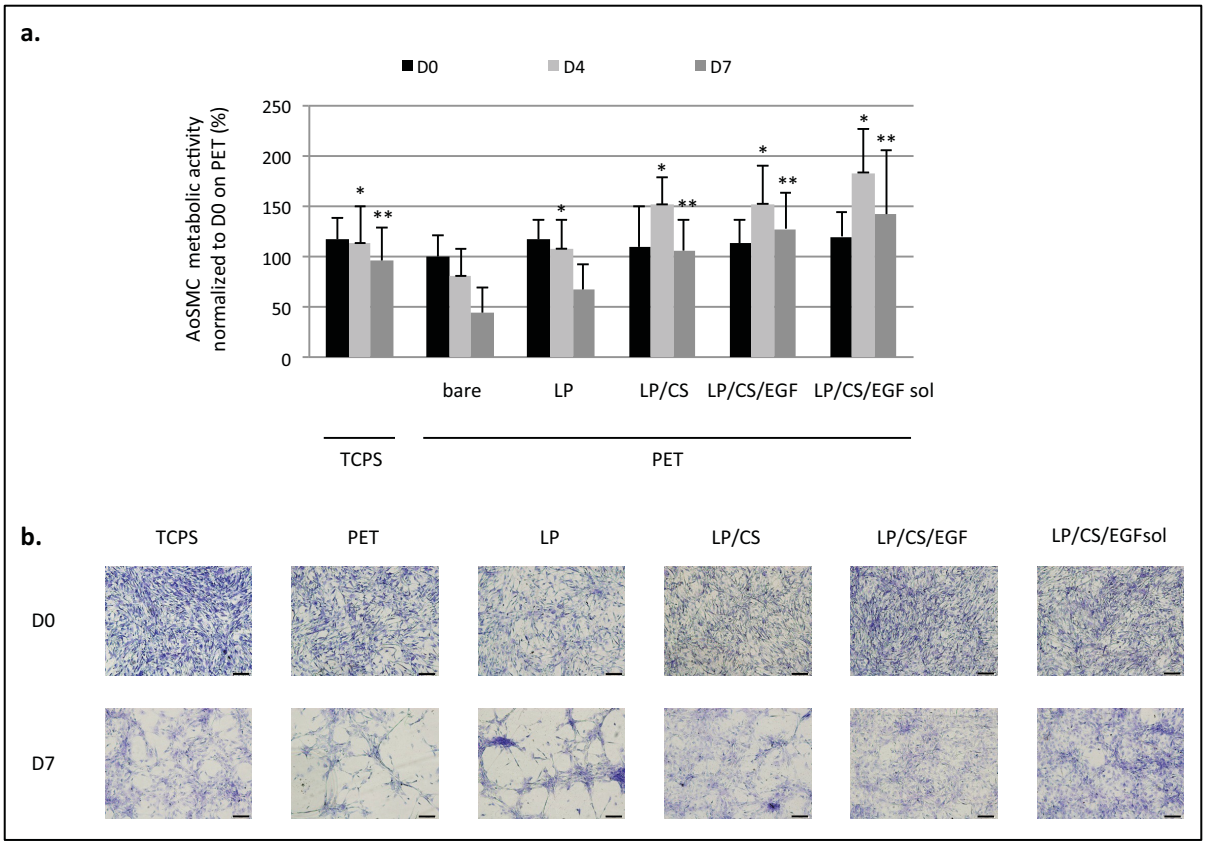



Figure 3.1 Human aortic smooth muscle cells adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by alamarBlue (a) and observed by cristal violet staining (b). Scale bars: 200µm. Statistical differences *, **: $p<0.05$ compared to PET at D4 and D7 respectively (n=12)

After a 24h-incubation period in complete medium, AoSMC were found to adhere on all surfaces in a similar fashion, considering both cell number and spreading (Figure 3.1), while a student t-test showed a significant increase in AoAF adhesion on coated surfaces (LP, LP/CS and LP/CS/EGF), compared with bare PET (P<.005) (Figure 3.2).

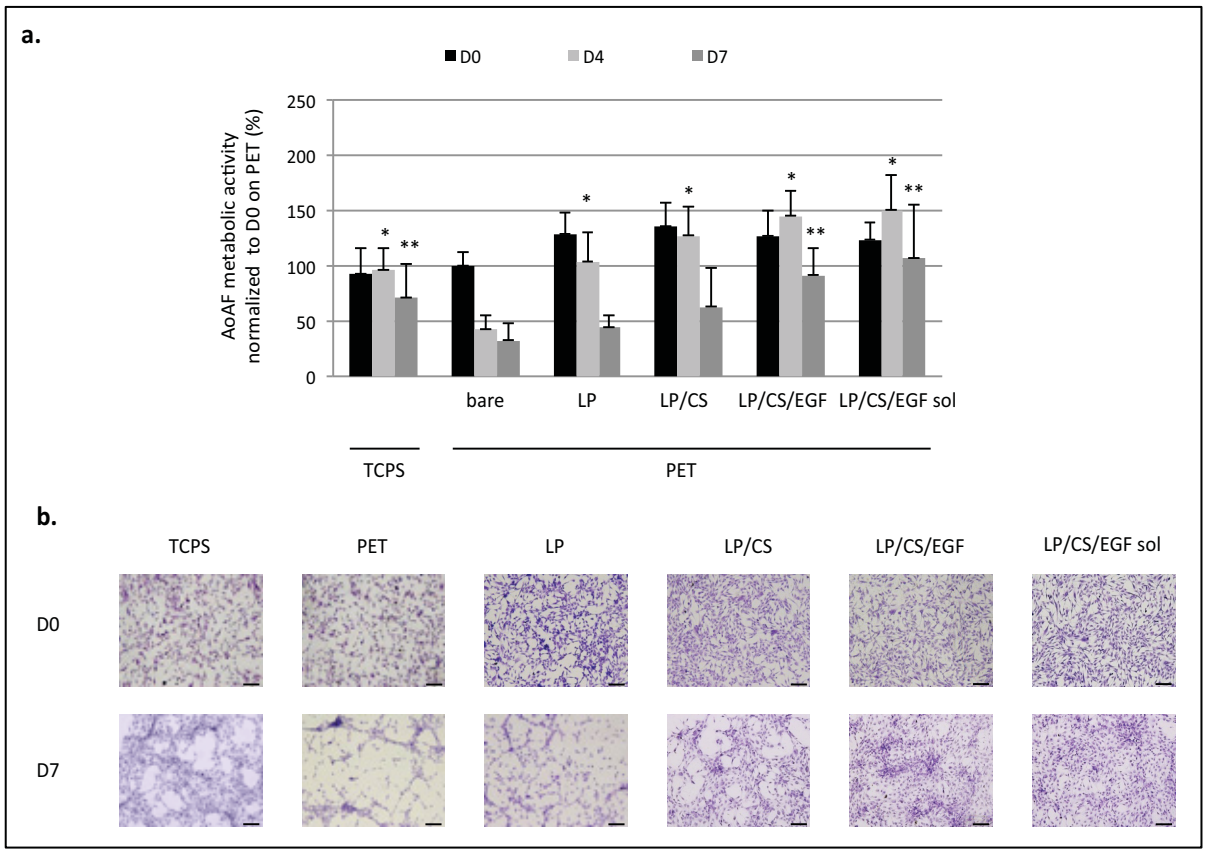



Figure 3.2 Human aortic fibroblasts adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by alamarBlue (a) and observed by cristal violet staining (b). Scale bars: 200µm. Statistical differences *, **: p<0.05 compared to PET at D4 and D7 respectively (n=12)

When subjected to serum-free medium, AoSMC and AoAF numbers drastically decreased with time on PET and LP, although it was less pronounced on LP at the first time point. In stark contrast, coating with LP/CS/EGF led to a significant increase in survival over 4 and 7 days of both AoSMC and AoAF, compared with bare PET (p<0.005). This effect was similar to that of 10 ng/ml EGF added in solution on cells adhered to PET/LP/CS surfaces. Of

interest, during the 7 days in serum-free medium, AoSMC and AoAF morphology and spreading on LP/CS/EGF remained comparable to those observed after 24h in complete growth medium (initial adhesion). In contrast, cell distribution on PET and LP changed over time, leading to stretched cell clusters after 7 days (Figure 3.1 b and Figure 3.2 b). LP/CS coating was also found to significantly improve AoSMC survival over 7 days, when compared with PET or LP ($p<0.05$) (Figure 3.1). However, it showed no effect on AoAF survival at day 7 (Figure 3.2).

### 3.5.2 Transfer onto PTFE substrates

#### 3.5.2.1 Physical and Chemical characterization

As expected, LP deposition on PTFE led to an increase in nitrogen content on the surface (Tableau 3.1) and to increased hydrophilicity, confirmed by a strong decrease of WCA (Tableau 3.2). The absence of fluorine in the XPS spectra after LP deposition confirmed that the LP layer was homogenous and thick enough to mask the underlying ePTFE substrate completely. CS immobilization on LP was also confirmed by XPS via increase in sulfur surface content and further decrease in WCA. SEM observations showed no damage or changes in porosity after applying the bioactive coatings, compared with bare ePTFE (Figure 3.3).

Tableau 3.1 Evolution of surface composition during coating creation measured by X-ray photoelectronic spectroscopy (XPS) on ePTFE (n=6). Average ± standard deviation. - : not observed

| | | C [at%] | N [at%] | O [at%] | F [at%] | S [at%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ePTFE | bare | 33 ± 5 | - | - | 67 ± 5 | - |
| | LP | 85 ± 1 | 11 ± 1 | 4 ± 1 | - | - |
| | LP/CS | 69 ± 1 | 11 ± 1 | 19 ± 1 | - | 0.8 ± 0.3 |
| | LP/CS/EGF | 71 ± 2 | 9 ± 5 | 19 ± 2 | - | 0.6 ± 0.2 |

Tableau 3.2 Sequential grafting steps of LP, CS and EGF on PTFE film monitored by water contact angle (n=9)

| | | WCA (˚) | Std |
|---|---|---|---|
| PTFE | bare | 116 | 2 |
| | LP | 85 | 4 |
| | LP/CS | 63 | 5 |
| | LP/CS/EGF | 64 | 9 |

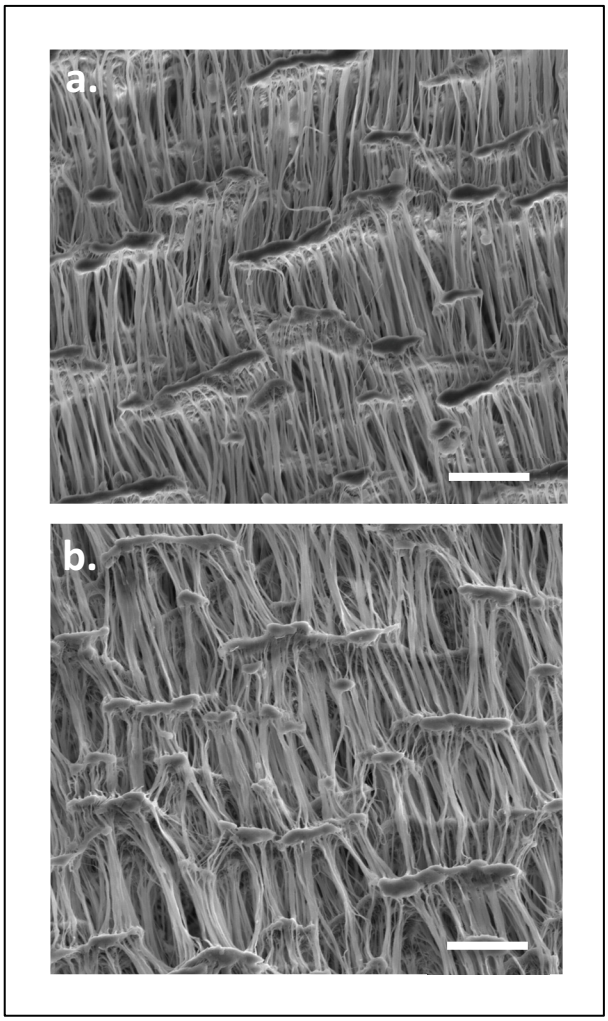



Figure 3.3 SEM images displaying the surface morphology of ePTFE before (a) and after bioactive coating creation (b)
Scale bars 25µm

Moreover, tensile tests demonstrated that the mechanical properties of ePTFE were conserved after LP deposition and successive biomolecule grafting steps (Figure 3.4). Unmodified ePTFE displayed E-modulus and tensile strength values of 66.2 ± 12.5 MPa and 14.6 ± 1.9 MPa, respectively. Comparable mechanical behavior was observed after LP deposition (63.3 ± 11.5 MPa and 13.8 ± 1.5 MPa), and after grafting of CS and EGF (67.1 ± 9.9 MPa and 14.8 ± 1.5 MPa).

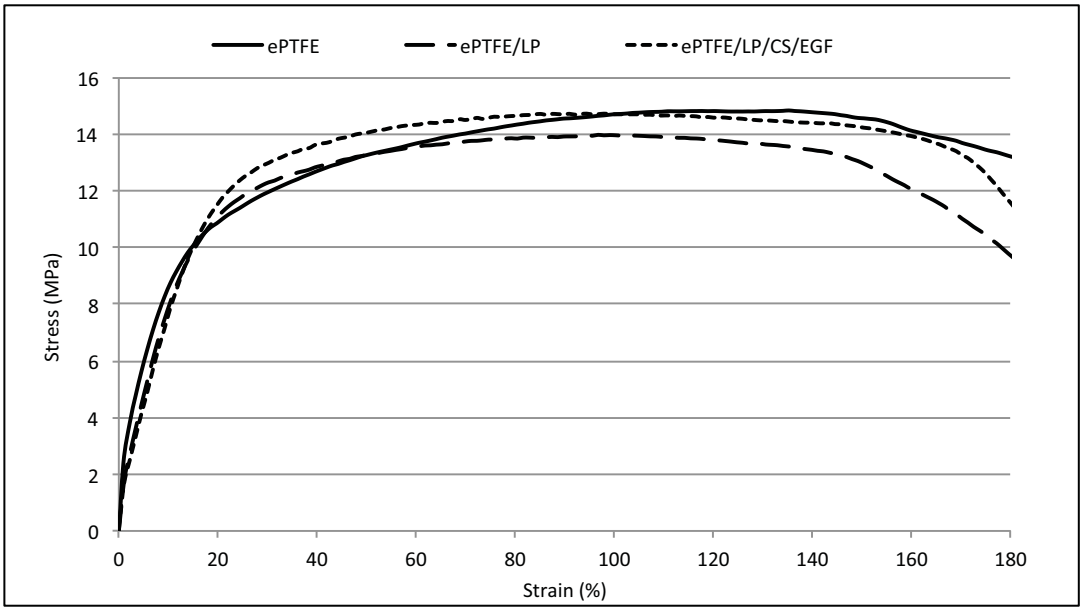



Figure 3.4 Stress-strain curve of ePTFE with and without the bioactive coating (average calculated with n=6 for each condition)

### 3.5.2.2 Coating adhesion and resistance to ePTFE SG deployment

Fuchsine acid staining (Figure 3.5) on a coated SG (either unaltered, or after passage through the valve) showed i) that the coating was homogeneous over the entire SG surface; and ii) that adhesion of the coating was sufficient to resist passage through the valve. Of interest, the coating was only present on the external surface of the SG, not on the lumen side (data not shown); an uncoated control SG presented no perceptible coloration.

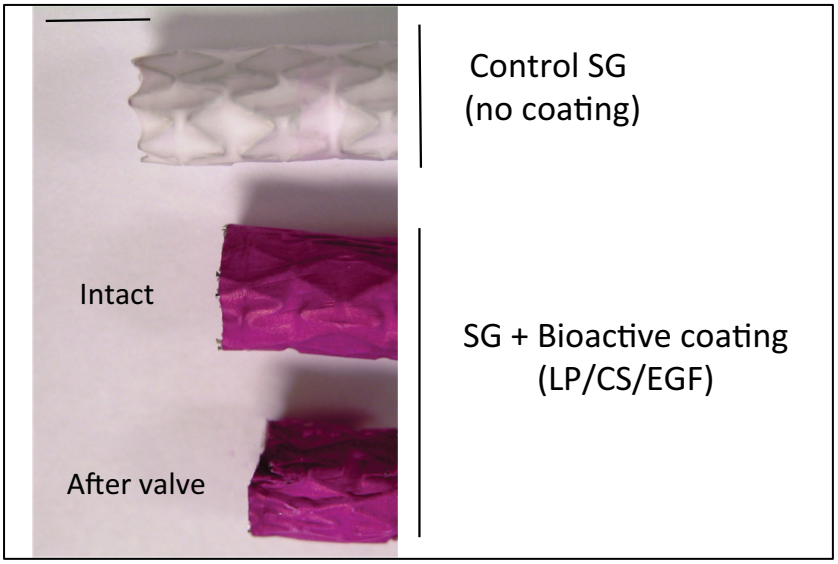



Figure 3.5 Adhesion of the coating after passage through an insertion valve. Coating is stained using fuchsine acid Scale bar: 5 mm

#### 3.5.2.3 Biological characterization

The adhesion and survival of AoSMC on modified ePTFE surfaces are presented in Figure 3.6, normalized to cell counts on bare ePTFE at day 0. After 24h-incubation in complete medium, AoSMC adhered equally on all surfaces except on bare ePTFE, where the adhesion was significantly lower ($p<0.05$, Figure 3.6). The number of cells after 4 and 7 days in serum-free medium was higher on LP/CS/EGF compared with bare ePTFE ($p<0.05$). Of interest, immobilized EGF on CS led to similar cell survival as EGF added in solution on LP/CS surfaces, with a constant cell number over 7 days. Simple coating by LP and LP/CS also improved cell survival compared with ePTFE, but this positive effect did not last over 7 days.

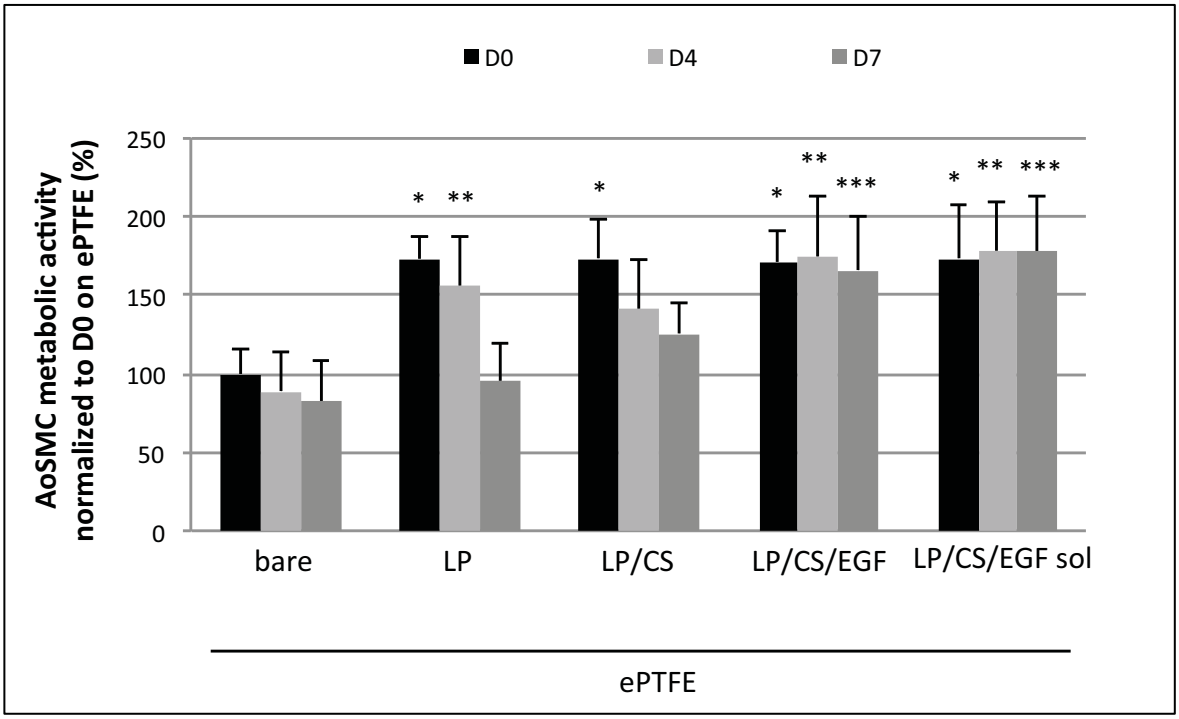



Figure 3.6 Human aortic smooth muscle cells adhesion (D0) and survival in serum free medium for 4 and 7 days (D4, D7) estimated by cell count after Hoescht 33342 staining. Cell counts are normalized to the cell count on ePTFE at D0 for each experiment. Statistical differences *, **,***: $p<0.05$ compared to bare ePTFE at D0, D4 and D7 respectively (n=12)

The cell morphology was drastically different on bare ePTFE compared with all other coated surfaces. The cells formed large clusters that favored cell-cell over cell-substrate interactions (Figure 3.7). This explains the stable number of cells on ePTFE, despite their evident lack of interaction with the hydrophobic surface. In contrast, cells were well spread and homogeneously distributed on coated surfaces.

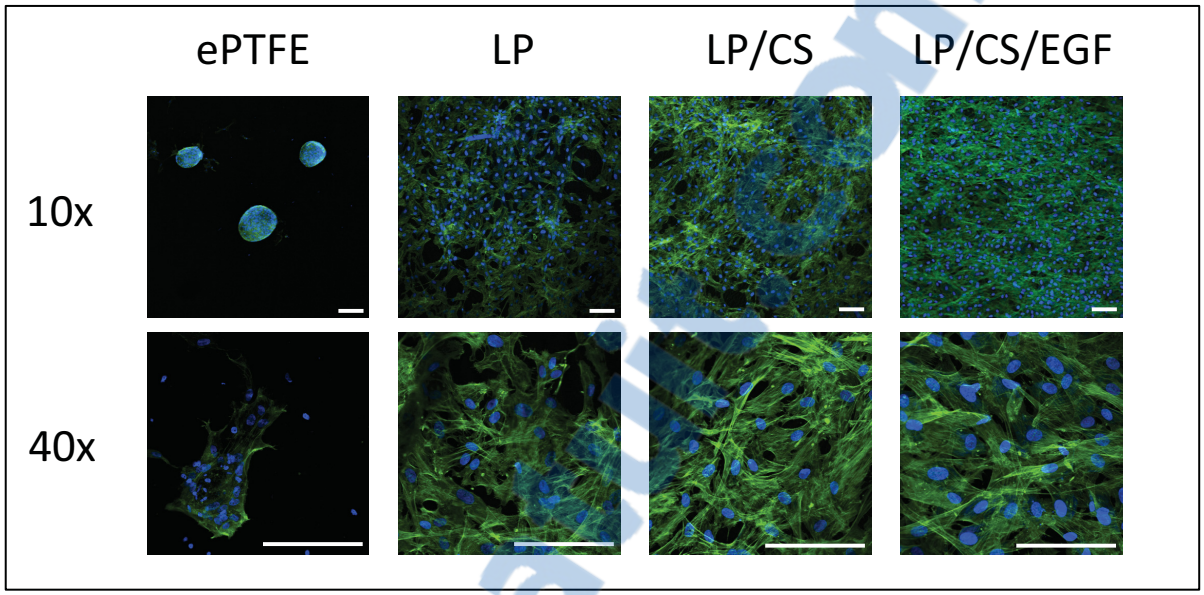



Figure 3.7 Confocal microscope images of human aortic smooth muscle cells after 7 days. Nuclei were stained with Hoescht 33342 (blue) and actin cytoskeletons with phalloidin-Alexa 488 (green). Scale bars: 150 µm. (n=4)

### 3.5.3 Stability of LP/CS/EGF coatings on ePTFE

Optical density corresponding to immobilized EGF detected by ELISA was found to remain stable over 1 month under all aging conditions, with 102 ± 18 %, 119 ± 42 % and 89 ± 20% of initial signal remaining after aging for 30 days respectively dry at room temperature, dry at 4°C or in PBS at 37°C. This indicated that the EGF was still attached to the surface and that the epitope of the EGF molecule that reacted with the EGF antibody was preserved. These conclusions were confirmed by cell survival results after 7 days in serum-free medium that were found to be comparable on both fresh and aged surfaces, namely 146 ± 55% after aging in air at RT; 155 ± 39% after aging at 4°C; and 165 ± 49% after aging in PBS at 37°C, compared with 166 ± 62% on fresh surfaces ($p>0.5$).

### 3.5.4 *In vivo* testing

No SG migration was observed, and all SG remained patent, as confirmed by CT-scan. However, endoleaks, characterized by empty areas lined by endothelial cells on histology

Rapport-Gratuit.com

slides and bright areas on contrast-enhancement CT-scan (Figure 3.8 and Figure 3.9 a), persisted in all aneurysms at three months.

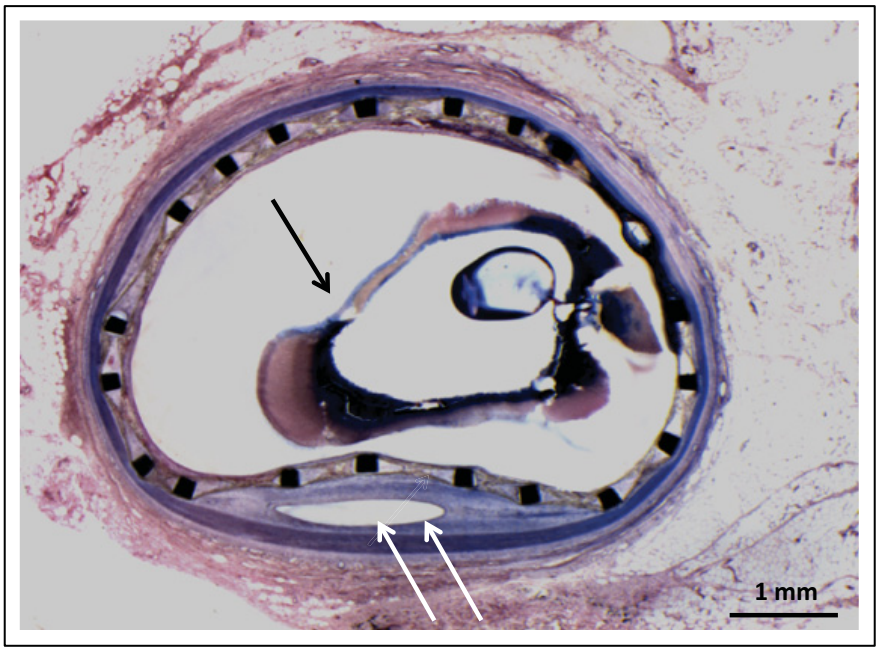



Figure 3.8 Exakt histological section (with hematoxylin and eosin staining) of an explanted stent graft showing the misfit created with a balloon catheter after implantation at the proximal neck to create a type I endoleak (double white arrow). Scale bar: 1mm. n.b some post-mortem intraluminal thrombus is present in the lumen (single black arrow)

Macroscopic sections of bioactive SG, and of their control counterparts, are shown in Figure 3.9 b. The portion of aneurysm corresponding to healed tissue was significantly higher in the presence of LP/CS/EGF coating (Figure 3.10, $p<0.02$), and portions consisting of leak or fresh thrombus were lower for those aneurysms that were treated with the bioactive SG. However, no definite conclusion should be drawn, since the number of samples was small (n=3) and results varied significantly from one animal to another.

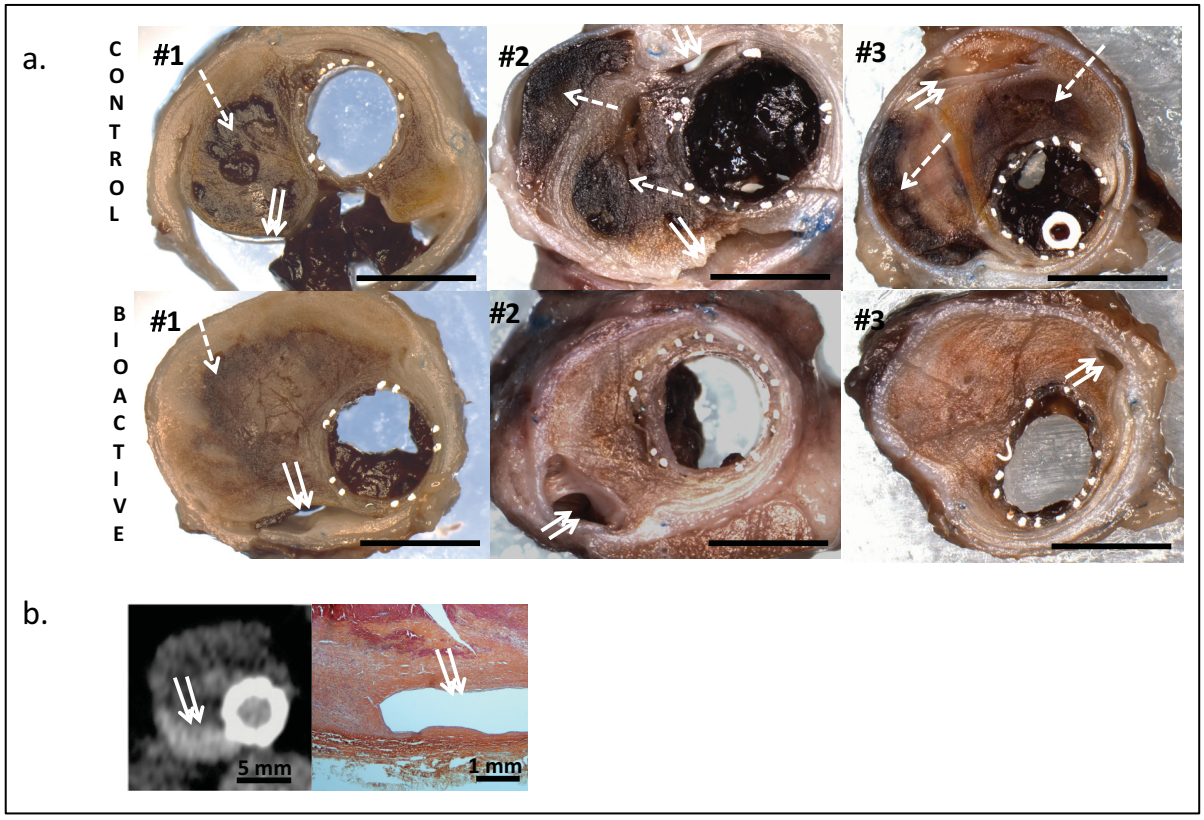



Figure 3.9 (a) Transverse tissue sections taken at the middle of aneurysms for each dog, with control (first row) or bioactive SG (second row). Leak are indicated by double arrows and fresh thrombus by single dotted arrows. Scale bars: 5 mm. *n.b. some post-mortem intraluminal thrombus is present in the lumen.* (b) Example of endoleaks from dog #1, bioactive SG, detected on CT Scan (left) and histological sections stained by HPS (right)

Of interest, observations of explanted SG did not show increased neointima hyperplasia or intraluminal thrombus on the lumen side of the bioactive SG compared with bare ePTFE SG. (measurement of intraluminal neo intima thickness at the proximal neck showed thickness <5% luminal diameter for all SG). This contrasts with other studies, where bioactive SG were found to have induced partial stenosis (Kusanagi, Matsui et al. 2007).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

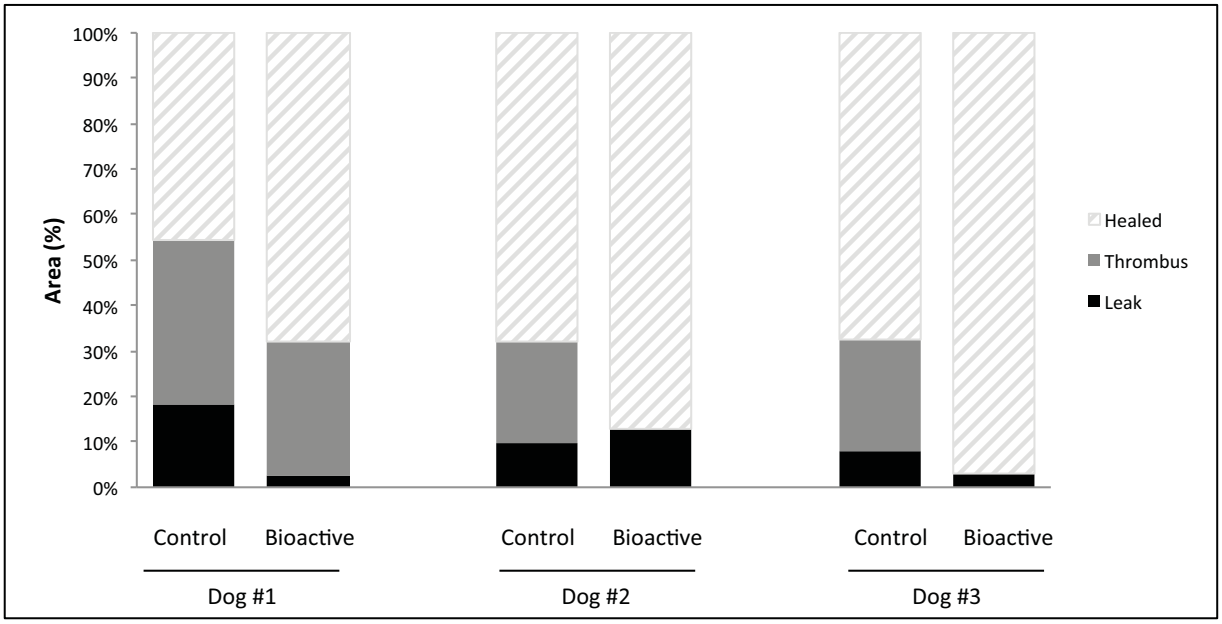



Figure 3.10 Maximal area (in percentage of the total aneurysm section) corresponding to leak and fresh thrombus for the 3 bioactive and 3 control stent-grafts

## 3.6 DISCUSSION

Recently, several devices have been developed to prevent endoleaks (including type I), using polymer-injectable structures that either provide on-site fitting at the proximal neck (Melas, Stavridis et al. 2015) or fill the whole cavity (Holden 2015). While these structures may allow better initial sealing and adaptation of the SG structure to the vessel anatomy, they do not protect from progression of aneurysmal degeneration at the necks and do not promote SG biological fixation into the vessel wall. Indeed, the external cover of those devices is made of PTFE, and the *in vitro* cell culture tests performed here confirmed once again that this polymer fail to promote the cell-surface interactions that are required to achieve adequate cell adhesion and survival in a pro-apoptotic environment such as AAA. PTFE displays very low surface energy and extreme hydrophobicity (Jie-Rong and Wakida 1997), and the near-complete lack of cell colonization observed *in vitro* (Fig. 3.6 and 3.7) illustrates the *in vivo* insufficient tissue ingrowth on ePTFE SG after EVAR (McArthur, Teodorescu et al. 2001).

To prevent late occurrence of endoleaks due to tissue degeneration at the aneurysm necks, it is crucial to achieve a sustained healing in the aneurysm sac and a durable biological sealing by favoring smooth muscle cell as well as fibroblast adhesion and survival on the external side of SG. Indeed, those two cell types play an important role in vascular remodeling following injury (Sartore, Chiavegato et al. 2001).

Physico-chemical surface modifications, alone, do not lead to targeted cell responses as opposed to modifications with biological factors (Shen, Hu et al. 2008). This was illustrated here, where the amine-rich polymer (LP) increased initial cell adhesion but was ineffective to achieve adequate cell survival (Fig. 3.1, 3.2 and 3.6). A coating with tailored bioactive properties is needed to prevent cell apoptosis in the SG landing zones, and possibly stop the disease progression at the aneurysm neck. Our approach has therefore been to immobilize pro-survival biomolecules, CS and EGF, on the external polymer surface of the SG.

*In vitro* results showed significant increase in the survival of both AoSMC and fibroblasts (Fig. 3.1 and 3.2). Interestingly and of considerable importance, the present coating maintained its bioactivity over a one-month aging period at various temperatures. The persistence of coating bioactivity is crucial to any clinical application, since a commercial bioactive SG will need to possess relatively long shelf life to accommodate inevitable delays between production and implantation.

To date, very few studies report *in vivo* tests of bioactive stent grafts based on growth factors. Our own preliminary *in vivo* results strongly suggest that our coating improves healing around the SG and minimizes the empty space in the cavity (Fig. 3.9 and 3.10), even though the number of animals in our present study was rather limited (n=3, with 2 aneurysms per animal). However, it did not lead to complete healing of the cavity or to total sealing, as initially created endoleaks persisted even with the coated SG.

These results therefore appear mitigated, but they may be explained by the type of model used in this study, probably not the most appropriate to test our hypothesis. The limitations of

our model are i) the creation of large endoleaks immediately after implantation; and ii) the absence of a pathological vessel in our vein-patch model.

Indeed, large endoleaks were created after SG implantation. The persistent flow into the cavity tended to impede the important interactions between the bioactive coating and cells of the surrounding vessel wall. For a potential clinical use of our bioactive SG, in cases presenting a deficient SG apposition, or late occurrence of type II endoleaks coming from collateral arteries, a concomitant strategy could be used, such as inflatable polymeric bags (Holden 2015) or injection of embolizing gels (Fatimi, Chabrot et al. 2012).

Additionally, the vein patch used in this study provides a geometrical aneurysm model, one with realistic flow conditions; however, this model is exempt of atherosclerosis, it displays normal ECM, without inflammation and VSMC depletion, unlike a real AAA (Henderson, Gang et al. 1999, Sakalihasan, Limet et al. 2005).

It is important to note that no consensus exists in the literature regarding an ideal *in vivo* model for investigating bioactivity of growth-factor-based coatings for SG. To our knowledge, none of the three groups that have so far worked on growth factor-based bioactive coatings for SG (van der Bas, Quax et al. 2004, Kusanagi, Matsui et al. 2007, Kajimoto, Shimono et al. 2008) has used a model that reproduced atherosclerosis and cell depletion.

To further evaluate the effect of our present anti-apoptotic bioactive coating on tissue healing after EVAR, our *in vivo* model should be adapted to mimic damage related to ECM and VSMC apoptosis, two key characteristics of AAA, and to suppress large type I endoleaks that have previously been created by deformation of the SG during implantation. To this end, aneurysms may be created using decellularized xenografts (Franck, Dai et al. 2013), elastase infusion, calcium chloride or angiotensin-II perfusion (Dobrin 1999, Moláček, Třeška et al. 2009, Trollope, Moxon et al. 2011).

## 3.7 CONCLUSION

A bioactive coating based on chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF) was deposited on the surface of polymers commonly used for stent grafts (PET, ePTFE). The presence of bioactive molecules from the coating increased the survival of human vascular smooth muscle cells and fibroblasts in *in vitro* pro-apoptotic conditions. The coating demonstrated appropriate mechanical properties and displayed good durability over at least 30 days. After being successfully transferred onto SG, preliminary *in vivo* testing indicated a positive effect on healing around the implant. Further *in vivo* testing is required in a model that may better reproduce the pathophysiology of aneurysm, including cell depletion and ECM degradation.

**Acknowledgments**

The authors thank Canadian Hospital Specialties (Oakville, ON) for according us special rates for Atrium Advanta V12 SG, Dr Marion Maire for the SEM images, Dr Nathalie Arbour for use of the Synergy 4 spectrophotometer, Dr Marie-Josee Hebert for use of the Leica DMLS microscope, the digital DFC420C camera and the Olympus FV1000MPE confocal microscope. We also gratefully acknowledge the participation of Hélène Héon (veterinarian), Michel Gouin (US image acquisition), and Jocelyne Lavoie (endovascular procedure and planning) during the animal studies.

**Sources of financial support/ conflict of interests**

- Study funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Canadian Institutes of Health Research (CPG-290367), and Fonds Recherche Santé-Québec (FRQ-S) (FRQ-S-ARQ-22951).

- Full scholarship from Fonds de recherche du Québec- Nature et Technologies (P.L., H.S.). Gilles Soulez holds a National Research Award funded by the FRQ-S.

# CHAPITRE 4

# EFFETS BÉNÉFIQUES ADDITIFS DE LA CHONDROITINE SULFATE ET DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ DE FAÇON ORIENTÉE POUR LA SURVIE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES

Pauline Lequoy[a], Benoît Liberelle[b], Gregory De Crescenzo[b] and Sophie Lerouge[a]

[a] Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Montréal (QC), Canada and Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ÉTS), Montréal (QC), Canada.

[b] Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal (QC), Canada.

**Article publié dans la revue Macromolecular Bioscience en mai 2014.**

## 4.1 Mise en contexte

Le but de ce second article, intitulé en anglais *'Additive Benefits of Chondroitin Sulfate and Oriented Tethered Epidermal Growth Factor for Vascular Smooth Muscle Cell Survival'* publié en 2014 dans la revue Macromolecular Bioscience (Volume 14, numéro 5, pp. 720-730) (Lequoy, Liberelle et al. 2014), est de répondre au 2ème objectif spécifique de ce doctorat: 'Optimiser la bioactivité du revêtement CS+EGF en intégrant une immobilisation coiled-coil pour le facteur de croissance, et analyser la possible synergie CS+EGF'. Cette étape du projet, réalisée de façon majoritaire par P. Lequoy (design et réalisation des expériences, traitement des résultats, préparation des figures et du manuscrit) intègre la technologie développée dans le groupe du Pr De Crescenzo au revêtement élaboré précédemment. Le bénéfice de CS est étudié en comparant la sous-couche de CS avec un autre polymère antiadhésif, le dextran carboxymethylé.

.

Les travaux relatifs à cet article ont été présentés aux conférences Society for Biomaterials Annual Meeting (2013) et Canadian Biomaterials Society Annual Meeting (2013).

## 4.2 Abstract

An anti-apoptotic coating for vascular applications combining chondroitin sulfate (CS) and coiled-coil-based tethering of epidermal growth factor (EGF), a key growth factor involved in wound healing, was designed. EGF quantification by ELISA showed that higher protein surface densities were reached using the oriented tethering strategy compared to the commonly used random covalent grafting, while using much lower concentrations of EGF during incubation. Vascular smooth muscle cell (VSMC) survival and resistance to apoptosis in serum-free conditions were significantly improved on CS surfaces exposing oriented EGF compared to random EGF. The comparison of CS and low-fouling carboxymethylated dextran as a sublayer for growth factors highlighted the tremendous benefit of CS thanks to its protein resistance and good cell adhesion properties. While this bioactive coating was specifically designed to promote healing around stent-grafts for endovascular aneurysms repair (EVAR), the approach undertaken can be tuned for other applications, e.g., by capturing other GFs through coiled-coil interactions.

**Keywords:** Biomaterials, chondroitin sulfate, EGF, oriented immobilization, VSMC survival.

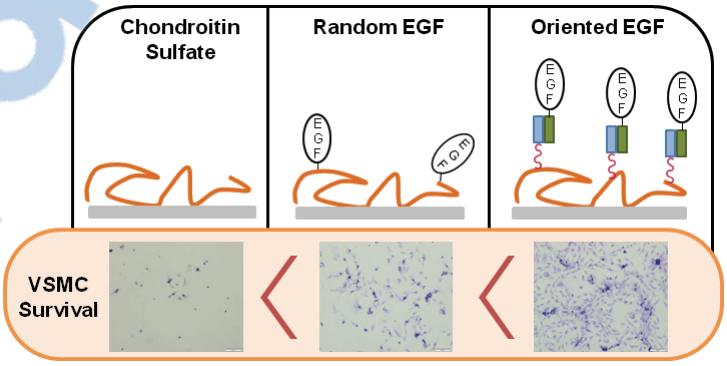



Figure 4.1 Graphical abstract

Rapport-Gratuit.com

## 4.3 Introduction

Bioactive coatings are increasingly used to overcome the limitations of conventional biomaterials possessing good mechanical properties but insufficient biocompatibility (Bogdanski, Esenwein et al. 2004, Rahmany and Van Dyke 2013). This is particularly true for PET and PTFE-based cardiovascular implants, such as stent-grafts (SG), employed for the endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms (AAA) (Parodi, Palmaz et al. 1991). While PET and PTFE surface properties appear adequate to avoid thrombosis on the luminal side of the SG, the lack of healing around the implant is a major factor leading to clinical complications (McArthur, Teodorescu et al. 2001, Szilagyi 2001, Major, Guidoin et al. 2006). This deficient healing is due to several concomitant factors: 1) the bio-inertness of PET and PTFE, 2) the pre-existent context of the aneurismal vessel, such as vascular smooth muscle cell (VSMC) depletion and pro-apoptotic phenotype (Bennett and Boyle 1998, Rowe, Stevens et al. 2000) as well as extracellular matrix (ECM) proteolytic degradation (Theocharis, Tsolakis et al. 1999, Choke, Cockerill et al. 2005), and 3) the deprivation of nutrients and oxygen once the SG excludes the aneurysm from blood flow.

Recently, we have developed a bioactive coating specifically designed to trigger adequate vascular cell response while counteracting the mechanisms occurring after SG insertion (Charbonneau, Gautrot et al. 2007, Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012). In order to favor vascular cell growth and resistance to apoptosis around the SG, we proposed to combine two biomolecules, i.e. chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF). CS, a glycosaminoglycan naturally encountered in blood vessels, has demonstrated anti-apoptotic properties through ERK1/2 phosphorylation and enhanced Bcl-xl expression in rat and human VSMC (Raymond, Desormeaux et al. 2004) as well as in fibroblasts (Laplante, Raymond et al. 2005). This widely available glycosaminoglycan has also been shown to favor wound healing by improving cell migration, increasing fibronectin synthesis and promoting fibroblast proliferation (Hinek, Boyle et al. 1992, Zou, Jiang et al. 2009). EGF is one of the key growth factors involved in wound healing (Buckley, Davidson et al. 1985, Barrientos, Stojadinovic et al. 2008) and is known to promote VSMC

proliferation (Major and Keiser 1997, Kaiura, Itoh et al. 2000, Upchurch 2005). Of interest, activation of EGF cell receptors also initiates specific anti-apoptotic signals, by activation of PI3K/AKT, RAS/ERK and JAK/STAT pathways, leading to an increased release of anti-apoptotic proteins and a decreased release of pro-apoptotic proteins (Henson and Gibson 2006, Ying, Zhang et al. 2007, Soulez, Sirois et al. 2010). When an EGF layer was covalently grafted on CS via carbodiimide chemistry, the resulting coating was found to possess anti-apoptotic and pro-proliferative properties for rat aortic VSMC (Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012).

However, random covalent EGF coupling can negatively impact protein bioactivity due to inappropriate orientation and/or epitope inactivation, thus preventing optimal interactions with cells (Kuhl and Griffith-Cima 1996, Liberelle, Boucher et al. 2010). We hypothesized that the bioactivity of a coating including CS and EGF could be further enhanced by the use of oriented EGF immobilization. In that purpose, our group recently developed an innovative oriented immobilization strategy for growth factors based on two high affinity peptides, namely Ecoil and Kcoil, that heterodimerize with high specificity and affinity (Boucher, St-Laurent et al. 2008). Ecoil-tagged epidermal growth factor (Ecoil-EGF) was produced in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and its bioactivity was confirmed on human epidermoid carcinoma (A-431) and human corneal epithelial (HCE-2) cell lines (Boucher, Ruiz et al. 2010, Liberelle, Boucher et al. 2010). Here, we show that EGF can be immobilized on CS via a coiled-coil strategy (Figure 4.2), with large benefits compared to random immobilization in terms of protein surface density and bioactivity, as assessed by direct ELISA, VSMC survival and resistance to apoptosis in a serum-deprived environment. Moreover, to demonstrate the benefit of CS in this bioactive coating, we studied in parallel the bioactivity of EGF immobilized on CS coatings and on another commonly-used protein resistant polysaccharide, i.e., carboxymethylated dextran (CMD) (Liberelle, Merzouki et al. 2013).

This work was achieved using aminated microplates for protein quantification and cell culture tests as a model for vascular implant materials, knowing that primary amine groups

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

can readily be created on PET and PTFE via plasma polymerization, plasma functionalization or aminolysis (Kang, Tan et al. 1996, Bech, Meylheuc et al. 2007, Lerouge, Major et al. 2007, Noel, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012), and that the strategy could later be easily transferred to realistic biomaterial surfaces.

## 4.4 Materials and methods

### 4.4.1 Materials and reagents

Native silicon wafers (Prime Si P/Boron) were obtained from University Wafer (South Boston, MA). Anhydrous 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, 99% purity), acetic acid (99.7% purity), cysteine (99+% purity), glutaric anhydride (95% purity), sodium chloride (99.99% purity), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (modified PBS, without calcium chloride and magnesium chloride), Tween 20 and cysteine (99+% purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). EMCH (3,3´-N-[e-maleimidocaproic acid] hydrazide, trifluoroacetic acid salt) was purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Commercially available DuoSet ELISA kit containing mouse anti-human EGF antibody (capture antibody), biotinylated goat anti-human EGF antibody (detection antibody), streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP), bovine serum albumin (BSA), substrate solution (hydrogen peroxide/tetramethylbenzidine) and untagged recombinant human EGF were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

### 4.4.2 Kcoil and Ecoil-tagged EGF Production

Cysteine-tagged Kcoil peptides (Boucher, St-Laurent et al. 2008) were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO). Ecoil-tagged EGF (Ecoil-EGF) was produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as previously described (Boucher, St-Laurent et al. 2008). Protein concentration was determined by ELISA. Purified Ecoil-EGF was stored at -80°C until use.

### 4.4.3 CS, CMD and EGF Immobilization

#### 4.4.3.1 Surface and Polymer Preparation

Aminated silicon surfaces and microplates were used for chemical grafting characterization and cell culture assays, respectively. Amino groups were created on silicon wafer surfaces (1×1 cm) via an APTES-based silanization procedure (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Aminated microplates (96-well Clear Polystyrene Amine Surface Stripwell Microplate, Corning Inc.) were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON). For cell culture experiments, microplates were disinfected by exposure to 70% EtOH for 5 min before EGF or Ecoil-EGF immobilization. Carboxymethylated dextran (CMD) chains were generated from commercially available dextran (Pharmacosmos, Holbaek, Denmark) by adapting previously reported protocols (Liberelle, Boucher et al. 2010). Under our experimental conditions, the carboxymethylation degree of the dextran chains (500 kDa) was 55%. Chondroitin-4-sulfate (CS) was purchased from Sigma–Aldrich (Oakville, ON). Lyophilized CMD and CS powders were stored at 4°C until use.

#### 4.4.3.2 Polymer Grafting on Aminated Silicon Surfaces and Aminated Microplates

CMD and CS were covalently attached onto amino-coated surfaces using water-soluble carbodiimide chemistry, according to previously reported protocols (Liberelle, Boucher et al. 2010, Charbonneau, Ruiz et al. 2012). CMD solution was prepared in Milli-Q water (2 mg/mL). Once dissolved, CMD was activated by preparation of a solution containing (for 1 mL): 100 µL of 0.4 M EDC in Milli-Q water and 100 µL of 0.1 M NHS to 800 µl of CMD solution (Liberelle, Boucher et al. 2010). CS was dissolved in Milli-Q water at 0.1 g/mL, and the resulting solution was filtered (0.2 µm PTFE filter) to remove aggregates. CS was then activated by preparing a solution containing (for 1 mL): 400 µL of EtOH 100%, 347 µL of Milli-Q water, 50 µL of 1 M MES, 57 µL of 0.4 M EDC, 46 µL of 0.1 M NHS, and 100 µL of CS solution (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). The NHS-activated polymer solutions were reacted with the aminated surfaces (150 µL/cm2) and microplates (100 µL/well) for 1h. The

surfaces and the wells were finally rinsed once using PBS (10 mM, pH 7.4) and two times using Milli-Q water for 2 min in an ultrasonic bath.

#### 4.4.3.3 EGF Covalent Immobilization on CMD- and CS-coated surfaces

The CMD-coated surfaces were activated with 100 µL of a solution containing (for 1 mL): 500 µl of 0.4 M EDC and 500 µl of 0.1 M NHS for 15 min (Liberelle, Boucher et al. 2010) and the CS-coated surfaces were activated with 100 µL of the following solution (for 1 mL): 400 µL of 100% EtOH, 497 µL of Milli-Q water, 57 µL of 400 nM EDC, 46 µL of 100 nM NHS (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). The surfaces were rinsed with Milli-Q water. NHS-activated polymer surfaces were then exposed to 100 µL of untagged EGF (in 10 mM PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween 20, PBS-T) for 1 h. Finally, the surfaces were rinsed with PBS and Milli-Q water.

#### 4.4.3.4 Ecoil-Tagged EGF Capture on Kcoil Layers

A Kcoil layer was generated on CMD or CS-covered surfaces using EMCH linker, which possesses an amine group at one end and a maleimide group at the other end. CMD and CS carboxylic groups were activated using NHS/EDC-based chemistry as described in section **2.3.3.** The NHS-activated polymer layers were then reacted with the amine group of EMCH, i.e. 100 µL of 1 mM (0.41 mg/mL) EMCH in PBS:DMSO (90:10 v/v) was deposited on each surface for 30 min. The surfaces were rinsed using PBS and Milli-Q water. Deactivation of remaining polymer COONHS groups was obtained with 100 µL ethanolamine solution (1 M, pH 7.0) for 15 min, followed by rinsing with PBS and Milli-Q water. Thiol-reactive surfaces were then reacted with 100 µL of 10 µM cysteine-tagged Kcoil in Milli-Q water for 1 h. The surfaces were rinsed using PBS and Milli-Q water. Unreacted sites of EMCH were blocked using 100 µL of 50 mM cysteine solution (1 M NaCl in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0) followed by rinsing with PBS and Milli-Q water. Surfaces harboring covalently bound Kcoil were incubated with 100 µL of Ecoil-EGF solution (in 10 mM PBS pH 7.4 containing 1% BSA, PBS-BSA) for 1 h. After the Ecoil-EGF capture, the wells and the surfaces were rinsed

using PBS. When needed, Ecoil-EGF was detached by soaking the Ecoil-EGF-covered surfaces in a 5 M guanidium hydrochloride solution (Gnd-HCl), followed by rinsing with PBS and Milli-Q water.

### 4.4.4 Physical and chemical characterization

#### 4.4.4.1 Ellipsometry

Dry thickness of grafted layers on APTES-coated silicon wafers was measured using an automatic M2000 ellipsometer (J.A. Woollam, Lincoln, NE) equipped with data acquisition software (Complete EASE). The measurements were performed with a 75° angle of incidence and data were acquired within a wavelength range of 245-1650 nm. A refractive index of n = 1.465 was used for the measurements of APTES, CS, Kcoil and Ecoil-EGF layers (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). The dry thickness of each layer was obtained using the WVase 32 analysis software package and defined as the difference between the APTES-coated silicon wafers and the CS-, Kcoil- and Ecoil-EGF-coated wafers. Three measurements were taken on each surface and the experiment was repeated at least twice.

#### 4.4.4.2 Water contact angle

Wettability of the coatings was measured through static contact angle with a FTA200 goniometer (First Ten Ångstroms, Portsmouth, VA) equipped with a data analysis software package (FTA32 Video). Three measurements were taken on each surface using Milli-Q water as probe liquid and the experiment was repeated at least twice.

#### 4.4.4.3 Surface EGF quantification by ELISA

Quantification of EGF surface densities in the wells was performed by direct ELISA. The wells were first incubated with 100 µL of a biotinylated anti-human EGF antibody (50 ng/mL in PBS-BSA) for 30 min. The wells were washed 3 times with PBS-T and 100 µL of a streptavidin-HRP solution (diluted 200 times in PBS-BSA) was added to the wells for 20

min. Finally, the wells were rinsed 3 times with PBS-T and reacted with 100 µL of the substrate solution (mixture of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine). The optical density (OD) at 630 nm was measured using an ELISA plate reader (Victor $^{3}$V Multilabel Counter, PerkinElmer, Woodbridge, ON). The slopes corresponding to the OD variation in the wells over time, were compared to those obtained with known concentrations of EGF.

### 4.4.5 Cellular assays

#### 4.4.5.1 Cell culture materials

Vascular smooth muscle cells (VSMC) from rat embryonic thoracic aorta (a7r5 cell line, ATCC, Manassas, VA) were cultured under 15 passages in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham's Media (DMEM/F12; Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Medicorp, Montreal, QC). DMEM/F12 supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Pen-Strep; Invitrogen, Burlington, ON) was used as serum-free medium in survival and apoptosis experiments. Tissue culture-treated polystyrene (PS) 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY) were used as a positive control.

#### 4.4.5.2 Cell survival in serum-free medium

VSMCs were seeded at 20 000 cells/well in microplate wells and incubated on each surface at 37°C and 5% CO2 in 200 µL of complete growth medium (DMEM/F12 + 10% FBS and 1% Pen-Strep). After a 24h adhesion period, the surfaces were rinsed with PBS to detach non-adherent cells; and serum-free medium was added (200 µL/well) and changed every two days. For conditions designated as 'soluble EGF', 10 ng/mL of EGF was supplemented in the culture medium (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Cell metabolic activity was probed using the alamarBlue assay (Invitrogen, Burlington, ON). Once rinsed with 200 µL of PBS, the wells were exposed to alamarBlue added to the culture medium (10% v/v) for 4h. AlamarBlue fluorescence signal was read using a spectrophotometer (560 and 590 nm, for excitation and emission wavelengths, respectively). Cell density and homogeneity on the

well surfaces were evaluated via crystal violet staining (Fisher Scientific, Ottawa, ON), i.e. cells were incubated in a crystal violet solution (0.075% w/v in 3% v/v acetic acid solution) for 15 min, rinsed 3 times with Milli-Q water and air-dried prior to capture (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON). At least three samples per conditions were used and each experiment was performed in duplicate.

#### 4.4.5.3 Cell apoptosis

VSMCs were seeded at 20 000 cells/well in microplate wells and incubated on each surface at 37°C and 5% CO2 in 200 µL of complete growth medium (DMEM/F12 + 10% FBS and 1% Pen-Strep). After an 8h adhesion period, half of the plate was exposed to complete growth medium for 14h (positive control), while the other half-plate was exposed to serum-free medium for 14h to induce apoptosis. To be noted, several time points were tested for serum-free medium exposure but 14h was selected as the shortest time point at which statistical differences in apoptotic cell numbers were observed with a comparable total number of cells on the surfaces. Resistance to apoptosis in serum-free conditions was assessed by a Hoescht 33342 (HT)/propidium iodide (PI) staining test (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Briefly 1 µg/mL of HT (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and 5 µg/mL PI (Invitrogen, Burlington, ON) were directly incorporated into the medium of each well. Images were captured after a 5-min incubation time using fluorescence microscopy (excitation filter of 360–425 nm). At least three samples per condition were used and each experiment was performed in duplicate.

### 4.4.6 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation ($n \geq 3$). Statistical analysis was carried out using independent two-sample t-test with equal variances. A p-value lower than 0.05 was considered significant for all tests.

## 4.5 Results

### 4.5.1 Characterization of oriented EGF immobilization on CS via coiled-coil interaction

Grafting steps for the oriented immobilization of EGF on CS-coated silicon wafers (Figure 4.2) were characterized using ellipsometric dry thickness (Figure 4.3) and water contact angle measurements, as previously reported for the random EGF grafting on CS and CMD polymers as well as for the oriented EGF immobilization on CMD (Liberelle, Boucher et al. 2010, Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Amino groups were created on silicon wafers via an APTES-based silanization procedure. The APTES layer was found to be thick, homogeneous and relatively hydrophobic, showing a water contact angle of 70.7 ± 2.8° and an ellipsometric thickness of 4.75 ± 0.16 nm (condition **a** on Figure 4.3, to be compared to native silicon wafers, i.e. 0 nm and 0°). Grafting of the hydrophilic CS layer via carbodiimide chemistry induced a decrease in contact angle, i.e. 51.1 ± 3.4° and an increase in dry thickness of 0.37 nm (condition **b**) compared to the APTES layer (condition **a**). Following CS immobilization, contact angle remained stable throughout the rest of the grafting process (data not shown). Immobilization of EMCH linker on CS was followed by Kcoil grafting by reaction of EMCH maleimide groups with the thiol terminal group of Kcoil peptide (+0.10 nm, condition **c**). The reversibility of the E/K coiled-coil interaction was demonstrated in two steps: first, the capture of Ecoil-EGF by incubation of a 600 nM-solution (in 10 mM PBS, pH 7.4) on Kcoil-functionalized surfaces, then the detachment of Ecoil-EGF thanks to a chaotropic agent (5 M Gnd-HCl).

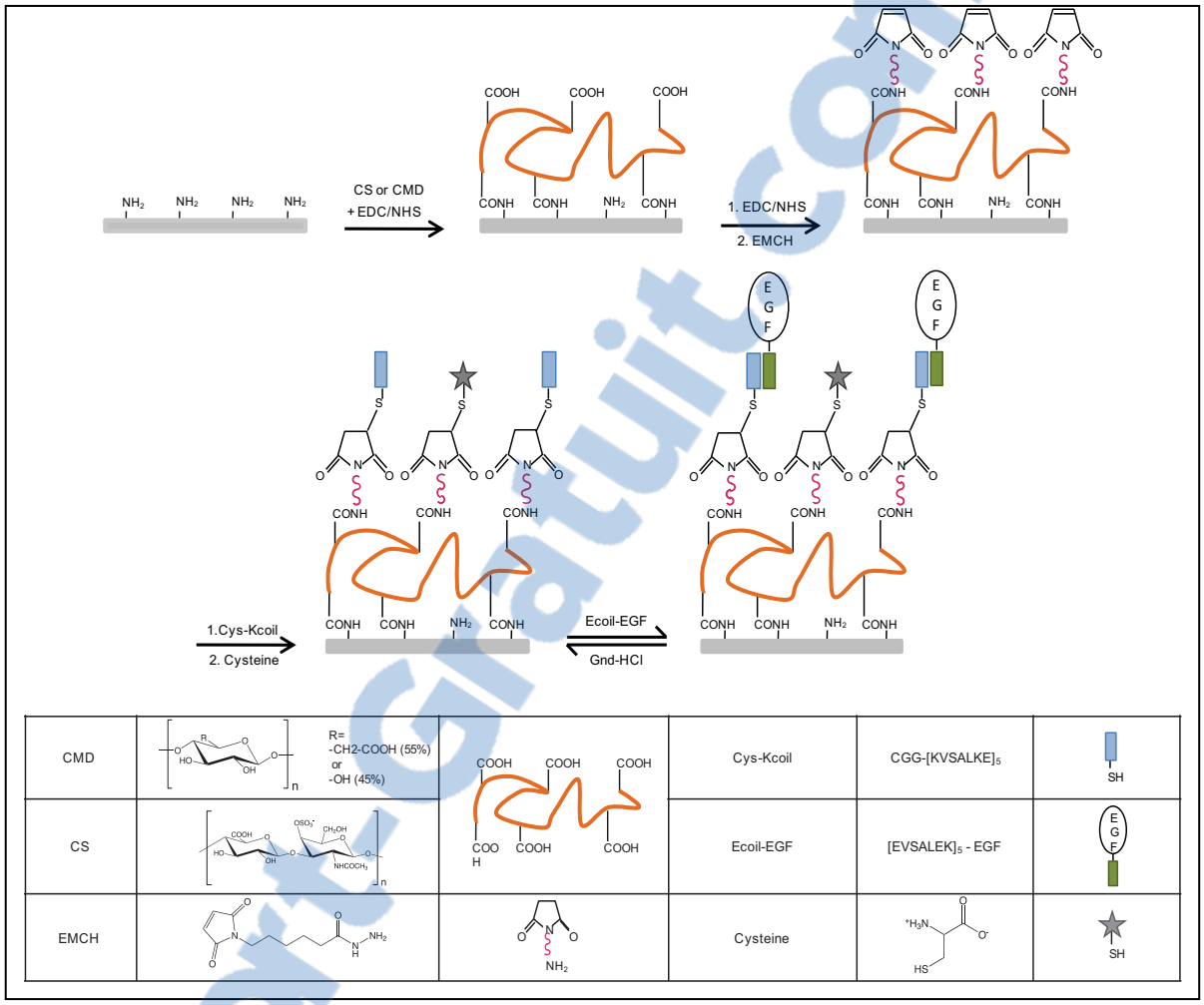
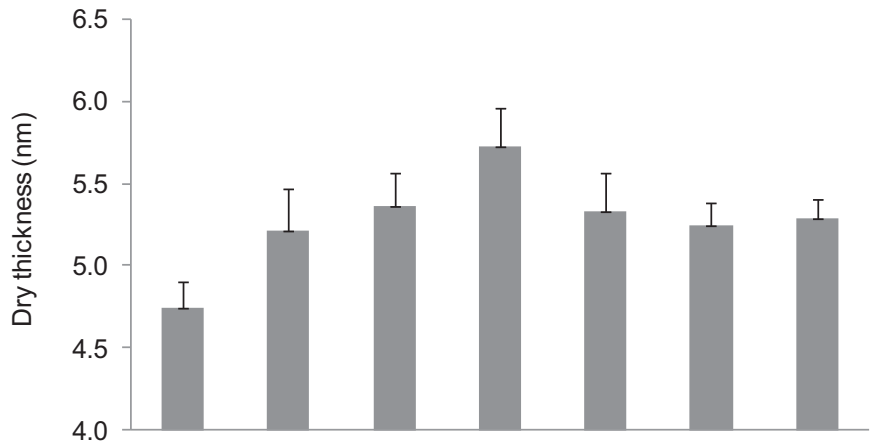



Figure 4.2 Schematic illustration of the grafting steps for the oriented EGF immobilization on CS and CMD. The grafting of CS or CMD layers on aminated surfaces was followed by the chemical grafting of cysteine-tagged Kcoil peptides using EMCH as heterobifunctional linker. Remaining EMCH thiol-reactive groups were deactivated using cysteine molecules. Ecoil-tagged EGF proteins were captured on the surface via the reversible E/K coiled-coil interaction

This led to net dry thickness variations of +0.38 nm and –0.40 nm, respectively (conditions **d** and **e**). Ecoil-EGF (600 nM) was also incubated on EMCH layers that had previously been blocked by cysteine molecules (condition **f**). Absence of thickness gain in this case (compare conditions **f** and **g**) confirmed that Ecoil-EGF is only recruited via the specific coiled-coil interactions.

Rapport-Gratuit.com




| | a | b | c | d | e | f | g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| APTES | + | + | + | + | + | + | + |
| CS | | + | + | + | + | + | + |
| EMCH | | | + | + | + | + | + |
| Kcoil | | | + | + | + | | |
| Cysteine | | | | + | + | + | + |
| Ecoil-EGF | | | | + | + | | + |
| Gnd/HCl | | | | | + | | |

Figure 4.3 Sequential grafting of Ecoil-EGF on CS-coated surfaces via coiled-coil interactions followed by dry thickness measured by ellipsometry. (a) APTES; (b) APTES+CS; (c) APTES+CS+EMCH+Kcoil+cysteine; (d) Ecoil-EGF capture on (c); (e) Ecoil-EGF removal after capture (as in d) with guanidium hydrochloride (5 M). As a negative control (g), Ecoil-EGF was incubated on (f) cysteine-blocked EMCH layers (no Kcoil). The reference was set as (0 nm, 0°) for a cleaned silicon wafer surface. ($n$ = 3)

### 4.5.2 ELISA quantification of immobilized EGF

The ability to control the EGF surface density in both oriented and random strategies was studied on CS and CMD via direct ELISA by varying EGF incubation concentration from 315 pM to 900 nM (Figure 4.4). Fine-tuning of EGF incubation concentrations was performed to ensure similar EGF densities on both polysaccharide-coated surfaces during

cell experiments and thus ease comparison. It should be noted that ELISA quantification relies on both the presence and the orientation of EGF on the surface, as the ELISA detection antibody is sensitive to a specific epitope of the EGF protein. Therefore, the surface densities in Figure 4.4 characterize the amount of bioavailable EGF.

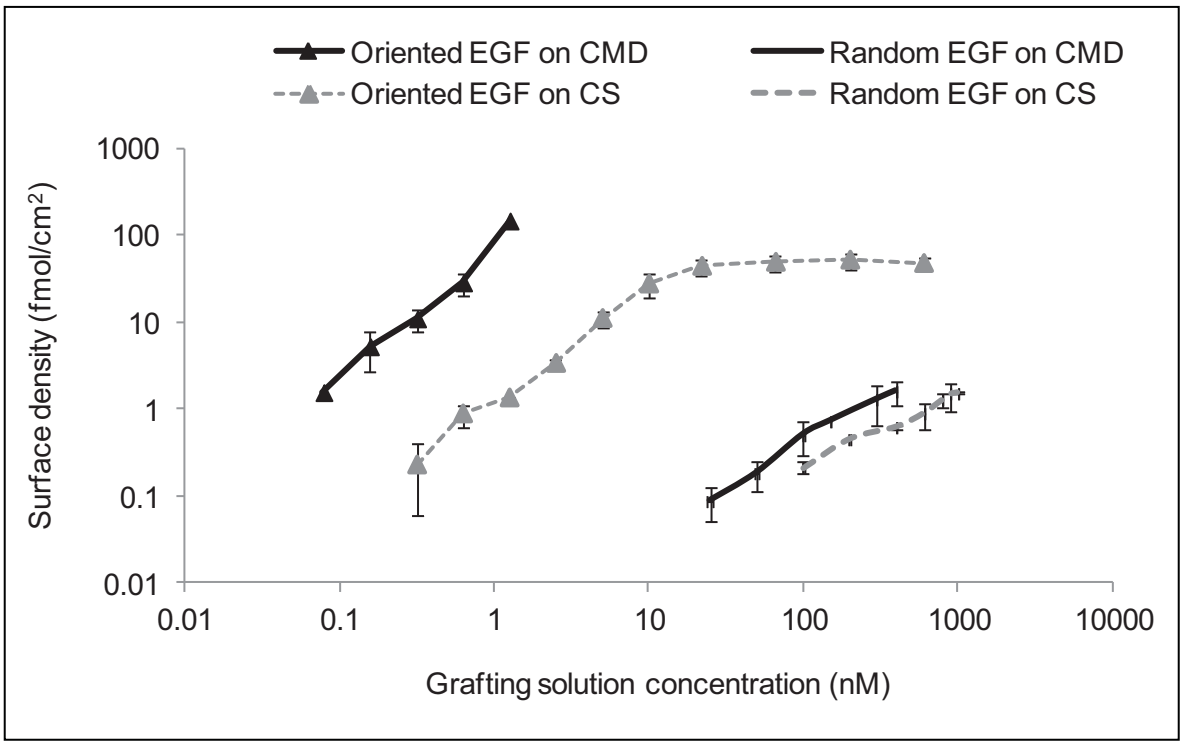



Figure 4.4 Variation of EGF surface density on CS and CMD with Ecoil-tagged or untagged EGF concentration during incubation. Apparent surface densities for oriented and randomly grafted EGF were evaluated by direct ELISA ($n \geq 8$)

For the oriented grafting strategy on CS, the maximal surface density (45 fmol/cm$^2$) was obtained with an Ecoil-EGF incubation concentration of 22 nM. The same density was reached on Kcoil-functionalized CMD with an Ecoil-EGF concentration of 625 pM. In contrast, the EGF surface density obtained by random coupling on CS was lower despite the use of considerably higher incubation concentrations, i.e 1.5 fmol/cm$^2$ for incubation concentration of 900 nM EGF. To achieve the same surface density on CMD, a concentration of 300 nM EGF was required. Thus, compared to EGF random grafting, the coiled-coil system not only enabled to reach higher EGF surface densities, but it also increased grafting

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

yield, insofar as ca. 1000-fold less EGF was needed to achieve the same surface density. That is, an EGF density of 1.5 fmol/cm$^2$ was immobilized on CS with 1.5 nM of Ecoil-EGF or with 900 nM of untagged EGF (Figure 4.4).

EGF non-specific adsorption was evaluated by incubation of untagged EGF (100 nM in PBS for 1h) on wells that had been coated with 1) CS and 2) CMD, as well as on 3) pristine aminated wells as control.

Table 4.1 Non-specific adsorption of EGF measured by ELISA. EGF was incubated at 100 nM (in PBS) for 1h on bare aminated microplate wells, CS and CMD (Mean ± std dev; $n \geq 4$)

| | *CS* | *CMD* | *Aminated wells* |
|---|---|---|---|
| Surface density of adsorbed EGF (fmol/cm$^2$) | 0.077 ± 0.003 | 0.070 ± 0.024 | 0.934 ± 0.154 |

As can be seen in Table 4.1, EGF adsorption was found to be similar on CS- and CMD-covered wells (0.077 and 0.070 fmol/cm$^2$, respectively, $p = 0.62$) and drastically higher on pristine aminated wells (0.934 fmol/cm$^2$, $p < 0.001$ compared to CS and CMD). This result demonstrates that CS and CMD layers are equally efficient to reduce EGF adsorption and that the polymer layers are sufficiently dense and homogeneous to mask the underlying aminated wells. The featured low-fouling properties of CS confirm previous results by Keuren et al. (Keuren, Wielders et al. 2003) showing low adhesion of plasma proteins such as fibrinogen, albumin and antithrombin on CS-covered surfaces. In the context of a bioactive coating, CS low-fouling properties could prevent protein aggregation and therefore improve the exposure of grafted growth factors to cells from the vessel wall.

### 4.5.3 Bioactivity of the coatings

Cell survival and apoptosis were assessed to estimate the bioactivity of the various EGF layers immobilized on CS and CMD. For all tests, EGF proteins were grafted on CS at the

maximal surface densities, i.e. 45 fmol/cm$^2$ and 1.5 fmol/cm$^2$ for oriented tethering and random grafting, respectively. The concentrations of the grafting solutions were then adjusted for CMD coatings to reach the same EGF surface densities in order to evaluate the influence of the polymer underneath EGF (CS vs CMD).

#### 4.5.3.1 Cell adhesion and survival

VSMC were cultured on the different coatings for 24h in complete growth medium (adhesion at day 0) and then exposed to serum-free medium for 3, 5 and 7 days. Polystyrene (PS) and pristine aminated wells were used as controls. Figure 4.5 presents the cell adhesion (in %) expressed as the day 0 alamarBlue signal obtained on the coated surfaces normalized to the one on PS surfaces. Figure 4.6 presents the cell survival (in %) after 3, 5 and 7 days in serum-free medium on each surface after normalization to their respective initial alamarBlue signal, i.e. at day 0. The consistency of the alamarBlue results with the number of cells on the surface was confirmed by crystal violet staining (Figure 4.7).

After the 24h-incubation, high cell adhesion was observed on CS-coated and pristine aminated wells (ca. 145% of adhesion on PS), and EGF grafting on CS did not affect cell adhesion compared to bare CS (Figure 4.5). Despite similar protein-resistance properties (Table 4.1), CMD and CS displayed very different cell-adhesive properties, since cell adhesion was found to be low on CMD, i.e. alamarBlue signal on CMD layers was 25% of that obtained for CS-coated surfaces at day 0 ($p < 0.005$).

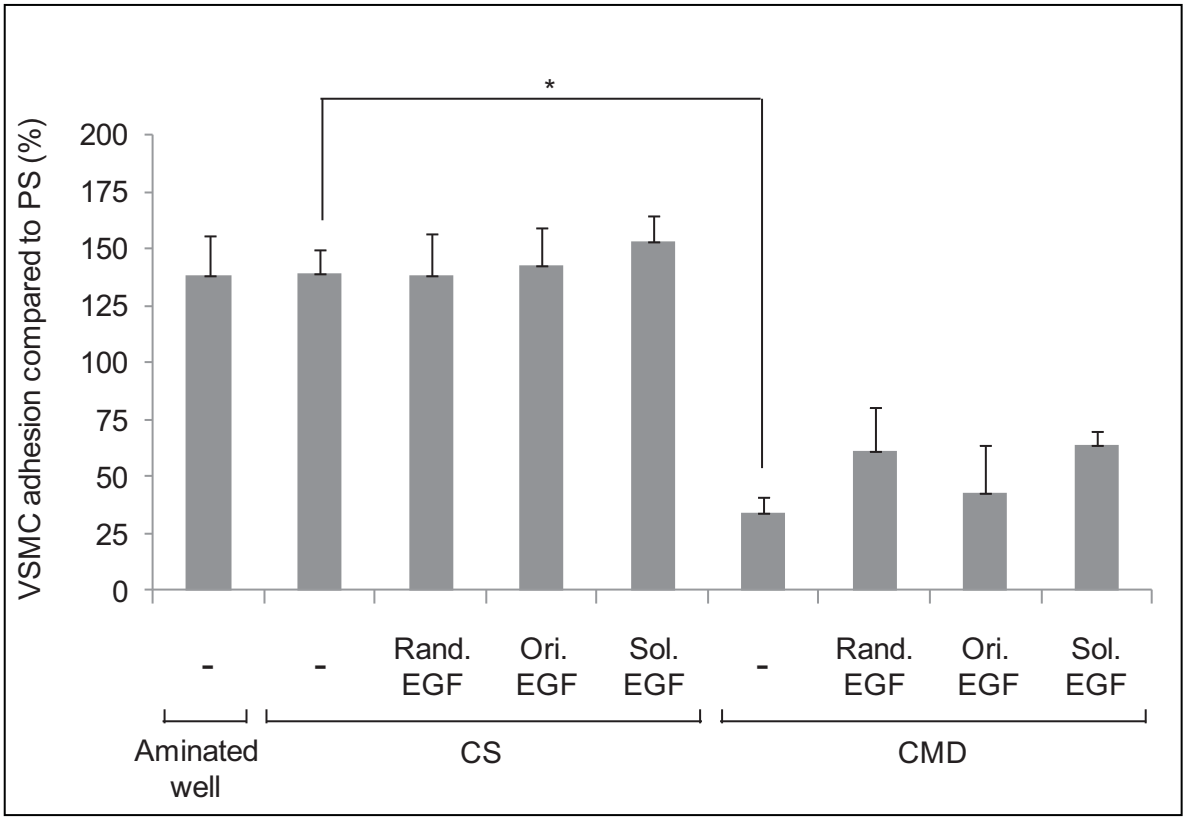



Figure 4.5 VSMC adhesion after 24h in complete growth medium. VSMC adhesion was expressed (in %) as alamarBlue signal at D0 on each surface normalized to the signal at day 0 on PS (100%). Soluble EGF (Sol. EGF) was added at 10 ng/mL in culture medium. EGF surface densities on CS and CMD were identical, i.e. 1.5 and 45 fmol/cm$^2$ for random (Rand. EGF) and oriented (Ori. EGF) immobilization, respectively. Statistical difference noticed * $p < 0.005$

Upon exposure to serum-free medium, VSMC survival on both PS and pristine aminated surfaces showed a progressive decrease over time from 100% (day 0) to ca. 45% (day 7), suggesting that the surface-exposed amine groups do not influence the cell survival mechanism (Figure 4.6).

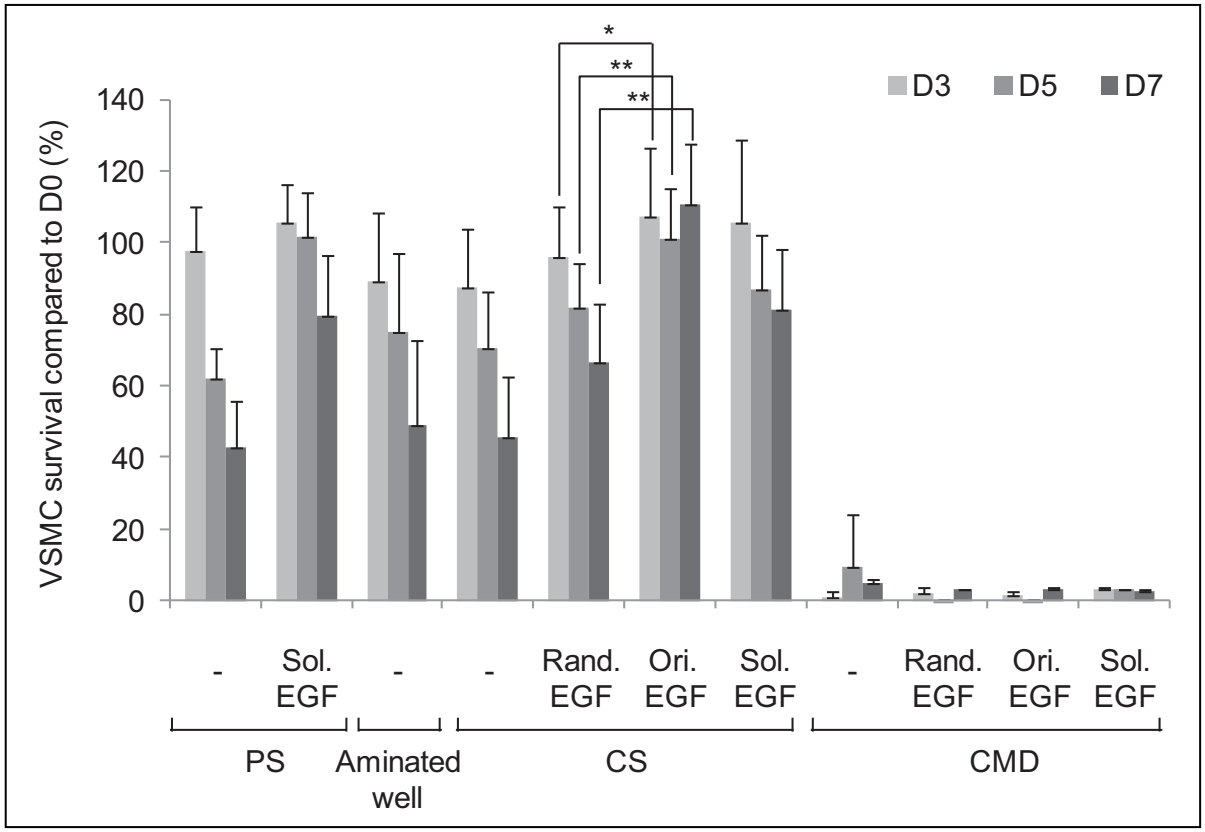



Figure 4.6 VSMC survival in serum-free conditions. After 24h in complete growth medium for adhesion (D0), cells were exposed to serum-free medium for 3, 5 or 7 days (D3, D5 and D7). VSMC survival (in %) was expressed as a ratio of alamarBlue signal at day 3, 5 and 7 to the signal at day 0 on the same surface. Soluble EGF (Sol. EGF) was added at 10 ng/mL in culture medium. EGF surface densities on CS and CMD were identical, i.e. 1.5 and 45 fmol/cm$^2$ for random (Rand. EGF) and oriented immobilization (Ori. EGF), respectively. Statistical differences between random and oriented EGF on CS were *: $p = 0.01$ at D3, **: $p < 0.0001$ at day 5 and 7 ($n \geq 8$)

The same trend was observed for CS-coated wells with a cell survival of 45% at day 7, confirming that CS *per se* does not improve the cell survival over 7 days compared to tissue culture PS (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). When soluble EGF was supplied in the serum-free medium, the survival was enhanced on PS and CS-coated wells to ca. 80% (day 7), indicating that EGF triggered cell survival mechanisms, as expected (Henson and Gibson 2006, Charbonneau, Ruiz et al. 2012). Despite similar initial cell adhesion (Figure 4.5), a clear behavior discrepancy was observed in serum-free conditions between bare CS and CS covered with random or oriented EGF (Figure 4.6). Cell survival slowly decreased over time

on bare CS and randomly grafted EGF layers, i.e. 87, 70, 45% and 96, 82, 66%, respectively (for day 3, 5, 7) ($p < 0.05$ at day 7). The slower decrease in cell density observed for random EGF coatings compared to bare CS confirmed that immobilized EGF improved the cell survival on CS, as previously featured (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). In stark contrast, after 7 days in serum free conditions, cell density was maintained for the coiled-attached EGF layers to ca. 106% compared to day 0.

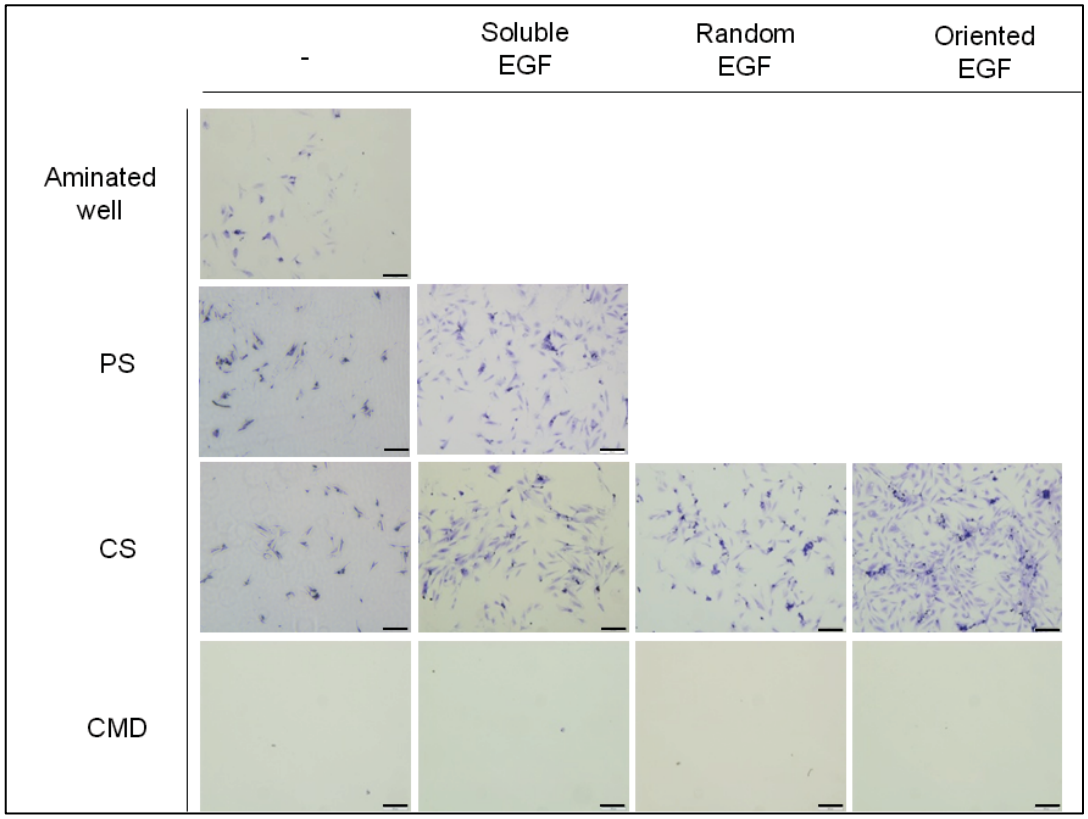



Figure 4.7 VSMC density and homogeneity observed by crystal violet staining. After 24h adhesion in complete growth medium, cells were left for 7 days in serum-free conditions. Soluble EGF concentration (10 ng/mL) and surface EGF densities (1.5 fmol/cm$^2$ for random grafting and 45 fmol/cm$^2$ for oriented tethering) were identical for all substrates.
Scale bars correspond to 200 µm

This confirms that EGF oriented immobilization offered an important additional asset by preventing cell depletion in serum-free conditions, as also highlighted in Figure 4.7. Contrarily to CS-coated surfaces, EGF grafting on CMD layers did not improve VSMC

survival. Indeed, negligeable signals were detected as of day 3 Figure 4.6 on all CMD-based coatings, indicating that the presence of EGF was not sufficient to counterbalance the low-fouling, cell-repellent properties of the CMD underlayer (also featured in Figure 4.7).

#### 4.5.3.2 Cell apoptosis.

In order to explain the superiority of the CS and oriented EGF combination observed in VSMC survival, cell resistance to apoptosis was assessed on the different surfaces after 14h in serum-free medium using Hoescht 33342/propidium iodide staining (Figure 4.8). Viable, apoptotic and necrotic cells were identified according to cell morphology and color, as previously described (Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012).

Regardless of the surface coating, we observed that serum-free medium favored apoptosis when compared to complete growth medium, while necrosis remained very low (≤ 1% in serum-free medium and complete medium). The proportion of VSMC presenting an apoptotic phenotype was significantly lessened on CS surfaces compared to pristine aminated and PS wells (9, 14 and 16%, respectively, with $p < 0.005$), confirming that a coating of CS initiated anti-apoptotic mechanisms for VSMC (Charbonneau, Liberelle et al. 2011, Charbonneau, Ruiz et al. 2012). Random EGF tended to further decrease apoptosis but no statistical difference was established between bare CS and random EGF on CS ($p = 0.2$), as previously reported (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). However, apoptosis was significantly reduced when the EGF was displayed in an oriented fashion on the CS compared to bare CS surface (6 and 9%, respectively, with $p = 0.01$). This better resistance to apoptosis induced by CS when allied to the known pro-proliferative role of EGF (Major and Keiser 1997, Kaiura, Itoh et al. 2000, Upchurch 2005) could have compensated the number of cells lost by apoptosis during the 7-day treatment in serum free medium, is the likely origin of the excellent VSMC survival seen in Figure 4.6.

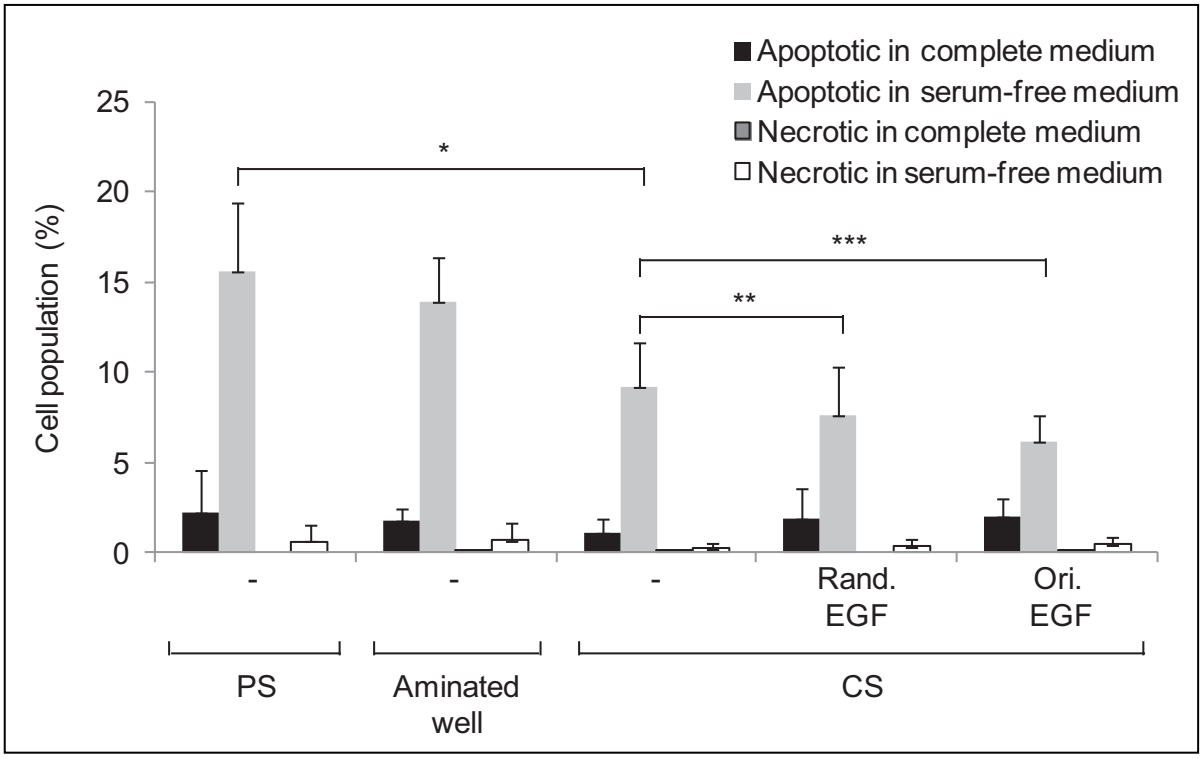



Figure 4.8 Percentages of apoptotic and necrotic VSMC in serum-free conditions. After 8h in complete growth medium for adhesion, the cells were exposed to either complete (control) or serum-free (pro-apoptotic) medium for 14h. Apoptotic and necrotic cells were counted after Hoescht 33342/propidium iodide staining, and percentages were obtained by the ratio of apoptotic (or necrotic) cells over total number of cells. Statistical differences were *: $p < 0.005$ between CS and PS**: $p = 0.2$ between CS and random EGF (Rand. EGF) and ***: $p = 0.01$ between CS and oriented EGF (Ori. EGF) ($n = 8$)

## 4.6 Discussion

VSMC survival in pro-apoptotic conditions (e.g. serum starvation, hypoxia) is a key issue in the case of aortic aneurysms after implantation of a stent-graft. Indeed, the VSMC apoptosis and depletion that characterize aneurismal vessel walls combined with poor access to nutrients and oxygen following SG implantation, are believed to play a major role in the lack of healing observed around SGs (Bennett and Boyle 1998, Rowe, Stevens et al. 2000). While the thrombus formed in the aneurismal cavity after deployment of SG should ideally evolve in an organized fibrous tissue encapsulating the implant and contract to induce aneurysm shrinkage, explanted SG are most often found surrounded by an unorganized blood clot with

a strong deficit in fibroblasts, VSMC and collagenous ECM, even after years of implantation. This lack of integration of the SG in the vessel wall (McArthur, Teodorescu et al. 2001, Major, Guidoin et al. 2006) causes frequent complications such as migration or endoleaks (Resch, Ivancev et al. 1999).

Currently, the solutions proposed by manufacturers to prevent SG migration and endoleaks are design features that provide mechanical - but not biological - attachment, such as the use of metal hooks that anchor the SG in place and the use of oversized terminal rings at the necks to seal the ends (Malina, Lindblad et al. 1998). In parallel, a few research groups have been working on improving the healing around SGs, most of them by using fibroblast growth factor (FGF) to increase fibroblast and VSMC growth as well as collagen production (van der Bas, Quax et al. 2002, van der Bas, Quax et al. 2004, Kajimoto, Shimono et al. 2008). Those coatings combining FGF, heparin and collagen (van der Bas, Quax et al. 2004) or FGF and elastin (Kajimoto, Shimono et al. 2008) have induced an interesting neointima formation in vivo in healthy vessels of pigs and dogs, respectively. However their ability to address cell apoptosis in a complex diseased environment, i.e. with limited access to nutrients and growth factors, has not been considered.

To induce tissue ingrowth on the abluminal surface of the SG, VSMC and fibroblasts must either cross the thrombus formed between the implant and vessel wall or migrate along the implant surface from the proximal and distal necks of the aneurysm where the SG is in contact with the host vessel wall. The cells must adhere on the implant external surface, proliferate and survive to the unfavorable, pro-apoptotic environment. Yet, PTFE and PET used in SG either trigger oxidative stress leading to cell death by anoikis (Kader and Yoder 2008) or fail to activate appropriate survival signals. Our hypothesis was that a bioactive coating designed to counter these pro-apoptotic conditions and promote cell adhesion, proliferation, migration and survival of VSMC and fibroblasts would favor the integration of the implant in the tissue, thus reducing clinical complications.

Rapport-Gratuit.com

CS and EGF were chosen since these biomolecules are both involved in vascular repair after injury, promoting anti-apoptotic phenotypes of the vascular cells involved in fibroproliferative reactions (vascular smooth muscle cells, fibroblasts, mesenchymal stem cells) (Raymond, Desormeaux et al. 2004, Laplante, Raymond et al. 2005, Soulez, Sirois et al. 2010). EGF is also well known to promote cell proliferation and migration (Wells, Gupta et al. 1998, Xie, Pallero et al. 1998, Kaiura, Itoh et al. 2000, Jorissen, Walker et al. 2003). Although exaggerated fibroproliferative responses can be seen as detrimental in several vascular pathologies (atherosclerosis, restenosis after stent implantation…) (Bitterman and Henke 1991, Bennett and O'Sullivan 2001), such response, if occurring on the SG external surface, would be beneficial in the case of aortic aneurysms in order to improve SG integration and fixation to the aneurismal wall.

The present data confirmed that a coating combining CS and EGF favors cell adhesion and survival in serum-free medium mimicking nutrients deprivation after SG implantation but also showed that the coating bioactivity was largely improved by oriented tethering of EGF on CS (Figures 4.5 to 4.8). Thanks to the high efficiency of capture of our coiled-coil tethering system, a dense coverage of optimally-oriented growth factor can be produced, while drastically reducing the amount of growth factor needed, when compared to random covalent grafting (Figure 4.4). Considering that the surface area of stent-grafts is usually quite large ($\geq 100$ cm$^2$), reducing the costs associated with coating is an important advantage.

Another key result of this study is the important benefit of using CS as a sublayer for EGF immobilization. As assessed in the present study, the dense and homogenous CS layer created on aminated substrates displayed low fouling properties (Table 4.1). Low adsorption of plasma proteins such as fibrinogen and albumin on CS-covered surfaces has also been reported by Keuren et al. (Keuren, Wielders et al. 2003). This is of interest since low-fouling surfaces may optimize tethered growth factor bioactivity by preventing its denaturation and limiting plasma proteins adsorption (Goddard and Hotchkiss 2007). The parallel study with carboxymethylated dextran (CMD), another well-known non-fouling surface, however showed a tremendous advantage of CS over dextran, on which adhesion and survival were

very low, even in the presence of immobilized EGF (Figure 4.6). Poor cell adhesion and growth was already reported on bare PEG and dextran, presumably due to their cell resistance in addition to protein resistance (Massia, Stark et al. 2000, Klenkler, Chen et al. 2008), and even in the presence of tethered EGF, a dense non-absorbent PEG layer prevented complete epithelialization (Klenkler, Chen et al. 2008). In contrast, VSMC tend to adhere and spread on CS surfaces, with a network of actin stress fibers (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). Since integrin activation is known to cooperate with EGF receptor-signalling leading to enhanced and prolonged activation of downstream anti-apoptotic pathways such as ERK (Miyamoto, Teramoto et al. 1996), it is likely that CS- mediated adhesion on CS could synergize with EGF to enhance survival. Further work would be required to better explain cell adhesive properties of CS and identify integrin receptors responsible for VSMC adhesion on CS.

Other benefits of CS for SG surface modification are its non-thrombogenic and anticoagulant properties (Keuren, Wielders et al. 2003, McGee and Wagner 2003) that could increase substrate access to the cells in vivo by preventing the formation of a dense blood clot barrier around the implant. Furthermore, introducing a CS-based coating seems to be consistent with a restoration of a healthy environment for aortic cells, since CS, among other GAGs, is severely reduced in aneurismal aorta (Theocharis, Theocharis et al. 2002). Altogether, these features make CS as an ideal sublayer for growth factor immobilization.

While this study was carried out on aminated glass and microplates as model substrates for the ease of the demonstration, creation of similar bioactive coatings on realistic graft materials (PET, PTFE) is easy to achieve. Indeed, the amination of PET (Girardeaux, Zammatteo et al. 1996, Bech, Meylheuc et al. 2007, Lerouge, Major et al. 2007, Noel, Liberelle et al. 2011) and PTFE (Kang, Tan et al. 1996, Lerouge, Major et al. 2007) surfaces is easily achievable by plasma processes or aminolysis ; we also recently reported the creation of uniform CS coatings on PET thanks to a primary-amine rich plasma polymerized coating (Charbonneau, Ruiz et al. 2012). Conclusions of this study are however limited by our in vitro model that may not entirely mimic the in vivo pro-apoptotic environment. Future

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

in vitro and in vivo testing will further assess the efficacy of our coating to improve healing around SG and limit aneurysm progression.

## 4.7 Conclusions

A method for growth factor oriented immobilization, involving two peptides binding to each other with high affinity, was successfully used to tether EGF on CS. The combination of a CS sublayer and oriented EGF greatly enhanced VSMC survival in serum-free conditions compared to randomly grafted EGF on CS, but also compared to EGF immobilized on non-fouling dextran surfaces. The superiority of the approach relies on 1) low fouling and cell adhesive properties of CS associated with 2) optimal orientation and higher density of EGF on the surface. The ultimate goal of this anti-apoptotic coating is to improve the healing around stent-grafts. Thanks to the versatility of the coil-based tethering strategy, co-capture of selected Ecoil-tagged growth factors on CS could be readily achieved to fine-tune implant bioactivity or target other applications, especially in tissue engineering scaffolds where nutrients and oxygen supplies are deficient before neovascularization occurs.

**Acknowledgments**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canada Research Chairs on endovascular implants and biomaterials (S.L.) and protein-enhanced biomaterials (G.D.C.). We also acknowledge a full scholarship (P.L.) grant from the Fonds de la Recherche Nature et Technologies Québec (FQRNT). The authors would also like to thank Charles Fortier for the production of Ecoil-EGF, Dr Nathalie Arbour for the use of the Synergy 4 Spectrophotometer, Dr Marie-Josée Hébert for the use of the digital camera and microscope (Leica DMLS microscope and Leica DFC420C camera).

# CHAPITRE 5

# CO-IMMOBILISATION CONTROLÉE DE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME ET DE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPITHÉLIUM VASCULAIRE POUR OPTIMISER LA SURVIE DES CELLULES VASCULAIRES

Pauline Lequoy[a], Frederic Murschel[b], Benoit Liberelle[b], Sophie Lerouge[a*] and Gregory De Crescenzo[b]*

[a] Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Montréal (QC), Canada and Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ÉTS), Montréal (QC), Canada.

[b] Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal (QC), Canada.

**Article publié dans la revue Acta Biomaterialia en octobre 2015.**

## 5.1 Mise en contexte

Le but de ce troisième article, intitulé en anglais *'Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival'* publié dans la revue Acta Biomaterialia en 2015, est de répondre au 3ème objectif spécifique de ce doctorat: 'Élaborer un revêtement qui allierait la bioactivité de deux facteurs de croissance - EGF et VEGF- à la faible thrombogénicité de CS' (Lequoy, Murschel et al.). En particulier, on cherche à vérifier la faisabilité d'une co-immobilisation orientée d'EGF et VEGF sur CS, à caractériser les surfaces obtenues par incubation de différentes quantités d'EGF et de VEGF sur une surface de CS fonctionnalisée avec des peptides Kcoil, et à évaluer la bioactivité d'un revêtement alliant CS, EGF et VEGF sur la survie les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ce travail a été réalisé de façon majoritaire par P. Lequoy (design et réalisation des expériences, traitement des résultats, préparation des figures et du manuscrit).

## 5.2 Abstract

Growth factors (GFs) are potent signaling molecules that act in a coordinated manner in physiological processes such as tissue healing or angiogenesis. Co-immobilizing GFs on materials while preserving their bioactivity still represents a major challenge in the field of tissue regeneration and bioactive implants. In this study, we explore the potential of an oriented immobilization technique based on two high affinity peptides, namely the Ecoil and Kcoil, to allow for the simultaneous capture of the epidermal growth factor (EGF) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) on a chondroitin sulfate coating. This glycosaminoglycan layer was selected as it promotes cell adhesion but reduces non-specific adsorption of plasma proteins. We demonstrate here that both Ecoil-tagged GFs can be successfully immobilized on chondroitin sulfate surfaces that had been pre-decorated with the Kcoil peptide. As shown by direct ELISA, changing the incubation concentration of the various GFs enabled to control their grafted amount. Moreover, cell survival studies with endothelial and smooth muscle cells confirmed that our oriented tethering strategy preserved GF bioactivity. Of salient interest, co-immobilizing EGF and VEGF led to better cell survival compared to each GF captured alone, suggesting a synergistic effect of these GFs. Altogether, these results demonstrate the potential of coiled-coil oriented GF tethering for the co-immobilization of macromolecules; it thus open the way to the generation of biomaterials surfaces with fine-tuned biological properties.

KEYWORDS

Surface functionalization, Co-immobilization, Growth Factor, Oriented tethering, Cell survival

## 5.3 Introduction

Conferring bioactive properties to synthetic materials via specific signaling molecules such as growth factors is a promising way to predict and control biological response to implants. Growth factors (GFs) are naturally present in the body as soluble or extracellular matrix (ECM)-bound cues for the cells. Accordingly, many efforts have been dedicated to incorporate GFs into materials in order to take advantage of their natural regenerative action either via their progressive release(Babensee, McIntire et al. 2000, Formiga, Pelacho et al. 2010, Vulic and Shoichet 2014) or their immobilization on various substrates.(Mieszawska and Kaplan 2010, Pompe, Salchert et al. 2010, Masters 2011) Such GF-modified biomaterials have been shown to promote *in vitro* cell proliferation,(Shen, Shoichet et al. 2008, Klenkler, Dwivedi et al. 2010) migration (Stringa, Knauper et al. 2000, Shen, Shoichet et al. 2008) and differentiation.(Uebersax, Merkle et al. 2008, Galas and Liu 2014)

However, most of the studies on the biological modification of materials rely on the addition of a single GF, while in their physiological environment, GFs are often combined, and complex processes such as wound healing or angiogenesis typically involve several signalling proteins possessing synergistic or complementary actions.(Bennett and Schultz 1993, Risau 1997, Barrientos, Stojadinovic et al. 2008, Chen, Zhang et al. 2010) This generated a growing interest in biomimetic materials delivering or displaying multiple GFs.(Chen, Zhang et al. 2010, Sun, Shen et al. 2011, Wylie, Ahsan et al. 2011, Assal, Mie et al. 2013) Studies have shown that GF combination in biomaterials can improve angiogenesis,(Richardson, Peters et al. 2001, Hao, Silva et al. 2007, Chiu and Radisic 2010, Zieris, Prokoph et al. 2010, Assal, Mie et al. 2013) osteogenesis,(Almodovar, Guillot et al. 2014) directed migration(Stefonek-Puccinelli and Masters 2008) or cell differentiation(Almodovar, Guillot et al. 2014) when compared to a single GF. However, major hurdles still limit the use of systems involving multiple GF, such as the huge quantities of GF required for large size implants/scaffolds, or the lack of characterization of potential synergies existing between GF that could be exploited for enhanced implant biological activity. The search towards an efficient, well-controlled immobilization platform for GF combination is thus still in progress.

To reach that aim, stable immobilization appears advantageous since it provides the substrate with a high local concentration of GF that is not released over time, thereby inducing an enhanced and sustainable cell response compared to free growth factor.(Ito, Shu Qin et al. 1991, Boucher, Ruiz et al. 2010, Ito and Tada 2013) Moreover, lower amounts of immobilized GFs are required to trigger cell stimulation when compared to their supply in a diffusible form, given that large quantities need to be provided by a sustainable source (either medium renewal *in vitro* or controlled release).(Joddar and Ito 2011) Finally, for blood-contacting devices, stable immobilization enables a localized and durable effect (Ito and Tada 2013) as it prevents GF release into the blood stream. Another challenge is the choice of GF immobilization method to preserve its biological activity. Electrostatic binding can alter protein structure and negatively impact GF bioactivity as a result of denaturation and/or a random presentation on the surface, with active sites not being fully accessible for recognition by cell surface receptors.(Rusmini, Zhong et al. 2007) Furthermore, in physiological conditions, the long term availability of the GF may also be limited due to the weak attachment of molecules on the surface.(Rusmini, Zhong et al. 2007) Covalent immobilization involving irreversible binding of reactive groups present on side chain residues to chemical moieties available at the surface is durable but can also lead to loss of bioactivity due to conformational changes and random orientation of the GF upon grafting.(Rusmini, Zhong et al. 2007, Masters 2011)

In this context, several groups have developed site-specific, oriented protein tethering systems that maintain GF bioactivity. Those include the use of ECM binding tags that can be genetically fused to GFs, as well as pairs of high affinity peptides with variable stabilities in which one peptide is bound to the substrate of interest while the other is fused to GFs by genetic engineering.(Nishi, Matsushita et al. 1998, Ishikawa, Terai et al. 2001, Kitajima, Sakuragi et al. 2009, Sakuragi, Kitajima et al. 2011, Assal, Mie et al. 2013) On that note, we have investigated the potential of two peptides, the Ecoil and Kcoil, of respective amino acid sequence $[EVSALEK]_5$ and $[KVSALKE]_5$ that bind to each other to form stable coiled-coil structures.(Boucher, Liberelle et al. 2009) Ecoil/Kcoil mediated capture has been successfully applied to tether various Ecoil-tagged GFs, such as the epidermal growth factor (EGF)(Boucher, St-Laurent et al. 2008) and the vascular endothelial growth factor

(VEGF),(Murschel, Liberelle et al. 2013) onto substrates that had been pre-decorated with Kcoil peptides. Careful positioning of the Ecoil tags on the chimeras corresponding to each GF allowed this immobilization strategy to preserve the GF bioactivity after tethering (as deduced from receptor activation,(Boucher, Liberelle et al. 2009) increase in adhesion(Boucher, Ruiz et al. 2010), proliferation(Boucher, Ruiz et al. 2010) or survival (Murschel, Liberelle et al. 2013, Lequoy, Liberelle et al. 2014) of cells). Of interest, coiled-coil immobilized and free EGF and VEGF led to comparable cell survival when provided at sufficiently high doses.(Murschel, Liberelle et al. 2013, Lequoy, Liberelle et al. 2014)

Although this system had been limited so far to the immobilization of a single type of GF at a time, we hypothesized that Kcoil-bearing substrates could readily be functionalized with multiple Ecoil-tagged GFs. The objective of this work was therefore to investigate the feasibility of GF co-immobilization, its control and the advantage of the stable coiled-coil capture system as a platform to investigate the collaborative effect between GFs and its potential to create a coating with tailored properties. More specifically, we hypothesized that a controlled combination of EGF and VEGF could help to optimize a coating with pro-survival properties. Indeed, conferring pro-survival properties to biomaterials is an ongoing challenge for several applications such as tissue engineered scaffolds where survival of pre-seeded cells is crucial to counter the cell loss caused by serum deprivation and hypoxia before neo-angiogenesis takes place. (Oh, Ward et al. 2009, Li, Guo et al. 2012) Healing around stent grafts implanted during endovascular repair of abdominal aortic aneurysms may also benefit from pro-survival properties as the vessel wall in aneurysms displays strong vascular cell depletion due to a pro-apoptotic environment.(Henderson, Gang et al. 1999, Durdu, Deniz et al. 2012)

To achieve this aim, Ecoil-tagged EGF and Ecoil-tagged VEGF (hereafter designated as E-EGF and E-VEGF, respectively) were co-immobilized using coiled-coil mediated tethering on chondroitin sulfate (CS). When coated on biomaterial's surfaces, this ECM glycosaminoglycan was shown to permit cell adhesion despite low-fouling properties and low-platelet adhesion,(Keuren, Wielders et al. 2003, Thalla, Fadlallah et al. 2014) suggesting

that it could enhance the bioavailability of the immobilized GF. In an effort to evaluate the potential of a dual GF immobilization for vascular and tissue engineering applications, the effect of surface densities of these GFs (alone and combined), on the survival of two vascular cell types - the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortic smooth muscle cells (AoSMC) was studied.

## 5.4 Materials and methods

### 5.4.1 Materials and Reagents

Chondroitin-4-sulfate (CS), sodium chloride (99.99% purity), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (modified PBS, without calcium chloride and magnesium chloride), Tween 20, Cysteine (99+% purity) and resazurin sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). EMCH (3,3´-N-[ε-maleimidocaproic acid] hydrazide, trifluoroacetic acid salt) was purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Commercially available DuoSet ELISA kits containing biotinylated goat anti-hEGF antibody and mouse anti-hVEGF$_{165}$ antibody and detection antibodies, streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP), bovine serum albumin (BSA), substrate solution (hydrogen peroxide/tetramethylbenzidine) was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). CellBIND® carboxyl-exposing microplates (96-well) were purchased from Corning (Corning, NY).

### 5.4.2 Kcoil, Ecoil-tagged EGF and Ecoil-tagged VEGF Production

Cysteine-tagged Kcoil peptides were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO) (Boucher, St-Laurent et al. 2008). Ecoil-tagged EGF (E-EGF) and Ecoil-tagged VEGF$_{165}$ (E-VEGF) were produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as previously described (Boucher,

St-Laurent et al. 2008). Protein concentration was determined by ELISA. Purified proteins were then stored at -80°C until use.

### 5.4.3 Chondroitin sulfate and Growth Factor Immobilization

#### 5.4.3.1 Chondroitin sulfate coating preparation

CellBIND® 96 well microplates were used as model surfaces to prepare the coatings and carry out the cell culture assays. To create amine groups on the carboxyl-presenting CellBIND surfaces, carbohydrazide (CH, chemical formula $NH_2$-NH-CO-NH-$NH_2$) was grafted using carbodiimide chemistry by exposing the wells to 50 µl of a solution containing 50 mM CH, 200 mM EDC and 50 mM MES for 2 h and rinsing with PBS and water (2 min each) in an ultrasonic bath. Aminated wells were then exposed to 50 µl of a solution containing 0.01 g/ml CS, 40% v/v EtOH, 50 mM MES, 22.8 mM EDC, 4.6 mM NHS for 1 h. The surfaces and the wells were finally rinsed once using PBS (10 mM, pH 7.4) and two times using Milli-Q water for 2 min in an ultrasonic bath.

#### 5.4.3.2 E-EGF and E-VEGF Capture on Kcoil Layers

A Kcoil layer was generated on CS-covered surfaces using EMCH linker, that both reacts with the carboxyl groups of CS and the thiol group of the cysteine-terminated Kcoil, as previously described (Lequoy, Liberelle et al. 2014). Briefly, CS was activated using a solution containing 40% v/v EtOH, 50 mM MES, 22.8 mM EDC, 4.6 mM NHS for 10 min. Then, activated CS carboxyl groups were reacted with the primary amine group of EMCH by depositing 50 µL of 1 mM EMCH in PBS:DMSO (90:10 v/v) on each surface for 1 h. The surfaces were rinsed using PBS and Milli-Q water. Deactivation of remaining polymer COONHS groups was obtained with 100-µL ethanolamine solution (1 M, pH 7.0) for 15 min, followed by rinsing with PBS and Milli-Q water. Thiol-reactive surfaces were then reacted with 100 µL of 1-µM cysteine-tagged Kcoil in Milli-Q water for 1 h. The surfaces were rinsed using PBS and Milli-Q water. Unreacted sites of EMCH were blocked using 100 µL

Rapport-Gratuit.com

of 50-mM cysteine solution (1 M NaCl in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0) followed by rinsing with PBS and Milli-Q water.

Surfaces harboring covalently bound Kcoil were stored overnight in a 10% solution of fœtal bovine serum in PBS. After rinsing with PBS, surfaces were incubated with 50 µL of E-EGF and/or E-VEGF solution (at concentrations ranging from 0.05 to 20 nM in 10 mM PBS containing 1% BSA, PBS–BSA) for 1 h. After the Ecoil-tagged protein(s) capture, wells were rinsed with PBS. For successive captures, after the first coil-tagged GF capture (1 h), surfaces were rinsed with PBS and incubated with the second coil-tagged GF (1 h). The Ecoil-tagged GF immobilization of EGF and VEGF is illustrated in Figure 5.1.

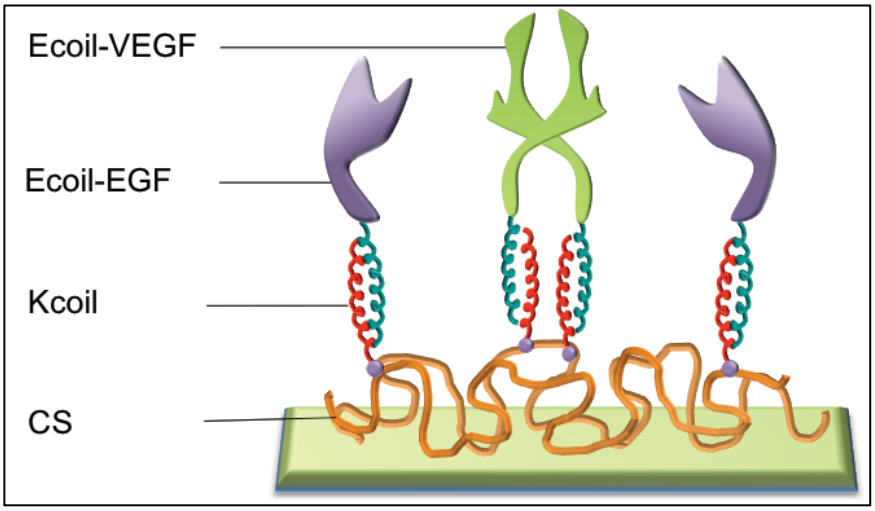



Figure 5.1 Concept of the Ecoil-tagged EGF (E-EGF, monomeric) and Ecoil-tagged VEGF (E-VEGF, dimeric) co-capture on Kcoil-decorated chondroitin sulfate (CS)

### 5.4.4 Surface growth factor quantification by ELISA

Quantification of EGF and VEGF surface densities in the wells was performed by direct ELISA. The wells were first incubated with 50 µL of a biotinylated anti-human EGF antibody or VEGF antibody (50 ng/mL in PBS-BSA) for 30 min. The wells were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and 50 µL of a streptavidin-HRP

solution (diluted 200 times in PBS-BSA) was added to the wells for 20 min. Finally, the wells were rinsed 3 times with PBS-T and reacted with 50 µL of the substrate solution (50:50 v/v mixture of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine). The optical density (O.D.) at 630 nm was measured using an ELISA plate reader (Victor $^{3}$V Multilabel Counter, PerkinElmer, Woodbridge, ON). The slopes corresponding to the O.D. variation in the wells over time were calculated, and the value obtained for a surface with no growth factor was subtracted from all signals.

### 5.4.5 Stability of coiled-coil immobilization

Growth factor-immobilized samples were incubated either 24 hrs in complete growth medium with 5% v/v FBS followed by 7 days in serum-free medium (named 8 day treatment in the rest of the manuscript, comparable to AoSMC survival test); or 24 hrs in complete growth medium with 2% v/v FBS followed by 2 days in serum-free medium (named 3 day treatment in the rest of the manuscript, comparable to HUVEC survival test). Direct ELISA was then performed as presented above and the results are shown relative to a fresh incubation of GF. For all samples, medium was changed every two days to mimic cell culture conditions.

### 5.4.6 Cellular assays

#### 5.4.6.1 Cell culture materials

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortic smooth muscle cells (AoSMC) were purchased from LONZA (Walkersville, MD) and cultured in their respective complete medium - Clonetics™ EGM™-2 and SmGM™-2. Basal EBM™-2 and SmBM™-2 were used as serum-free media for the survival experiments.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

#### 5.4.6.2 Cell survival in serum-free medium

Cells were seeded in 96-well microplates and incubated on each surface at 37°C and 5% $CO_2$ in 200 µL of complete growth medium. Cell seeding densities were 20,000 cells/ well for HUVEC and 10,000 cells/well for AoSMC. After a 24 h-adhesion period, the surfaces were rinsed with PBS to detach non-adherent cells. Serum-free medium was then added (200 µL per well) and changed every other day. Cell metabolic activity was probed using a resazurin assay (Noel, Hachem et al. 2015). Once rinsed with PBS, the wells were exposed to a mix of resazurin (100 µg/mL in MilliQ water) and culture medium (10:90 v:v) for 2 h. Fluorescent signal was read using a spectrophotometer (560 and 590 nm, for excitation and emission wavelengths, respectively). Cells density and homogeneity on the well surfaces were also evaluated via nucleus and actin staining (Charbonneau, Liberelle et al. 2011). In brief, cells were fixed with a 4% w/v solution of formaldehyde for 10 min at room temperature and rinsed with PBS. They were then permeabilized with 0.4% v/v Triton X-100 for 10 min and rinsed with PBS. A 10% goat serum solution in 0.1% v/v Triton X-100/PBS was used to block the cells. Actin staining was achieved by incubating phalloidin-Alexa 488 (1/40 dilution, Cat.# A12379, Molecular Probes, Invitrogen, Grand Island, NY) in PBS for 50 min. Nucleus staining was achieved by adding 10 µl of Hoechst solution (5 µg/ml) and incubating another 10 min. Cell spreading was estimated with ImageJ image analysis software.

### 5.4.7 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation. Statistics were assessed by one-way ANOVA with Tukey's HSD post-hoc testing; *p*-values less than 0.05 were considered significant.

## 5.5 RESULTS

### 5.5.1 Characterization of immobilized growth factors

During this study, Kcoil-functionalized CS surfaces were exposed to either E-EGF or E-VEGF alone ('single capture'), or to a combination of both GFs. The co-immobilization of EGF and VEGF was performed by incubating the proteins together ('simultaneous incubation') or one after the other ('sequential incubation').

In a first step, E-EGF or E-VEGF was incubated alone on Kcoil-functionalized surfaces at concentrations ranging from 0.1 to 20 nM. The range of incubation concentrations was selected after preliminary in vitro cell survival assays. The lowest concentration (0.1 nM) was chosen since no significant impact on cell survival was detected for HUVEC and SMC cultured on surfaces where E-VEGF and E-EGF had been incubated at 0.1 nM, respectively. After GF incubation, the optical density (O.D.) corresponding to tethered E-EGF or E-VEGF detected by direct ELISA was measured (**Error! Reference source not found.**A). For both GFs, an O.D. saturation was observed. The saturation occurred for concentrations higher than, or equal to, 1nM for E-VEGF and 5 nM for E-EGF.

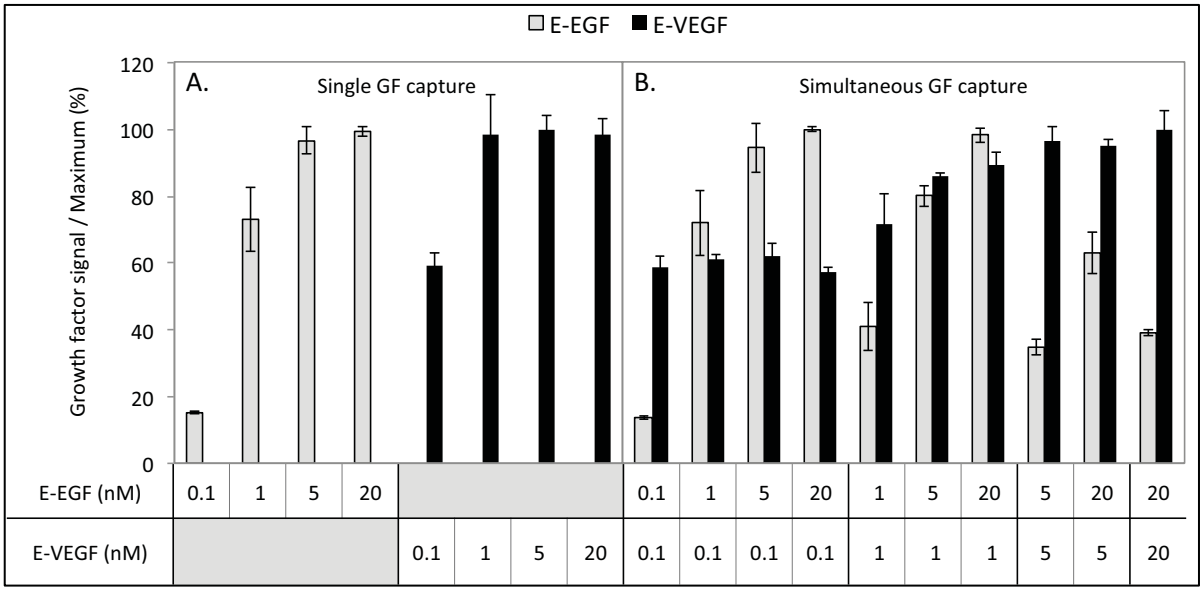



Figure 5.2 Single capture (A) and simultaneous capture (B) of E-EGF and E-VEGF on Kcoil-functionalized CS surfaces. Relative ELISA signal as a function of growth factor incubation concentrations (Mean ± SD, n≥8)

The non-specific adsorption of E-EGF and E-VEGF was evaluated by incubating the tagged GFs on CS-coated surfaces (data not shown). Of interest, the O.D. signals of adsorbed GFs were less than 20 % of the total signal for immobilized VEGF and less than 5% for adsorbed EGF, meaning that most of GF molecules were indeed immobilized to Kcoil-coated CS surfaces via coiled-coil interactions (Figure 5.3).

The saturation of ELISA signals observed in Figure 5.2A indicates that the final layer of the assay (horseradish peroxidase) reached a maximal density on the surfaces. This could be explained by the GFs reaching themselves a maximal density on the surface, with the immobilized Kcoil peptides being the limiting reagent of the coiled-coil interactions. Another explanation would be that the actual GF density kept increasing with concentrations past 1 nM E-VEGF (resp. 5 nM E-EGF) but that the density of ELISA reagents (antibodies and/or horseradish peroxidase) would not, due to their steric hindrance. To test these hypotheses, a sequential incubation of GFs was performed. A high concentration (20 nM) of E-EGF (resp. E-VEGF) was incubated over a surface previously decorated with varying concentrations of

E-VEGF (resp. E-EGF). Direct ELISA results presented in Figure 5.4A showed that E-EGF capture was strongly hindered when the surface was previously functionalized with concentrations of E-VEGF of 1 nM and higher, with a complete inhibition of E-EGF capture with a pre-incubation superior to 5 nM E-VEGF. The data thus indicate that Kcoil peptides were saturated when the surface was pre-treated with E-VEGF concentrations of 5 nM and higher, and thus that the plateau observed in Figure 5.2A was due to E-VEGF reaching a maximal density on the surfaces.

In contrast, E-VEGF capture was possible following E-EGF pre-incubation, no matter the E-EGF concentration (Figure 5.4B). Of prime interest, the ELISA signals corresponding to E-EGF alone and E-EGF followed by E-VEGF incubation were similar, which indicates that E-VEGF did not displace previously captured E-EGF and that the coiled-coil capture was stable (see stability test in Figure 5.5). Altogether, the results demonstrate that a large number of Kcoil peptides remained available for E-VEGF recruitment, and thus that the saturation observed for E-EGF in Figure 5.2A was not due to a complete occupation of the Kcoil peptides: E-EGF did not reach maximal density but the ELISA reagents did, which was most likely due to their steric hindrance.

Simultaneous incubation of E-EGF and E-VEGF was also tested. Corresponding ELISA results (Figure 5.2B) showed that varying the incubation concentrations of both GFs resulted in the creation of various ratios of immobilized GFs. Of interest, the ELISA response at a given E-VEGF concentration was not significantly different when this GF was incubated alone (Figure 5.2A) or in combination with E-EGF (Figure 5.2B). On the contrary, the more E-VEGF in the solution, the less captured E-EGF on the surface. It is here noteworthy that E-VEGF was expressed as a homodimeric protein and thus bears 2 Ecoil tags (Murschel, Liberelle et al. 2013), whereas E-EGF is monomeric and has one Ecoil moiety only.(Boucher, St-Laurent et al. 2008) Our observations can therefore be explained by an avidity phenomenon that favors the grafting of E-VEGF over the grafting of E-EGF (Figure 5.1). The data obtained here by ELISA are in good agreement with previous surface plasmon resonance assays using Kcoil-decorated sensor chips: E-EGF displayed a steady though slow dissociation under continuous flow from the surfaces and could be regenerated by one pulse

of 6 M guanidium hydrochloride (Gnd-HCl) (Boucher, Liberelle et al. 2009). Oppositely, no dissociation was observed for E-VEGF. The overwhelming stability of Kcoil-mediated E-VEGF immobilization was further proven by incomplete regeneration after several pulses of 6 M Gnd-HCl.(Murschel, Liberelle et al. 2013)

The stability of coiled-coil interactions was tested by incubation in cell culture medium in the same conditions as those used for our cell culture experiments, the results are presented in Figure 5.5. E-VEGF was stable with a very high retention rate (between 59-94%) of the immobilized growth factor after both the 3-day and the 8-day treatment (comparable respectively to HUVEC or AoSMC survival tests) for incubation concentrations ranging from 1 to 20 nM. Of interest, the minimum of GF retention of 59% was observed after the 8-day treatment for E-VEGF incubation concentration of 0.1 nM. E-EGF showed to be less stable than E-VEGF, with retention rates between 23 and 63% after the 8-day treatment, and between 47 and 114% after the 3-day treatment. Overall, the fact that E-EGF is less stable than E-VEGF confirms E-VEGF multiple binding to Kcoil-functionalized surfaces due to a high avidity.

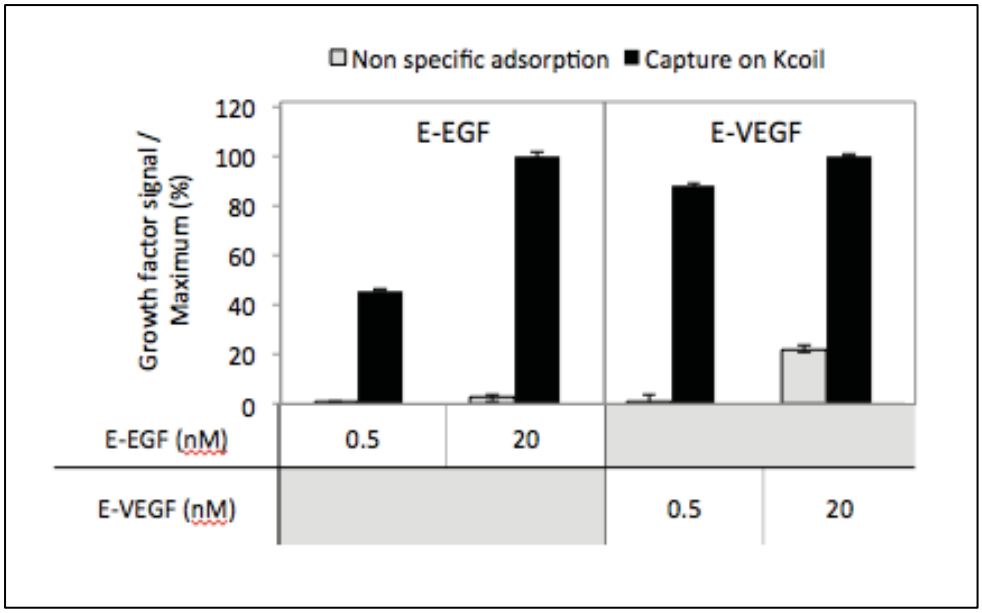



Figure 5.3 Non specific adsorption and coiled-coil mediated capture of E-EGF and E-VEGF on chondroitin sulfate. Relative ELISA signal as a function of growth factor incubation concentrations (Mean ± SD, n≥4)

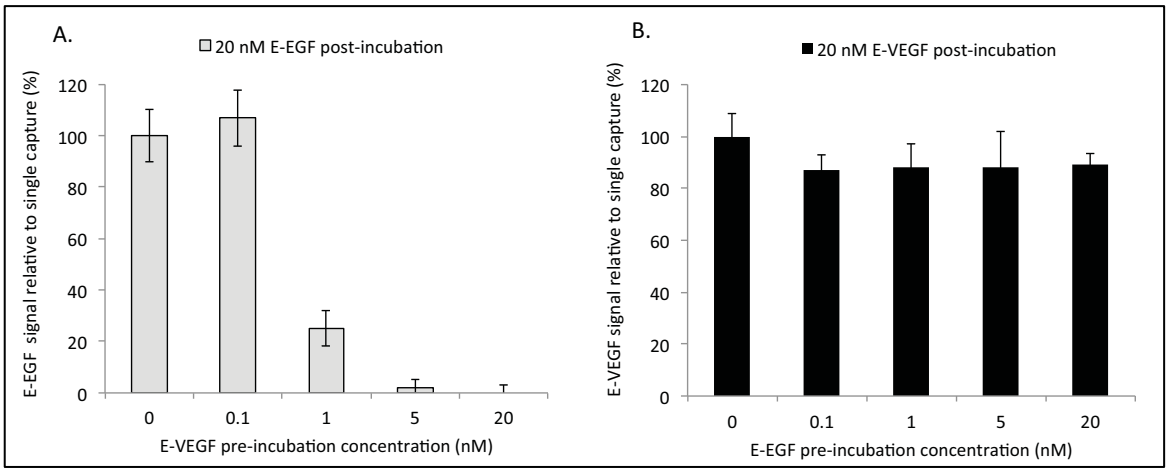



Figure 5.4 Sequential tethering of (A) 20 nM E-EGF or (B) 20 nM E-VEGF incubated over Kcoil-functionalized CS surfaces that had been pre-incubated with varying concentrations of (A) E-VEGF or (B) E-EGF. The data are presented as ELISA signal relative to a single capture of (A) 20 nM E-EGF and (B) 20 nM E-VEGF (without pre-incubation)

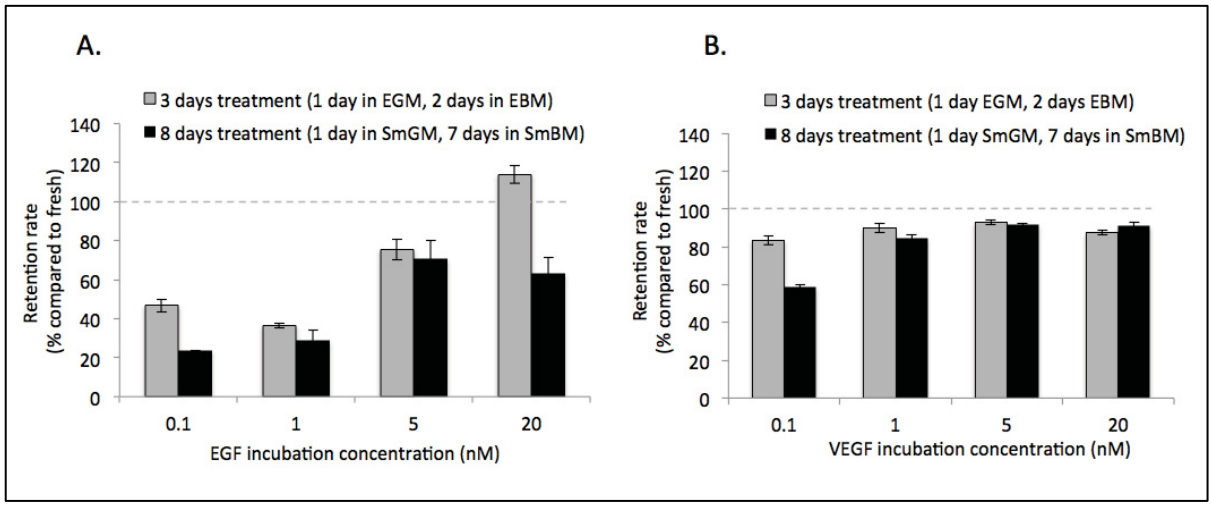



Figure 5.5 Stability assay. Relative retention rates of E-EGF (A) and E-VEGF (B) after 3-day or 8-day treatments in cell culture conditions estimated by direct ELISA. The retention rates of E-EGF and E-VEGF after the ageing treatments are expressed relatively to the signal obtained on fresh surfaces (Mean % ± SD, n≥3). 3-day treatment is comparable to HUVEC survival test: 1-day adhesion in complete medium EGM containing 2% FBS and 2-day

survival in basal EBM. 8-day treatment is comparable to AoSMC survival test, 1-day adhesion in complete medium SmGM containing 5% FBS and 7-day survival in basal SmBM

### 5.5.2 Bioactivity of immobilized growth factors

#### 5.5.2.1 HUVEC

HUVEC survival on E-EGF- and E-VEGF-decorated surfaces after 2 days in serum-free medium is presented in Figure 5.6, and cell morphology on selected surfaces is displayed in Figure 5.7.

The 48-h serum deprivation treatment significantly impacted the number of cells on control surfaces (CellBIND® culture plate and carbohydrazide aminated surfaces), as expected.(Murschel, Liberelle et al. 2013) Chondroitin sulfate, although known for its anti-apoptotic properties (Raymond, Desormeaux et al. 2004, Charbonneau, Ruiz et al. 2012), did not induce a significant increase in HUVEC survival when compared to the other controls (Figure 5.5). On GF-immobilized surfaces, a tremendous difference in trends was observed between the survival induced by E-EGF or by E-VEGF. The maximal survival observed with E-EGF functionalized surfaces was 17 ± 8 %, which was not significantly higher than that on bare CS surfaces (12 ± 4 %, $p = 0.99$). In contrast, on E-VEGF functionalized surfaces, cell survival increased progressively from 10 ± 4 % to 75 ± 9 % by increasing VEGF incubation concentration from 0.1 to 20 nM.

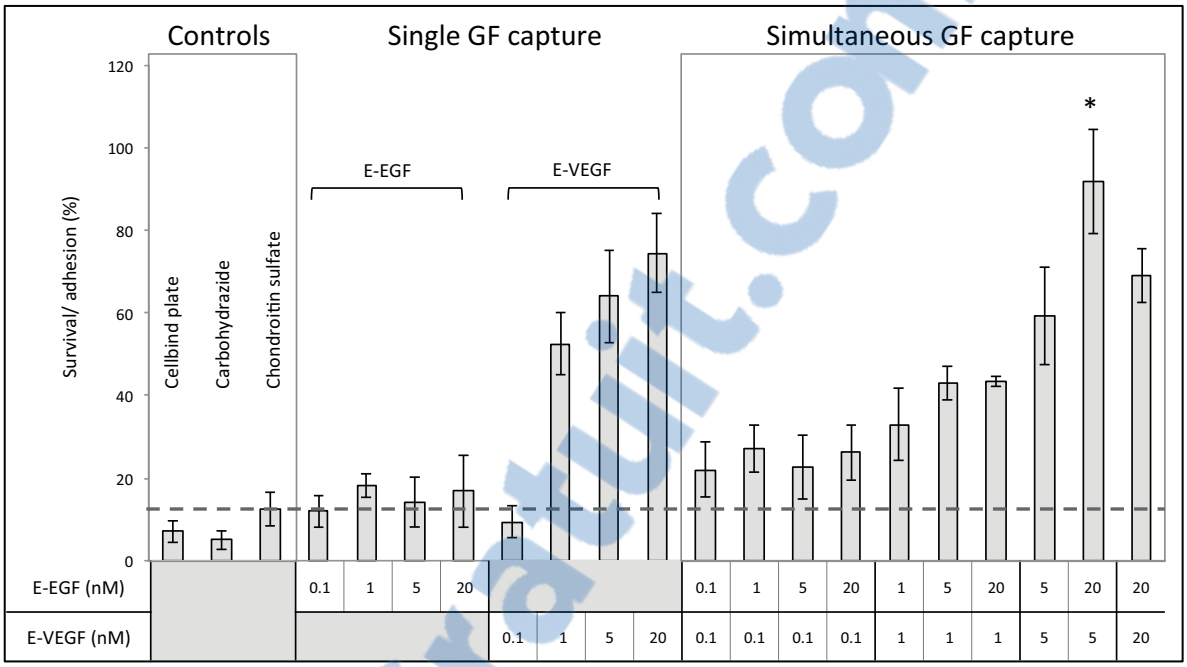



Figure 5.6 HUVEC survival after 2 days in serum-free medium. Ratio of metabolic activity estimated by resazurin assay at 2 days relative to initial adhesion (Mean ± SD; n = 12). *: Statistical difference with all other conditions ($p < 0.005$)

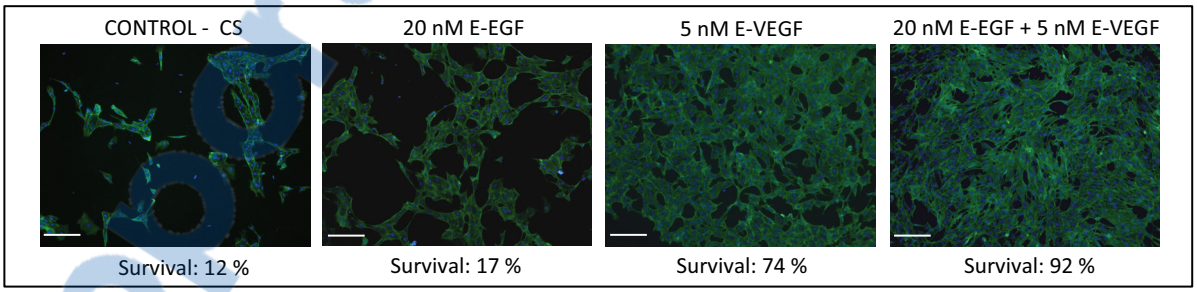



Figure 5.7 Morphology of HUVEC after 2 days in serum-free medium, actin and nucleus staining. Scale bar: 200 µm

The best survival (92 ± 12 %) was however observed for surfaces pre-incubated with a mixture of E-EGF (20 nM) and E-VEGF (5 nM), which was statistically higher than all other conditions ($p < 0.005$), including single capture of E-VEGF at 5 nM (64 ± 11 %) and of E-EGF at 20 nM (20 ± 9 %). These data suggested a synergistic effect of E-EGF and E-VEGF on the surfaces exposing the appropriate combination of both GFs, which led to the

Rapport-Gratuit.com

conservation of a quasi monolayer of HUVEC after the 48-h serum free treatment (Figure 5.7). Of interest, the mean single cell area was similar on all surfaces (Table 5.1).

Table 5.1 HUVEC single cell area after 2 days in serum-free medium (Mean ± SD; no statistical difference between groups)

| *Surface* | *CS* | *20 nM E-EGF* | *5 nM E-VEGF* | *20 nM E-EGF + 5 nM E-VEGF* |
|---|---|---|---|---|
| HUVEC area ($\mu m^2$) | 1211 ± 95 | 1422 ± 127 | 1358 ± 63 | 1265 ± 59 |

#### 5.5.2.2 AoSMC

AoSMC survival on surfaces decorated with E-EGF and E-VEGF after 7 days in serum-free medium is presented in Figure 5.8 and cell morphology on selected surfaces is shown in Figure 5.9.

Similarly to HUVEC, serum-free treatment affected AoSMC survival, however the time needed to get a significant decrease in metabolic activity was much longer than for HUVEC. After 7 days in serum-free conditions, AoSMC retention was similar on our controls and on CS surfaces, showing that anti-apoptotic properties of CS are not sufficient to induce long-term survival. As opposed to HUVEC, E-VEGF immobilization alone showed little enhancement of AoSMC survival (31 ± 5 % for surfaces incubated with E-VEGF at 20 nM compared to 20 ± 7 % for bare CS surfaces). However, as previously reported, the coiled-coil immobilization of E-EGF on CS led to a significant increase in cell survival,(Lequoy, Liberelle et al. 2014) and this pro-survival effect increased with the E-EGF incubation concentration (from 27 ± 12 % for 0.1-nM E-EGF to 53 ± 9 % for 20-nM E-EGF).

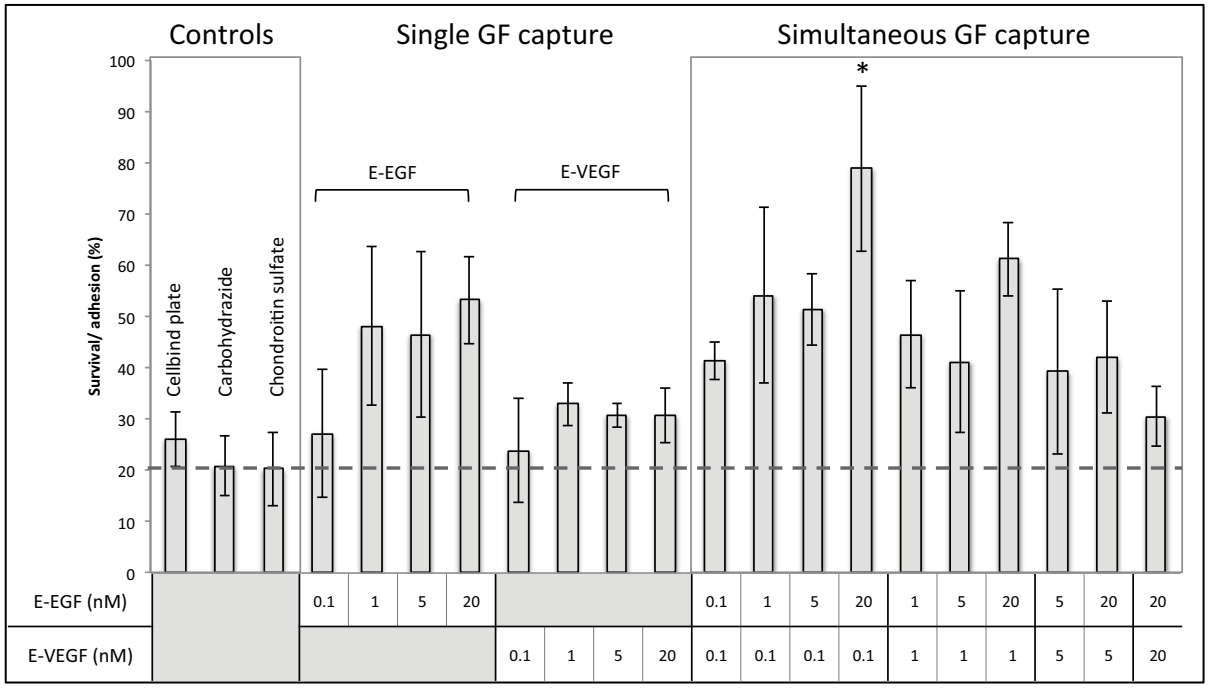



Figure 5.8 AoSMC survival after 7 days in serum-free medium. Ratio of metabolic activity estimated by resazurin assay at 7 days compared to initial adhesion (Mean ± SD; n = 12). *: Statistical difference with all other conditions ($p < 0.005$), except with the co-incubation of E-EGF 20 nM and E-VEGF 1 nM, ($p = 0.18$)

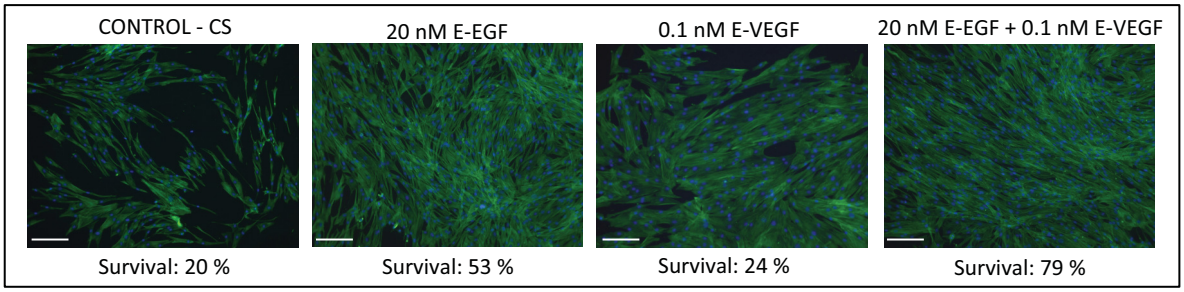



Figure 5.9 Morphology of AoSMC after 7 days in serum-free medium, actin and nucleus staining. Scale bar: 200 µm

Once again, a further increase in cell survival was observed for surfaces incubated with a mixture of GFs. Thus, the combination of 20 nM E-EGF and 0.1 nM E-VEGF led to 79 ± 16 % cell retention after 7 days in serum-free medium, whereas 20 nM E-EGF and 0.1 nM E-VEGF separately induced 53 ± 9 % and 24 ± 10 % cell survival, respectively. The pro-survival effect induced by this specific GF ratio was statistically higher than all others we

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

tested ($p < 0.005$), except for the combination of 20 nM E-EGF and 1 nM E-VEGF (62 ± 7 %, $p = 0.18$).

Of interest, on surfaces incubated with 0.1 nM E-VEGF, cell survival was lower than on 20 nM E-EGF and 20 nM E-EGF + 0.1 nM E-VEGF (Figures 5.8 and 5.9). However, the cell spreading (Table 5.2) was also higher on this surface ($p < 0.05$), so that the surface coverage by cells appeared relatively similar on the three surfaces (Figure 5.9). On CS, cell survival was similar to 0.1 nM E-VEGF, but cell spreading was lower, leading to a less extensive surface coverage.

Table 5.2 AoSMC single cell area after 7 days in serum-free medium (mean + SD). *: Statistical difference with 20 nM E-EGF and 20 nM E-EGF + 0.1 nM E-VEGF conditions ($p < 0.05$)

| *Surface* | *CS* | *20 nM E-EGF* | *0.1 nM E-VEGF* | *20 nM E-EGF + 0.1 nM E-VEGF* |
|---|---|---|---|---|
| AoSMC area ($\mu m^2$) | 2394 ± 160 | 2001 ± 97 | 3183 ± 439 * | 1864 ± 91 |

## 5.6 DISCUSSION

The characterization of bioactive surfaces involving grafted GFs is important to understand their biological outcomes. In this study, ELISA was used to assess the amounts of captured of Ecoil-tagged GFs on Kcoil-functionalized CS surfaces. ELISA is a common method to characterize GF immobilization.(Crombez, Chevallier et al. 2005, Shen, Shoichet et al. 2008, Masters 2011, Assal, Mie et al. 2013) However, in our case, the signal collected in direct ELISA was only semi quantitative since a saturation was observed for incubation concentrations higher than 5 nM and 1 nM for E-EGF and E-VEGF, respectively (**Error! Reference source not found.**). Several studies using a similar direct ELISA method did not report any saturation of the signal,(Crombez, Chevallier et al. 2005, Anderson, Chen et al. 2009, Assal, Mie et al. 2013) in contrast, Shen et al. also observed a detection limit of direct ELISA for samples with high quantities of covalently immobilized VEGF in a collagen

scaffold.(Shen, Shoichet et al. 2008) Our first hypothesis is that the saturation was due to steric hindrance of anti-EGF antibodies, anti-VEGF antibodies or horseradish peroxidase enzyme. This suggests that the coil-coil system enabled to achieve high GF surface densities. Indeed, in a previous study, we observed that the coiled-coil mediated EGF immobilization allowed higher capture efficiencies compared to covalent grafting.(Lequoy, Liberelle et al. 2014) Another explanation for the signal saturation we observed, especially in the case of E-VEGF, could be a saturation of the Kcoil units on CS, since the secondary capture of E-EGF on surfaces pre-incubated with E-VEGF at concentrations higher than 5 nM did not occur (Figure 5.4A). Despite these limitations in GF quantification due to signal saturation, our results unambiguously showed that the coiled-coil tethering strategy enabled the oriented immobilization of two GFs at different surface densities on CS via a simultaneous incubation.

As stated in the introduction, several studies have explored the potential benefits of GF combination, either by covalent grafting (Stefonek-Puccinelli and Masters 2008, Chiu and Radisic 2010), progressive release from a polymer scaffolds or nanoparticles (Richardson, Peters et al. 2001, Hao, Silva et al. 2007, Chen, Zhang et al. 2010, Sun, Shen et al. 2011), capture by matrix (Almodovar, Guillot et al. 2014) or oriented tethering (Assal, Mie et al. 2013). To our knowledge, most studies were however focused on testing combinations of different GF at fixed concentrations, rather than varying their relative amounts and studying the biological effect brought by specific ratios. Recently, Almodovar and colleagues have used a microfluidic device to study the effect of gradients of BMP-2 and BMP-7 in layer-by-layer films of poly(L-lysine) and hyaluronan. The authors have observed an additive or synergistic effect of both GFs for myoblast differenciation (Almodovar, Guillot et al. 2014). Our coiled-coil based strategy, in addition to ensuring an oriented and stable GF display, allowed us to control the captured amounts of each of them by simply adjusting their concentration within the incubation mix ('simultaneous incubation'). This is of salient interest since we did not only demonstrated the benefits of GF combination but also that the HUVEC and AoSMC responses were maximal for distinct combinations of GF amounts (Figures 5.6 and 5.8).

Indeed, the combination of EGF and VEGF increased the biological response of both HUVEC and AoSMC when compared to each GF being tethered separately. Specific ratios of GFs allowed maximal efficiency either for AoSMC survival (20 nM E-EGF + 0.1 nM E-VEGF) or for HUVEC survival (20 nM E-EGF + 5 nM E-VEGF), suggesting that this approach is an interesting strategy to fine-tune cell response around vascular implants or tissue engineering scaffolds.

Two hypotheses can be drawn to explain the observed synergy. Our first hypothesis is that co-immobilized GFs simultaneously interact with their respective cell receptors and this co-stimulation triggers enhanced cells survival. Indeed, in the literature, both GFs are known to trigger PI3K/Akt and RAS/ERK pathways involved in cell survival (Ciardiello, Troiani et al. 2006, Dreux, Lamb et al. 2006, Hung, Wu et al. 2009). The observed synergy could thus be due to the increased signaling in these pathways via simultaneous EGF receptor and VEGF receptor activation, leading to an increased cell response. In a recent study, Assal et al. have shown that a combination of bFGF, EGF and VEGF led to higher angiogenesis than isolated GFs, however their study did not specifically study EGF/VEGF synergy in detail (Assal, Mie et al. 2013).

In the case of AoSMC, this hypothesis is supported by the fact that both GFs enhanced cell survival (Figure 5.8). Separately, E-VEGF and E-EGF enhanced survival by up to 15 % and 35 %, respectively, whereas their optimal combination enhanced survival by 60 % compared to control surfaces. This hypothesis is however less plausible in the case of the HUVEC given that, in contrast to a report by Yang et al. (Yang, Zhou et al. 2014), our results did not show that E-EGF alone was sufficient to trigger survival. The influence of EGF on HUVEC is not consensual in the literature. Some studies state that non-tumor endothelial cells do not possess EGF receptors, or at least that EGFR is not expressed at levels that are high enough for detection (Hirata, Ogawa et al. 2002, Amin, Hida et al. 2006). On the contrary, Semino et al. identified that the EGF signalling cascade is essential to promote VEGF-induced morphogenesis of HUVEC and that, while the VEGF pathway stimulates HUVEC proliferation, the EGF pathway influences HUVEC migration (Semino, Kamm et al. 2006).

The synergy observed with E-EGF and E-VEGF on HUVEC survival is thus difficult to relate to the EGF receptor activation.

This brings us to our second hypothesis, which is centered on the spatial organization of our immobilized GF on the surface. One GF, although possessing little or no bioactivity on the targeted cells, could enhance the spatial orientation of the second GF by acting as a 'filler' on the surface, which may in turn favor the interactions between the other GF and cell receptors. This phenomenon of a bioinert species allowing an active protein to reach higher activity has previously been observed by Kumada et al. (Kumada, Shiritani et al. 2009).

To precisely establish the role of both GFs in the observed synergy, a thorough examination of activated pathways would be necessary, for example by quantifying the levels of activation of PI3K/Akt and RAS/ERK in cells which EGF or VEGF receptors would have been previously blocked.

In the system we have here explored, E-EGF and E-VEGF immobilization was stable enough for us to observe a sustained AoSMC survival for 7 days, despite repeated medium changes. As presented in Figure 5.5, the stability of E-VEGF was higher than that of E-EGF, probably due to the presence of two Ecoil-moieties on the E-VEGF homodimer, that leads to a higher avidity of the Kcoil-functionalized surface and a lower probability of release since both coiled-coil complexes would have to detach simultaneously for the E-VEGF to be released. Despite the lower E-EGF stability observed in Figure 5.5 compared to E-VEGF, immobilized E-EGF was able to induce AoSMC survival over 7 days for incubation concentrations as low as 1 nM (Figure 5.8). Compared to other coiled-coil systems, our approach has the advantage to be more stable (characterized by an apparent dissociation constant, $K_D$, of $6.10^{-11}$ M (De Crescenzo, Litowski et al. 2003)) compared to (i) natural affinity of GF for ECM components (e.g. VEGF affinity for heparin is characterized by a $K_D$ of $2.10^{-8}$ M calculated from (Anderson, Shergill et al. 2011)), and (ii) the coiled-coil structures used by Assal et al. (Assal, Mie et al. 2013) developped by O'Shea et al. ($K_D$ of $3.10^{-8}$ M calculated from (O'Shea, Lumb et al. 1993)). The especially high affinity observed

for the Ecoil/Kcoil system could prevent surface degradation upon GF/cell receptor interaction since the affinity of VEGF for its receptor is lower than the Ecoil/Kcoil affinity ($K_D$ of $4.10^{-10}$ M calculated from (Anderson, Shergill et al. 2011)).

Of interest, our system is very adaptable, allowing the stability of protein tethering to be tailored for precise clinical needs by changing the motif of the Kcoil or Ecoil units. More precisely, the stability of the coiled-coil structure can be lowered by shortening the amino acid sequence (Litowski and Hodges 2001, De Crescenzo, Litowski et al. 2003) or substituting selected residues in the hydrophobic core. (Litowski and Hodges 2002) Controlled, progressive release of multiple GFs with different kinetics could thus be achieved, if needed. This could prove very interesting to mimic human tissue healing, where multiple GFs act successively. (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008, Rice, Martino et al. 2013)

## 5.7 CONCLUSION

This work highlights the potential of coiled-coil oriented tethering for co-immobilization of multiple GFs so as to optimize biological properties of surfaces for specific needs. Our results with the co-immobilization of EGF and VEGF on CS clearly demonstrated the possibility to adjust GF immobilization to direct a particular cell response, here the survival of endothelial or smooth muscle cells. Our work also highlights the use of our coiled-coil tethering system as a platform to help understand possible redundancy, competition or synergy existing among GFs towards the creation of smart biomaterials controlling the fate of targeted cells.

Of prime interest, the simultaneous capture of the two GFs allowed us to reach higher levels of cell survival when compared to each GF being captured on its own. These promising results suggest a synergy between EGF and VEGF to trigger survival pathways. A possible application of the coiled-coil co-immobilization of EGF and VEGF could be the design of coatings for vascular grafts improving SMC survival on the abluminal side and HUVEC survival on the luminal side.

**Acknowledgments**

The authors would like to thank Samantha Noel for her judicious comments during manuscript writing and her help with cell area measurements. This study was funded jointly by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (CPG 127764) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)(PRCS 446571).

# CHAPITRE 6

# DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ce projet de doctorat, des revêtements bioactifs ont été développés dans l'objectif d'améliorer la guérison autour des endoprothèses couvertes utilisés pour le traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale. En effet, l'efficacité de ce traitement est aujourd'hui limitée par l'apparition tardive de complications, principalement les endofuites ou la migration de l'EC, conduisant à des ré-interventions dans les 4 ans qui suivent l'implantation chez 10 à 30 % des patients (De Bruin, Baas et al. 2010, Zhou, Blay et al. 2014). Pour pallier le manque de guérison, nous avons ciblé deux axes: contrer les conditions pro-apoptotiques de l'anévrisme ainsi que le déficit en CMLV, et modifier les propriétés de surface des matériaux hydrophobes utilisés pour les EC.

## Revêtement obtenu par immobilisation aléatoire d'EGF sur CS

Des travaux préalables réalisés par Cindy Charbonneau au laboratoire du Pr Sophie Lerouge ont établi que: i) la chondroitine sulfate et le facteur de croissance de l'épiderme étaient des facteurs anti-apoptotiques pour les CMLV, ii) ces deux biomolécules pouvaient être immobilisées sur du PET par le biais d'un revêtement aminé et que iii) le revêtement ainsi créé permettait d'améliorer la survie des CMLV de rat en milieu sans sérum.

Dans une première étape de ce projet (CHAPITRE 3), dans la lignée des travaux existants, nous avons démontré la bioactivité du revêtement avec des types cellulaires plus proches de la problématique clinique en réalisant des tests *in vitro* avec des CMLV et des fibroblastes aortiques humains. Dans le but de réaliser des essais *in vivo* pour tester l'apport du revêtement en termes de guérison dans un anévrisme, le revêtement a été transféré sur des substrats en ePTFE (membranes puis endoprothèse couverte). Cette étape a permis de démontrer que le revêtement était transférable sur tout type de substrat, y compris le PTFE qui est extrêmement hydrophobe et chimiquement inerte, sans avoir à modifier le protocole

Rapport-Gratuit.com

de dépôt. Cette preuve de concept montre la polyvalence d'une modification de surface par plasma (ici, le dépôt de L-PPE:N) par rapport à la chimie en solution, et son utilité pour de potentielles applications industrielles. Pour compléter l'évaluation de la faisabilité d'un transfert vers l'industrie, des tests préliminaires de stérilisation ont été effectués (travaux présentés à l'ANNEXE I). Les résultats ont montré que le L-PPE:N s'oxyde lors les traitements testés à base de peroxyde d'hydrogène et/ou d'ozone (Sterrad® et Optreoz®, disponibles au CHUM Notre Dame et utilisés habituellement pour le reconditionnement d'instruments médicaux). Au contraire, le greffage de CS sur L-PPE:N semble stabiliser le revêtement puisque les propritétés physico-chimiques du revêtement L-PPE:N+CS ne sont pas impactées par ces traitements de stérilisation malgré leur fort potentiel oxydant. Pour poursuivre cette problématique, des tests cellulaires devraient être effectués afin de vérifier que la stérilisation ne cause pas de modification de la biocompatibilité du revêtement. De plus, la stérilisation par rayons gamma devrait être incluse à l'étude puisqu'elle est moins oxydante (elle pourrait ainsi convenir à la stérilisation du L-PPE:N) et qu'il s'agit d'une technique répandue en industrie pour la stérilisation des dispositifs médicaux.
Toujours dans l'optique d'étudier la faisabilité d'une application industrielle, des tests de stabilité du revêtement L-PPE:N+CS+EGF présentés dans le CHAPITRE 3 ont montré une bonne conservation de sa bioactivité après une période de stockage d'un mois dans différentes conditions (20°C à sec, 4°C à sec, 37°C dans du tampon phosphaté à pH physiologique), ce qui est très encourageant pour une production industrielle puisqu'un dispositif médical doit être stable durant la période de stockage (*'shelf-life'*) entre la fabrication et l'implantation. Cependant, la stérilisation sur les revêtements avec facteur de croissance est une problématique complexe puisque ces protéines sont très sensibles (ex. oxydation, chaleur) et que toute dénaturation entrainerait une diminution ou une perte de leur bioactivité. Le dialogue avec des industriels du domaine biomédical pourrait nous aider à déterminer si un mode de production stérile serait envisageable, par exemple en salle blanche, à base de produits stériles.

Des tests *in vivo* ont été réalisés dans un modèle précédemment développé par le Dr Soulez et le Pr Lerouge, qui reproduit la géométrie des anévrismes par ajout d'un patch veineux sur les

artères iliaques, permettant ainsi de tester 2 échantillons par animal (1 contrôle, 1 bioactif). Dans ce modèle, des fuites de type I ont été créées au collet lors de l'implantation à l'aide d'un cathéter ballon par déformation de l'EC et création d'une mauvaise apposition de l'EC sur le vaisseau. La présence du revêtement bioactif CS+EGF sur la surface extérieure de l'EC a permis une meilleure guérison dans la cavité anévrismale comparé à l'EC contrôle en ePTFE. Cependant, l'observation des sections d'anévrismes après explantation a démontré que tous les anévrismes présentaient encore une fuite après 3 mois. Le revêtement n'a donc pas permis de traiter les endofuites de type I dues à une déformation initiale de l'EC au collet. Malgré l'existence de modèles reproduisant le contexte pathologique des AAA basés sur des traitements chimiques (chlorure de calcium) ou enzymatiques (élastase) (Dobrin 1999, Trollope, Moxon et al. 2011, Zaragoza, Gomez-Guerrero et al. 2011), aucun modèle ne permet actuellement d'induire l'apparition tardive d'endofuites pour imiter les complications cliniques de l'EVAR. Les endofuites étant des complications fréquentes mais pas systématiques, la complexité des phénomènes qui sont liés à leur apparition les rend difficiles à prévoir et à reproduire. En particulier, les fuites de type I qui se développent aux collets peuvent être liées à une structure tortueuse de l'artère, à un défaut d'apposition de l'EC sur la paroi (ex. zone d'attache trop courte ou force radiale insuffisante) (Baum, Stavropoulos et al. 2003), ou encore à la progression de la pathologie anévrismale aux tissus initialement sains des collets, ce qui est très difficile à modéliser. Notre hypothèse initiale était qu'un revêtement bioactif ayant un effet anti-apoptotique et favorisant la guérison pourrait permettre de ralentir ou éviter la progression de la maladie aux collets de l'anévrisme et ainsi avoir une action préventive sur l'apparition tardive d'endofuites de type I, cependant nous n'avons pas pu observer ce possible effet préventif durant les tests *in vivo* réalisés à cause des limites techniques du modèle, qui nous a seulement permis de tester la capacité du revêtement à guérir l'anévrisme en présence d'une fuite existant dès l'implantation.

***Recommandation*** *: Lors de futurs tests in vivo, le potentiel de guérison du revêtement bioactif devrait être évalué dans un modèle reproduisant le contexte pathologique des AAA sans créer d'endofuite à l'implantation.*

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

**Immobilisation orientée avec système de superhélices complémentaires *coiled-coil***

L'une des conclusions de la première étape du projet a été que le revêtement, malgré les bons résultats obtenus *in vitro*, n'avait pas suffi à établir une preuve de concept concluante dans le modèle utilisé pour les tests *in vivo*. Outre les limites du modèle *in vivo* utilisé, une bioactivité insuffisante du revêtement pourrait également être impliquée dans la guérison incomplète observée. Or l'immobilisation covalente utilisée dans le CHAPITRE 3 présente le désavantage de mener à une orientation aléatoire de l'EGF, ce qui nuit à la bioactivité du revêtement. Cela nous a amenés à évaluer une méthode d'immobilisation orientée, développée au laboratoire du Pr De Crescenzo, qui améliore la bioactivité des facteurs de croissance immobilisés par rapport à l'immobilisation covalente (Liberelle, Boucher et al. 2010). Nous avons donc développé un protocole qui permet de réaliser la capture orientée de l'EGF sur la chondroitine sulfate via le couple de peptides à haute affinité Ecoil-Kcoil. En effet, une réaction directe entre CS et Kcoil, qui comporte 10 amines primaires sur ses résidus lysines, n'était pas envisageable puisqu'elle aurait conduit à une orientation aléatoire du Kcoil et potentiellement une diminution de la force de l'interaction du peptide avec son partenaire (le peptide Ecoil). L'étiquette cystéine (comportant un groupement thiol, -SH) du Kcoil a donc été utilisée pour attacher le peptide Kcoil de façon covalente et orientée sur CS via un bras espaceur bifonctionnel (*linker*), l'EMCH. Celui-ci comporte en effet un groupement hydrazine capable de réagir avec les carboxyles de la CS et un groupement maléimide qui se lie de façon sélective avec le thiol de la cystéine. Le protocole utilisé a permis une capture d'EGF d'une efficacité bien supérieure à celle observée avec un greffage covalent par chimie carbodiimide (CHAPITRE 4), et a également permis par la suite d'immobiliser simultanément deux facteurs de croissance, EGF et VEGF, de façon orientée (CHAPITRE 5). Cependant, l'étiquette cystéine fixée sur le Kcoil peut s'oxyder, conduisant à la formation de dimères de Kcoil et rendant le greffage de Kcoil moins efficace, tel qu'observé par Samantha Noël, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Pr De Crescenzo (Noel 2015). D'autres étiquettes, comportant des groupements azoture ($R\text{-}N^-$) ou alcyne

(triple liaison carbone-carbone), pourraient être testées pour remplacer la cystéine pour le greffage du Kcoil (Camarero 2008).

En ce qui concerne les peptides Ecoil et Kcoil, le système utilisé est très stable et résiste à la présence d'urée, un agent dénaturant courant en biochimie, ainsi qu'à des variations de température importantes (Chao, Bautista et al. 1998). Cependant, en fonction de l'application, une libération progressive peut être souhaitable, en particulier pour permettre à plusieurs facteurs de croissance d'agir successivement. L'ajustement de la longueur et de la séquence des peptides Ecoil et Kcoil pourrait permettre d'obtenir une gamme de stabilités (Litowski and Hodges 2001, Litowski and Hodges 2002, De Crescenzo, Litowski et al. 2003).

D'autre part, pour d'éventuelles applications *in vivo*, plusieurs aspects restent à étudier, en particulier l'immunogénicité et la toxicité (locale et systémique) d'Ecoil et Kcoil. De plus, l'hémocompatibilité du revêtement incluant le bras espaceur EMCH et les deux peptides coil pourrait être différente de celle du revêtement de CS seule qui a montré une faible adhésion plaquettaire (Thalla, Fadlallah et al. 2014).

***Recommandation :*** *Pour de futurs projets d'ingénierie tissulaire, les séquences des peptides Ecoil et Kcoil pourraient être modifiées de façon à obtenir une libération progressive. De plus, une étude concernant l'immunogénicité, la toxicité des peptides et l'hémocompatibilité du revêtement serait nécessaire pour envisager des applications in vivo.*

**Utilisation de chondroitine sulfate dans des revêtements bioactifs pour EC**

Dans la littérature, des études ont démontré que la CS faisait partie des médiateurs anti-apoptotiques relargués par les cellules endothéliales apoptotiques pour induire la protection des CMLV (Raymond, Desormeaux et al. 2004, Laplante, Raymond et al. 2005). De plus, la CS immobilisée avait également montré des propriétés anti-apoptotiques sur CMLV pour une période de 24h (Charbonneau, Ruiz et al. 2012).

À travers l'étude de plusieurs revêtements à base de CS (CS+EGF covalent, CS+EGF orienté, CS+EGF/VEGF orientés), ce projet a permis de mieux comprendre la portée de sa bioactivité. Tout d'abord, la limite de son pouvoir anti apoptotique a été soulignée. En effet, lors de nos tests réalisés sur une période de 7 jours en milieu sans sérum, l'activité anti apoptotique de CS n'était plus détectable au-delà de 3 jours. En effet, aucune amélioration de la survie des CMLV n'a été observée comparé aux contrôles (surface aminée et polystyrène traité pour la culture cellulaire) après 3, 5 et 7 jours en milieu sans sérum (CHAPITRE 4).

Dans le cadre d'un revêtement visant à améliorer la survie des CMLV à long terme, il est important que l'activité anti-apoptotique soit durable. Il apparait donc que la CS seule n'est pas suffisante et que sa combinaison à une autre molécule bioactive, telle qu'un facteur de croissance est indispensable à l'acquisition de propriétés anti-apoptotiques durables. Dans la littérature, les revêtements comprenant seulement des peptides ou molécules adhésives de la MEC (ex. peptide RGD, laminine, fibronectine, collagène), permettent d'améliorer l'adhésion des cellules sur les biomatériaux mais sont souvent insuffisantes pour induire des comportements cellulaires complexes tels que l'angiogénèse ou l'endothélialisation (Zisch, Schenk et al. 2001, Nillesen, Geutjes et al. 2007, Shen, Shoichet et al. 2008, Assal, Mie et al. 2013). Une démarche biomimétique pour permettre d'orienter le développement cellulaire de façon équilibrée devrait ainsi comprendre plusieurs molécules à l'action complémentaire et pas uniquement une molécule encourageant l'adhésion des cellules: dans l'organisme, la MEC sert non seulement de support à la croissance des cellules mais également de réservoir à facteurs de croissance.

Cependant, malgré des propriétés anti-apoptotiques limitées, les avantages de CS en tant que sous-couche pour l'immobilisation de facteurs de croissance ont pu être identifiés. Dans la littérature, il a été montré que CS possède des propriétés antiadhésives pour certaines protéines du plasma telles que l'albumine, le fibrinogène, les IgG et le kininogène (Keuren, Wielders et al. 2003, Thalla, Fadlallah et al. 2014). Dans le CHAPITRE 4, nous avons donc comparé la CS à un autre polysaccaride possédant des propriétés antiadhésives pour les protéines, le dextran carboxyméthylé (CMD). Il est apparu que malgré le fait que les deux

polysaccharides possèdent des propriétés antiadhésives, leur capacité à promouvoir l'adhésion des cellules est très différente. En effet, la CS permet une bonne adhésion des cellules vasculaires alors que le CMD conduit à une très faible adhésion cellulaire, et cette différence reste visible lorsque l'EGF est immobilisé sur les deux polysaccharides à une densité surfacique identique. En particulier, ce dernier résultat montre que les interactions entre l'EGF et les récepteurs cellulaires ne sont pas suffisantes pour permettre l'adhésion et la survie des CMLV sur le CMD. Une hypothèse permettant d'expliquer cette différence de comportement sur CS et CMD serait l'activation de processus d'adhésion spécifiques dans le cas de CS (absents sur une surface totalement antiadhésive comme le CMD) qui permettent par la suite au facteur de croissance de se lier à son récepteur et ainsi déclencher les voies de signalisation permettant la survie. Nos résultats soulignent donc les limites d'un revêtement totalement antiadhésif dans une utilisation comme sous-couche pour le greffage de facteurs de croissance et concordent avec l'étude de Klenker et al. montrant des difficultés pour obtenir une couverture cellulaire satisfaisante lorsque l'EGF est immobilisé sur du PEG, un polymère hydrophile antiadhésif (Klenkler, Chen et al. 2008). Les résultats obtenus durant ce projet ont été complétés par une étude avec un autre étudiant au doctorat, Pradeep Thalla, qui a montré une faible adsorption non spécifique de protéines du plasma sanguin, une faible adhésion et activation des plaquettes sanguines sur les revêtements de CS (comparables à celles observées avec le PEG et le CMD), ainsi qu'une meilleure adhésion des cellules (aire cellulaire supérieure et création de points focaux d'adhésion) et une résistance au flux améliorée de cellules endothéliales adhérées sur le revêtement de CS comparé au PEG ou au CMD (Thalla, Fadlallah et al. 2014).

Le processus d'adhésion cellulaire observé sur CS pourrait s'expliquer par l'interaction entre CS et des récepteurs membranaires (ex. intégrines) et/ou par l'adsorption sélective sur CS de protéines favorisant d'adhésion cellulaire. Dans la littérature, l'interaction de CS avec les intégrines n'est pas clairement identifiée, puisque certaines études ont démontré que les protéoglycanes à base de chondroitine sulfate interagissent avec les intégrines $\alpha_4\beta_1$ (Iida, Meijne et al. 1998), alors que d'autres études semblent indiquer un mode d'action indépendant des intégrines (Ernst, Zanin et al. 1995), potentiellement via un récepteur

protéine tyrosine phosphatase (PTPσ) (Shen, Tenney et al. 2009). Une étude approfondie de l'interaction entre CS et les intégrines ainsi que de l'adsorption des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (fibronectine, vitronectine, laminine, etc.) sur des surfaces de CS pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'adhésion cellulaire sur nos revêtements.

Sélectionnée initialement pour ses propriétés anti-apoptotiques, l'utilisation de CS comme sous-couche dans le revêtement bioactif nous a en outre permis d'atteindre un compromis entre la répulsion des protéines du plasma et l'adhésion des cellules en une seule étape. Généralement, les études de la littérature cherchant à atteindre ce compromis visent également à favoriser l'adhésion sélective des cellules endothéliales par rapport à celle des CMLV pour favoriser l'endothélialisation des prothèses vasculaires de petit diamètre afin d'éviter la re-sténose causée par la prolifération de CMLV sur la surface luminale de l'implant. Pour cela, elles utilisent généralement deux étapes, avec un greffage successif de polymères anti adhésifs (ex. PEG) puis de peptides d'adhésion sélectifs (ex. REDV, CAG, YIGSR) (Taite, Yang et al. 2008, Wei, Ji et al. 2011, Kanie, Narita et al. 2012, Noel, Hachem et al. 2015). Toutefois une étude d'Hoshi et al. propose un protocole de greffage d'héparine (une seule étape, tout comme pour notre greffage de chondroitine sulfate), tirant ainsi profit des propriétés d'adhésion sélectives de l'héparine favorisant la prolifération des cellules endothéliales mais pas celle des CMLV (Majack and Clowes 1984, Reilly, Kindy et al. 1989, Hoshi, Van Lith et al. 2013). Dans notre cas, l'utilisation de l'héparine n'était pas envisageable puisque les CMLV sont des cellules cruciales pour la colonisation cellulaire autour des EC, tel que présenté dans le CHAPITRE 1. De plus, l'héparine possède une affinité pour certains facteurs de croissance (dont VEGF)(Zhao, McCallum et al. 2012, Vulic and Shoichet 2014), ce qui compliquerait l'interprétation de nos résultats liés à une immobilisation contrôlée utilisant le système *coiled-coil*.

Dans une perspective à plus long terme, l'un des points importants qui n'a pas été étudié jusqu'à présent et qui serait indispensable pour une approbation en clinique est

l'immunogénicité de la CS d'origine bovine utilisée dans ce projet. En particulier, les risques de transmission de prions et de réaction immunitaire au corps étranger doivent être éliminés.

***Recommandation :*** *À court terme, l'interaction de la chondroitine sulfate avec les cellules devrait être étudié. En particulier, l'implication d'un ou des récepteurs intégrines dans l'adhésion des cellules sur CS devrait être élucidée. À plus long terme, pour envisager des applications cliniques, l'effet immunogène de CS devrait être testé.*

**Co-immobilisation de plusieurs facteurs de croissance**

Les processus biologiques complexes tels que la guérison impliquent de nombreuses biomolécules (Bennett and Schultz 1993, Barrientos, Stojadinovic et al. 2008). Dans une démarche biomimétique, l'utilisation de plusieurs facteurs de croissance pour la création d'implants bioactifs ou de matrices pour l'ingénierie tissulaire présente donc un immense potentiel comparé à l'intégration d'une seule biomolécule/facteur de croissance et a suscité un intérêt grandissant durant les dernières années (Nillesen, Geutjes et al. 2007, Chen, Zhang et al. 2010, Sun, Shen et al. 2011, Wylie, Ahsan et al. 2011, Assal, Mie et al. 2013).

Dans le CHAPITRE 5, l'EGF et le VEGF ont été co-immobilisés de façon orientée grâce au système de superhélices complémentaires '*coiled-coil*'. Ces deux facteurs de croissance ont été choisis en raison de leur potentiel pour induire la survie des cellules vasculaires. En particulier, EGF est connu pour son effet anti-apoptotique sur les cellules CMLV et VEGF pour son effet sur les cellules endothéliales, mais les propriétés croisées (EGF-cellules endothéliales et VEGF-CMLV) sont peu caractérisées dans la littérature. Notre étude a démontré la possibilité de co-immobiliser ces deux facteurs de croissance et de contrôler le ratio entre les facteurs de croissance par simple variation des concentrations de co-incubation. Nous avons pu observer un effet synergique d'EGF et VEGF sur la survie des cellules endothéliales et des CMLV pour certains ratios EGF/VEGF (en particulier, le ratio EGF 20 nM - VEGF à 0.1 nM a conduit à un effet synergique sur la survie des cellules endothéliales et le ratio EGF 20 nM- VEGF 5 nM sur les CMLV). La sensibilité de l'effet

synergique observée en fonction du ratio des facteurs de croissance n'avait à notre connaissance jamais été étudiée. En effet, dans la littérature, la plupart des études utilisant plusieurs facteurs de croissance pour la construction de biomatériaux utilisent une immobilisation covalente (Stefonek-Puccinelli and Masters 2008, Chiu and Radisic 2010) ou un relargage par diffusion à partir de matrices 3D (Richardson, Peters et al. 2001, Hao, Silva et al. 2007, Chen, Zhang et al. 2010, Sun, Shen et al. 2011). À notre connaissance, les études les plus proches de celle présentée au CHAPITRE 5, sont celles d'Assal et al. (immobilisation orientée de plusieurs facteurs de croissance dont EGF et VEGF, étude de la prolifération des cellules endothéliales (Assal, Mie et al. 2013)) et d'Almodovar et al. (variation du ratio entre deux facteurs de croissance et observation d'un effet synergique (Almodovar, Guillot et al. 2014)).

Assal et al. ont utilisé un système d'immobilisation orientée par hélices complémentaires proche de celui employé dans notre projet pour fixer EGF, VEGF et FGF sur molécule chimère imitant la MEC, et leur impact combiné sur la morphogénèse des HUVEC (Assal, Mie et al. 2013). Ils ont ainsi démontré que l'utilisation de ces trois facteurs de croissance menait à la prolifération des cellules endothéliales, ainsi qu'à l'organisation des cellules en structure similaire à des vaisseaux capillaires. En particulier, ils ont montré que les facteurs de croissance dans les combinaisons FGF+VEGF, FGF+EGF, FGF+VEGF+EGF conduisaient à une meilleure prolifération que VEGF seul. Cependant, leur étude ne faisait pas varier les ratios entre les facteurs de croissance utilisés et n'a pas permis d'identifier si certains ratios d'EGF et VEGF permettaient d'obtenir une bioactivité améliorée ou un effet additif par rapport à chaque facteur étudié séparément.

Almodovar et al. ont pour leur part utilisé un dispositif microfluidique pour faire varier le ratio entre deux facteurs de croissance utiles pour la régénération osseuse, BMP-2 et BMP-7. La capture de ces deux facteurs de croissance était basée sur leur affinité pour la poly-L-lysine et l'acide hyaluronique. Ils ont ainsi montré que certains ratios de facteurs de croissance favorisaient la trans-différenciation ostéogénique des cellules myoblastes grâce à un effet synergique.

Jusqu'à présent, l'effet synergique d'EGF et VEGF n'avait jamais été étudié en détail pour une application dans le domaine des biomatériaux. Notre étude présente donc une première étape pour la compréhension du rôle des différents facteurs de croissance dans la survie des cellules vasculaires et leur application potentielle pour la création d'implants bioactifs à l'action ciblée. Pour précisément identifier l'origine de la synergie observée, un suivi de l'activation des voies de signalisation menant à la survie cellulaire (notamment MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt) en présence des deux facteurs de croissance à différents ratios serait nécessaire. En particulier, le blocage de l'un des récepteurs cellulaires (EGFR ou VEGFR) avant l'exposition des cellules aux surfaces bioactives permettrait d'élucider si la synergie observée est liée à un effet stérique ou à l'activation des deux récepteurs en simultané, tel que discuté dans le CHAPITRE 5. L'effet du revêtement EGF/VEGF pourrait être étudié sur d'autres comportements cellulaires utiles pour la guérison tissulaire autour des EC tels que la migration cellulaire et la production de molécules de MEC.

Pour parfaire encore le revêtement en vue de l'amélioration de la guérison dans les AAA, l'immobilisation du facteur de croissance des fibroblastes basique (b-FGF ou FGF 2) présenterait un ajout intéressant. En effet, ce facteur de croissance polyvalent impliqué dans le remodelage tissulaire qui a lieu pendant la guérison (Barrientos, Stojadinovic et al. 2008) possède une action pro-proliférative et pro-migratoire sur les CMLV, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Rifkin and Moscatelli 1989, Tsuboi, Sato et al. 1990, Lindner and Reidy 1991, Bikfalvi, Klein et al. 1997, Yang, Zhou et al. 2014). Il a permis d'augmenter la formation de néo-intima autour d'EC en ePTFE (Kajimoto, Shimono et al. 2008) et en PET (van der Bas, Quax et al. 2004). Dans le contexte des AAA la combinaison d'EGF, VEGF et FGF pourrait être étudiée pour améliorer la guérison et la survie des cellules vasculaires dans la cavité anévrismale.

De plus, le travail effectué dans ce projet, en particulier les méthodes physico-chimiques utilisées pour immobiliser les facteurs de croissance, même si elles ont été étudiées dans le cadre de la création d'un revêtement de surface sur les EC, pourrait être transférées à des

Rapport-Gratuit.com

matrices d'ingénierie tissulaire pour la médecine régénératrice. En effet, les facteurs de croissance présentent un intérêt important pour ce type d'application (Tayalia and Mooney 2009, Lee, Silva et al. 2011, Wylie, Ahsan et al. 2011). L'immobilisation d'EGF et VEGF pourrait par exemple être réalisée dans un hydrogel biodégradable (ex. hydrogel de collagène, de gélatine, d'acide hyaluronique ou d'alginate (Tan and Marra 2010)) comportant de la chondroitine sulfate, afin d'améliorer l'angiogénèse et de permettre la survie de cellules encapsulées, deux problématiques qui suscitent beaucoup d'intérêt dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Laschke, Harder et al. 2006, Nicodemus and Bryant 2008, Miller, Stevens et al. 2012, Cheng, Chen et al. 2013). Dans cette optique, l'effet du revêtement sur la survie et la différenciation des cellules souches pourrait être étudié, puisque l'encapsulation de cellules souches est une approche envisagée pour la régénération de nombreux organes (ex. coeur, cerveau, vessie, os) (Caplan 2005, Aboushwareb and Atala 2008, Anderson, Lin et al. 2011, Ceccaldi, Fullana et al. 2012, Cheng, Chen et al. 2013).

***Recommandation :*** *La signalisation biochimique intracellulaire menant à l'effet synergique observé en présence d'EGF et VEGF devrait être identifiée. De plus, dans une optique biomimétique, la combinaison EGF-FGF-VEGF pourrait être étudiée afin d'élargir la gamme de cellules cibles (CMLV, cellules endothéliales, fibroblastes) et d'obtenir ainsi une guérison tissulaire optimale. Pour étendre la portée de nos travaux, l'immobilisation orientée des facteurs de croissance pourrait être réalisée sur des matrices d'ingénierie tissulaire dans le but d'optimiser la survie et la différenciation des cellules souches encapsulées.*

**Limites techniques du projet**

- *Création d'amines primaires*: Pour pouvoir effectuer des études de bioactivité comparatives incluant un grand nombre de conditions (CS vs. CMD au CHAPITRE 1, et différents ratios d'EGF et VEGF au CHAPITRE 5), nous avons eu besoin de réaliser des essais dans des plaques à 96 puits. Cependant, la géométrie des plaques à 96 puits ne permet pas un dépôt homogène du revêtement plasma utilisé précédemment (L-PPE:N) au fond des puits. L'impossibilité d'utiliser le L-PPE:N nous a alors conduits à utiliser des plaques multi-puits

commerciales avec revêtement aminé dans l'étude du CHAPITRE 1. Par la suite, en raison d'une interruption de la fabrication de ces plaques par le fournisseur, nous avons été amenés à utiliser des plaques présentant des groupements carboxyles (CellBIND®), sur lesquels nous avons immobilisé la carbohydrazine pour obtenir des amines primaires sur la surface (CHAPITRE 5). Avant de sélectionner la carbohydrazine, une autre molécule aminée a été testée pour fonctionnaliser les plaques Cellbind, le poly(allylamine), ou PAA ($CH_2CH(CH_2NH_2)]_n$), cependant, lors de tests préliminaires d'adhésion cellulaire (HUVEC et CMLV rat) sur Cellbind+PAA et Cellbind+PAA+CS, les cellules présentaient une morphologie très ronde et un faible étalement, possiblement à cause de la rugosité et la charge des chaines de PAA (Mw=15 kDa) qui affecte l'adhésion des cellules, et entraîne également une conformation de CS particulière défavorable à l'adhésion des cellules.

Malgré des compositions différentes, les surfaces de L-PPE:N, de plaques Stripwell et de plaques Cellbind+Carbohydrazine ont toutes permis l'immobilisation de CS et EGF de façon suffisante pour obtenir une réponse cellulaire. Cette bonne efficacité observée sur différents substrats peut s'expliquer par le fait que les chaînes de CS (Mw≈ 20-26 kDa (Volpi 2007)), permettent de couvrir la surface et de réaliser des greffages par la suite (EGF greffé de façon covalente ou EMCH puis Kcoil et capture d'Ecoil-EGF) malgré un nombre variable de liaisons amides avec la surface aminée.

- *Caractérisation des densités surfaciques de facteur de croissance*: Les systèmes complexes avec EGF et VEGF immobilisés se sont avérés difficiles à caractériser par ELISA direct en raison d'une saturation du signal. Des essais de quantification par ELISA indirect (dosage des surnageants) ont été effectués mais la répétabilité posait problème pour les solutions contenant du E-VEGF. Les raisons de ce manque de répétabilité n'ont pas pu être identifiées mais pourraient être liées une adsorption parasite du facteur de croissance sur le matériel (tubes, embouts de pipettes, etc.). Une caractérisation efficace des quantités de facteurs de croissance serait un argument pour prouver l'efficacité de la capture *'coiled-coil'* et permettre une comparaison avec les autres études disponibles dans la littérature. Le marquage radioactif avec $^{125}I$ est aussi utilisé dans la littérature à cette fin (Klenkler, Griffith et al.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

2005, Alberti, Davey et al. 2008, Gonçalves, Martins et al. 2010), mais n'a pas pu être effectué durant ce projet car il demande des installations et une expertise adaptées aux matières radioactives, qui n'étaient pas disponibles durant notre étude.

# CONCLUSION

L'objectif à long terme de ce projet était de développer un revêtement bioactif pour endoprothèse couverte, qui améliore la guérison et la colonisation de l'implant par les cellules vasculaires, favorise l'attachement de l'implant dans le vaisseau malade et ainsi prévient les complications liées au traitement endovasculaire des AAA. Le cheminement effectué pour répondre aux différents objectifs spécifiques détaillés au CHAPITRE 2, nous a permis d'apporter des contributions scientifiques originales, concernant à la fois les aspects appliqués et fondamentaux.

Tout d'abord, la démonstration de l'efficacité du revêtement CS+EGF obtenu par greffage covalent sur les cellules humaines (CLMV, Fibroblastes) et l'évaluation de sa stabilité sur des matériaux réalistes sur plusieurs semaines. En effet, dans la littérature, l'étude de la stabilité des matériaux bioactifs est très peu répandue, bien qu'elle présente un intérêt majeur pour de potentielles applications industrielles et cliniques. Le transfert efficace de notre revêtement sur des implants en ePTFE a permis la réalisation de tests *in vivo*. Une amélioration de la guérison a été constatée grâce au revêtement bioactif, malgré les limites de l'étude *in vivo* discutées plus haut.

De plus, les travaux réalisés ont permis l'avancement de la compréhension des propriétés antiadhésives sélectives de CS par comparaison avec un autre polysaccaride, le dextrane carboxyméthylé : bien que le rôle de la CS ne soit pas complètement éclairci, le fait qu'elle permette une meilleure adhésion cellulaire initiale que le dextrane a permis d'obtenir un revêtement bioactif très efficace alors que la faible adhésion cellulaire sur le dextrane a rendu le greffage (pourtant aussi efficace) de EGF inadapté à la colonisation cellulaire.

Enfin, il a été démontré que l'immobilisation orientée d'EGF puis la co-immobilisation d'EGF et VEGF sur une molécule de la MEC, CS, était rendue possible par le système de capture *coiled-coil*. Bien qu'un concept similaire ait été récemment publié par un groupe japonais (Assal, Mie et al. 2013), la co-immobilisation orientée n'avait pas été étudiée en détail en

variant les ratios de facteurs de croissance. En particulier, l'effet synergique de ces deux facteurs de croissance sur la survie des cellules vasculaires n'avait jamais été démontré à notre connaissance.

Les travaux menés durant ce doctorat ont permis de développer des revêtements bioactifs et anti-apoptotiques qui permettent la survie des cellules vasculaires et qui constituent une avancée vers la création d'endoprothèses couvertes bioactives pour la guérison après réparation endovasculaire des AAA. Il apparait également que la plateforme d'immobilisation *coiled-coil* présente un grand potentiel pour la construction de surfaces bioactives complexes et la compréhension du rôle de différents facteurs de croissance dans les comportements cellulaires.

# ANNEXE I

## STÉRILISATION DES REVÊTEMENTS L-PPEN et L-PPE:N+CS

### Contexte

La stérilisation des dispositifs médicaux est indispensable à leur application clinique, et cette étape importante doit être étudiée lors du développement de nouveaux dispositifs médicaux. En particulier, lors de la stérilisation des matériaux polymériques, la chaleur, les radiations, ainsi que les interactions chimiques avec des agents stérilisants peuvent affecter les propriétés des polymères (Premnath, Harris et al. 1996, Goldman and Pruitt 1998, Lerouge, Tabrizian et al. 2002).

L'impact de la stérilisation sur un dispositif médical polymérique varie selon la technique de stérilisation et la nature du polymère. Pour valider un procédé de stérilisation, il donc est nécessaire d'évaluer les risques en termes de fonctionnalité (dégradation des propriétés mécaniques ou de surface) et/ou de biocompatibilité par une caractérisation physico-chimique, mécanique et biologique.

Afin d'étudier la possibilité de transfert des revêtements bioactifs fabriqués par greffage chimique de CS sur le LPPEN, des travaux préliminaires ont été effectués. Cette annexe présente ces travaux préliminaires pour la caractérisation physico-chimique des revêtements L-PPE:N et L-PPE:N+CS déposés sur un film de PET, avant et après stérilisation. Les méthodes de stérilisation disponibles au CHUM Notre Dame, à savoir l'autoclave, le Sterrad®, l'Optreoz®, ainsi que la désinfection par immersion dans l'éthanol ont été testées afin d'évaluer si l'une de ces techniques pourrait être envisagée pour la stérilisation d'endoprothèses bioactives fonctionnalisées avec un revêtement à base de chondroitine sulfate.

**Description des techniques de stérilisation utilisées**

*Immersion dans l'éthanol*

Dans la littérature, l'immersion dans l'éthanol 70% suivie d'un séchage sous flux laminaire est couramment utilisée pour désinfecter les biomatériaux préalablement aux tests in vitro de culture cellulaire (Marreco, Moreira et al. 2004, Huebsch, Gilbert et al. 2005, Braghirolli, Steffens et al. 2014). La durée de l'immersion varie selon les sources, mais Braghirolli et al n'ont pas observé de différences notables en terme de contaminants après des immersions de 30 min, 1h et 2h dans l'éthanol 70% (Braghirolli, Steffens et al. 2014). Cette méthode simple à mettre en œuvre ne peut pas vraiment être qualifiée de stérilisation, il s'agit plutôt d'une technique de désinfection puisqu'elle n'élimine pas tous les types de contamination (Gardener and Peel 1991) et ne permet pas d'atteindre le *niveau d'assurance de stérilité* (NAS), c'est-à-dire une probabilité théorique d'isoler un germe inférieure à 1 pour 1 million, nécessaire à la mise sur le marché de dispositifs biomédicaux (Block 2001). Ici, la surface a été immergée pendant 5 minutes dans l'éthanol 70% avant d'être laissée à sécher à l'air.

*Autoclave*

La stérilisation par autoclave s'effectue en chaleur humide: l'échantillon à stériliser est placé à 121°C ou 134°C en vapeur saturée dans une enceinte sous pression (au CHUM : 121°C – 20 min). Cette méthode de stérilisation permet de détruire les composants métaboliques et structuraux des cellules, puisque la chaleur dénature et coagule les protéines. L'autoclave est couramment utilisé en milieu hospitalier et en milieu industriel pour la stérilisation des dispositifs médicaux (norme ISO 11134 - 1994). Les avantages de cette méthode sont sa rapidité, son efficacité, sa bonne pénétrabilité ainsi que le fait qu'elle ne dégage pas de résidus toxiques. Les inconvénients sont liés aux températures élevées ainsi qu'à la forte humidité qui peuvent entrainer une altération majeure des matériaux sensibles à la chaleur ou à l'humidité (corrosion des métaux, oxydation / dégradation des polymères).

*Sterrad®*

La stérilisation par Sterrad® est une technique basée sur l'utilisation d'un agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et d'un plasma à basse pression qui permet l'ionisation du peroxyde d'hydrogène en espèces actives. Commercialisé par Advanced Sterilization Products (ASP, division de Medos International SARL, une société de Johnson & Johnson), le système Sterrad® est autorisé par la Food and Drug Administration (FDA), Santé Canada et l'Union Européenne et utilisé depuis les années 1990-2000 pour effectuer des stérilisations de routine les hôpitaux et l'industrie biomédicale. Son efficacité est essentiellement due à la présence de peroxyde d'hydrogène qui permet de détruire les prions, les endotoxines, les spores, les champignons, les virus ainsi que les bactéries. Les avantages de cette méthode sont la stérilisation à basse température (50°C) et l'absence de résidus toxiques. Elle a cependant l'inconvénient d'être assez agressive et de pouvoir entrainer la dégradation de la surface des dispositifs médicaux par oxydation.

*Optreoz® ou* Sterizone®

L'Optreoz® est un système de stérilisation combinant le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et l'ozone. Ce système a été développé par la compagnie TSO3 et commercialisé par 3M™ sous le nom de 3M™ Optreoz™125-Z (jusqu'en 2012) puis TSO3 Sterizone® 125L+ (après une séparation de 3M™ et TSO3 en juillet 2012). Ce système de stérilisation à basse température (30-35°C) a déjà obtenu l'autorisation de mise sur le marché par Santé Canada et la FDA, ainsi que le marquage CE pour l'Union européenne. Cette technique est prometteuse, cependant la présence d'ozone et de peroxyde d'hydrogène (oxydants, corrosifs) pourrait avoir un effet synergique sur la dégradation des matériaux.

**Méthodes de caractérisation physico-chimiques**

- **L'évaluation de l'énergie de surface** des revêtements a été utilisée pour évaluer la modification des groupements présents en surface (polarité, hydrophilicité). Une énergie de surface élevée est habituellement caractéristique d'un matériau hydrophile (ex. Alumine

$Al_2O_3$: 185 dynes/cm (Cueff, Baud et al. 1993)), alors qu'une énergie de surface faible est le signe d'un matériau hydrophobe (ex. PTFE: 20 dynes/cm, (Jie-Rong and Wakida 1997)).

Pour mesurer l'énergie de surface, des gouttes de 3 liquides (eau, formamide, diiodométhane) ont été déposées sur la surface (1.5 µl/goutte, 3 gouttes par liquide par condition, expérience répétée 3 fois). L'angle de contact entre les gouttes de liquide et la surface a été mesuré et l'énergie de surface a été évaluée grâce au modèle d'Owens-Wendt (Équation A I-1). Dans ce modèle, les énergies de surface des liquides et du solide sont séparées en deux composantes, l'une dispersive $\gamma^d$ et l'autre polaire $\gamma^p$. L'énergie de surface d'un liquide est $\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p$ et celle du solide est $\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p$.

$$\gamma_L.(1+\cos\theta) = 2\left(\sqrt{\gamma_L^d.\gamma_S^d} + \sqrt{\gamma_L^p.\gamma_S^p}\right) \qquad \text{(A I-1)}$$

tirée de (Pegueroles, Aparicio et al. 2010)

Tableau A I-1 Valeurs des énergies de surface des différents liquides utilisés pour les mesures (tirées de (Jańczuk, Wójcik et al. 1993))

| | *Energie totale* $\gamma_L$ *(dynes/cm)* | *Energie dispersive* $\gamma_L^d$ *(dynes/cm)* | *Energie polaire* $\gamma_L^p$ *(dynes/cm)* |
|---|---|---|---|
| Eau | 72.8 | 21.8 | 51 |
| Formamide | 58 | 39 | 19 |
| Diiodométhane | 50.8 | 50.8 | 0 |

A partir des valeurs de $\gamma_L$, $\gamma_L^d$ et $\gamma_L^p$ (Tableau A I-1) et de la valeur de l'angle de contact liquide/solide mesurée (θ), il est possible de tracer un graphe avec un point pour chaque liquide, dont les coordonnées sont présentées dans l'équation (A I-2) avec θ: angle de contact entre le liquide et la surface, $\gamma_L$: énergie de surface totale du liquide, $\gamma_L^p$ : énergie de surface polaire du liquide, $\gamma_L^p$ : énergie de surface dispersive du liquide.

$$x = \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} \text{ et } y = \frac{\gamma_L.(1+\cos\theta)}{2\sqrt{\gamma_L^d}} \qquad \text{(A I-2)}$$

Le calcul de l'énergie de surface par la méthode Owens-Wendt a ensuite été effectué par la méthode de moyenne géométrique (Rupp, Scheideler et al. 2006). On procède par régression linéaire de la forme : $y = ax + b$, qui permet d'obtenir les composantes d'énergie du solide $\gamma_S^p = a^2$ et $\gamma_S^d = b^2$.

- **La coloration à la fuchsine acide** a permis de valider de façon qualitative la présence du revêtement L-PPE:N avant et après le traitement de stérilisation (détails méthodologiques présentés au CHAPITRE 3). En effet, ce colorant interagit avec les groupements aminés du L-PPE:N et conduit à une coloration rose vif de la surface.

- **La spectroscopie à rayons X** (XPS) a permis d'évaluer la composition élémentaire des revêtements tel que décrit au CHAPITRE 3. En particulier, la présence de carbone, d'azote, et d'oxygène a été mesurée, et dans le cas du revêtement L-PPE:N+CS, la présence de soufre a également été mesurée pour vérifier la présence de CS.

**Résultats**

Notre première étape a consisté à vérifier si le revêtement de base, le L-PPE:N, résistait aux différents traitements de stérilisation. La coloration à l'acide Fuchsine (Figure A I-1) a montré que la plupart des méthodes de stérilisation permettent de conserver l'intégrité du film de L-PPE:N, puisque tous les échantillons testés ont interagi avec le colorant, sauf celui l'autoclave. Cette étape qualitative a permis d'éliminer directement la stérilisation à l'autoclave puisque la température appliquée lors de ce traitement a détruit le film de polymère déposé par plasma.

Rapport-Gratuit.com

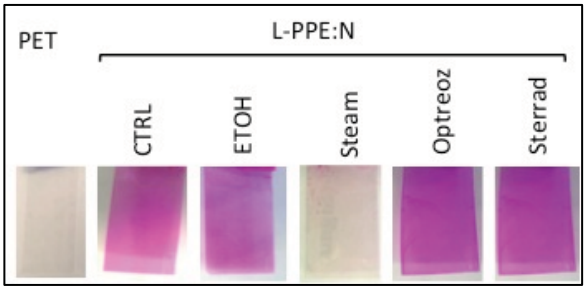



Figure A I-1 Coloration à la fuchsine acide sur le revêtement L-PPE:N après différentes méthodes de stérilisation

Pour identifier de façon plus précise les changements qui ont eu lieu sur la surface lors des traitements de stérilisation, une analyse surfacique des échantillons et une évaluation de l'énergie libre de surface ont été effectuées (Tableau A I-2).

Tableau A I-2 Analyse de la composition élémentaire de la surface par spectroscopie à rayons X et mesure de l'énergie libre de surface

| | | | ***Composition élémentaire (% at)*** | | | | ***Énergie libre de surface (dynes/cm)*** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Surface** | **Traitement** | **Angle de contact avec l'eau (°)** | C 1s | N 1s | O 1s | S 2p | Total | Polar | Dispersive |
| **PET** | - | 72.2 ± 2.1 | 70.3 ± 0.1 | - | 29.7 ± 0.1 | - | 40.2 ± 2.5 | 8.5 ± 2.5 | 31.7 ± 4.7 |
| **L-PPE:N** | **-** | 69.7 ± 4.9 | 81.2 ± 2.6 | 13.3 ± 1.3 | 5.6 ± 1.4 | - | 39.4 ± 1.1 | 10.4 ± 2.9 | 29.0 ± 2.0 |
| | EtOH | 69.8 ± 1.7 | 80.2 ± 1.7 | 13.0 ± 0.8 | 6.8 ± 1.2 | - | 41.9 ± 1.4 | 10.2 ± 0.7 | 31.7 ± 1.2 |
| | Optreoz | 62.1 ± 7.7 | 70.5 ± 0.1 | 11.8 ± 0.2 | 17.7 ± 0.1 | - | 43.1 ± 1.4 | 12.7 ± 7.1 | 30.3 ± 5.7 |
| | **Sterrad** | 66.7 ± 1.1 | 76.4 ± 0.5 | 11.8 ± 0.3 | 11.8 ± 0.6 | - | 45.5 ± 0.5 | 16.4 ± 4.6 | 29.1 ± 4.2 |
| **L-PPE:N+CS** | **-** | 55.7 ± 2.1 | 69.8 ± 1.0 | 11.9 ± 0.2 | 17.5 ± 1.0 | 0.9 ± 0.0 | 51.0 ± 2.6 | 18.2 ± 1.9 | 32.8 ± 1.1 |
| | EtOH | 57.5 ± 3.8 | 66.9 ± 4.0 | 11.7 ± 0.1 | 20.3 ± 3.7 | 1.1 ± 0.4 | 49.7 ± 1.8 | 16.1 ± 2.2 | 33.5 ± 0.4 |
| | **Optreoz** | 60.6 ± 4.4 | 68.7 ± 2.0 | 10.6 ± 0.3 | 19.6 ± 1.3 | 0.9 ± 0.0 | 49.0 ± 6.6 | 20.3 ± 3.4 | 28.7 ± 3.2 |
| | **Sterrad** | 61.5 ±2.7 | 68.3 ± 0.5 | 11.4 ± 0.1 | 19.6 ± 0.4 | 0.8 ± 0.0 | 42.8 ± 2.5 | 13.9 ± 3.0 | 28.8 ± 1.6 |

Les résultats de ces analyses montrent que l'éthanol ne modifie pas le L-PPE:N ($p>0.05$ comparé au L-PPE:N contrôle, à la fois pour l'énergie de surface et la composition). En revanche, les autres méthodes de stérilisation (Optreoz, Sterrad) affectent la composition du revêtement aminé, notamment par l'augmentation du pourcentage relatif d'oxygène et la diminution du pourcentage de carbone ($p<0.05$ comparé au contrôle). Ceci doit correspondre à une oxydation du revêtement menant à la création de groupements hydrophiles puisque l'angle de contact avec l'eau diminue et l'énergie de surface totale augmente ($p<0.05$ par rapport au contrôle).

En revanche, une fois que la CS est greffée sur le revêtement, l'impact des méthodes de stérilisation semble atténué, puisqu'aucun traitement (éthanol, Optreoz, Sterrad) ne modifie significativement la composition ($p>0.05$ comparé au L-PPE:N+CS contrôle). Toutefois, une faible diminution de la partie dispersive de l'énergie de surface a été observée après les traitements Optreoz et Sterrad par rapport au L-PPE:N+CS contrôle, toutefois significative ($p<0.05$).

**Conclusions**

Les résultats montrent que le L-PPE:N subit une oxydation lors des traitements de stérilisation évalués testées (Optreoz, Sterrad). Au contraire, une fois que la CS est greffée sur le L-PPE:N, le revêtement est plus stable et une bonne résistance du revêtement est observée (pas de changement en composition, faible diminution de la partie dispersive de l'énergie de surface). Une caractérisation biologique serait nécessaire pour vérifier que l'augmentation de la partie dispersive observée n'affecte pas les interactions entre la CS et les cellules. Pour de futures investigations, il serait intéressant d'intégrer la stérilisation par rayons gamma dans les méthodes évaluées, puisque celle-ci est couramment utilisée pour la stérilisation terminale des dispositifs médicaux dans l'industrie. L'oxyde d'éthylène est également répandu pour la stérilisation terminale, cependant sa toxicité a conduit a une diminution de son utilisation. Une discussion avec des fabricants d'endoprothèses couvertes serait pertinente pour décider si la technique doit être inclue dans de futurs tests.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Aboushwareb, T. and A. Atala. 2008. "*Stem cells in urology*." Nat Clin Pract Urol, 5,(11), 621-631.

Aburahma, A. F., B. A. Woodruff, S. Patrick Stuart, F. C. Lucente and J. P. Boland. 1991. "*Early diagnosis and survival of ruptured abdominal aortic aneurysms*." The American Journal of Emergency Medicine, 9,(2), 118-121.

Ailawadi, G., J. L. Eliason and G. R. Upchurch. 2003. "*Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*." Journal of Vascular Surgery, 38,(3), 584-588.

Aksoy, E. A., V. Hasirci, N. Hasirci, A. Motta, M. Fedel and C. Migliaresi. 2008. "*Plasma Protein Adsorption and Platelet Adhesion on Heparin-Immobilized Polyurethane Films*." Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 23,(6), 505-519.

Albelda, S. M. and C. A. Buck. 1990. "*Integrins and other cell adhesion molecules*." The FASEB Journal, 4,(11), 2868-2880.

Alberti, K., R. Davey, K. Onishi, S. George, K. Salchert, F. Seib, M. Bornhauser, T. Pompe, A. Nagy, C. Werner and P. Zandstra. 2008. "*Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate*." Nat Methods, 5,(645 - 650.

Almodovar, J., R. Guillot, C. Monge, J. Vollaire, S. Selimovic, J. L. Coll, A. Khademhosseini and C. Picart. 2014. "*Spatial patterning of BMP-2 and BMP-7 on biopolymeric films and the guidance of muscle cell fate*." Biomaterials, 35,(13), 3975-3985.

Amin, D. N., K. Hida, D. R. Bielenberg and M. Klagsbrun. 2006. "*Tumor Endothelial Cells Express Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) but not ErbB3 and Are Responsive to EGF and to EGFR Kinase Inhibitors*." Cancer Research, 66,(4), 2173-2180.

Anderson, S. B., C.-C. Lin, D. V. Kuntzler and K. S. Anseth. 2011. "*The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels*." Biomaterials, 32,(14), 3564-3574.

Anderson, S. M., T. T. Chen, M. L. Iruela-Arispe and T. Segura. 2009. "*The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF*." Biomaterials, 30,(27), 4618-4628.

Anderson, S. M., B. Shergill, Z. T. Barry, E. Manousiouthakis, T. T. Chen, E. Botvinick, M. O. Platt, M. L. Iruela-Arispe and T. Segura. 2011. "*VEGF internalization is not*

*required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF*." Integrative biology, 3,(9), 887-896.

Arko, F. R., T. Nussbaum, S. Lalka, J. Holleman and T. Roush. 2012. "The Endurant Stent Graft. Advantages from lessons learned." *Endovascular Today*. En ligne. <http://evtoday.com/2012/05/supplement/the-endurant-stent-graft/ >. Consulté le 15 juin 2015.

Assal, Y., M. Mie and E. Kobatake. 2013. "*The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiled-coil structures*." Biomaterials, 34,(13), 3315-3323.

Azencott, A. 2015. En ligne. < http://www.dr-azencott.com/fr/intervention-anevrisme-aorte-:-le-pontage-aortique-182.html >. Consulté le 15 juin 2015.

Babensee, J., L. McIntire and A. Mikos. 2000. "*Growth Factor Delivery for Tissue Engineering*." Pharmaceutical Research, 17,(5), 497-504.

Baldwin, A. D. and K. L. Kiick. 2010. "*Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials*." Peptide Science, 94,(1), 128-140.

Bao, P., A. Kodra, M. Tomic-Canic, M. S. Golinko, H. P. Ehrlich and H. Brem. 2009. "*The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing*." Journal of Surgical Research, 153,(2), 347-358.

Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem and M. Tomic-Canic. 2008. "*Growth factors and cytokines in wound healing*." Wound Repair and Regeneration, 16,(5), 585-601.

Baum, R. A., S. W. Stavropoulos, R. M. Fairman and J. P. Carpenter. 2003. "*Endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms*." Journal of vascular and interventional radiology, 14,(9), 1111-1117.

Bech, L., T. Meylheuc, B. Lepoittevin and P. Roger. 2007. "*Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates*." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 45,(11), 2172-2183.

Bennett, M. R. and J. J. Boyle. 1998. "*Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*." Atherosclerosis, 138,(1), 3-9.

Bennett, M. R. and M. O'Sullivan. 2001. "*Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy*." Pharmacology & Therapeutics, 91,(2), 149-166.

Bennett, N. T. and G. S. Schultz. 1993. "*Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors*." The American Journal of Surgery, 165,(6), 728-737.

Berliner, J. A., A. Aharanov and R. Pruss. 1981. "*Cell surface changes associated with EGF and insulin-induced cell adhesion*." Experimental Cell Research, 133,(1), 227-235.

Bersin, R. M. 2011. "The Evolution of Low-Profile Endograft Design." *Endovascular Today*. En ligne. <http://evtoday.com/2011/03/the-evolution-of-low-profile-endograft-design/ >. Consulté le 15 juin 2015.

Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci and D. B. Rifkin. 1997. "*Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2*." Endocrine Reviews, 18,(1), 26-45.

Bitterman, P. B. and C. A. Henke. 1991. "*FIbroproliferative disorders*." CHEST Journal, 99,(3_Supplement), 81S-84S.

Block, S. S. 2001. *Disinfection, sterilization, and preservation*, Lippincott Williams & Wilkins.

Bogdanski, D., S. A. Esenwein, O. Prymak, M. Epple, G. Muhr and M. Köller. 2004. "*Inhibition of PMN apoptosis after adherence to dip-coated calcium phosphate surfaces on a NiTi shape memory alloy*." Biomaterials, 25,(19), 4627-4632.

Bokel, C. and N. H. Brown. 2002. "*Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix*." Dev Cell, 3,(3), 311-321.

Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar and D. Abraham. 2004. "*Extra-cellular matrix in vascular networks*." Cell Proliferation, 37,(3), 207-220.

Boucher, C. 2010. " *Immobilisation orientée du facteur de croissance de l'épiderme à des fins d'application en ingénierie tissulaire "* Thèse de doctorat en génie biomédical, Montréal, École Polytechnique de Montréal, 268 p.

Boucher, C., B. Liberelle, M. Jolicoeur, Y. Durocher and G. De Crescenzo. 2009. "*Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation*." Bioconjugate Chemistry, 20,(8), 1569-1577.

Boucher, C., J.-C. Ruiz, M. Thibault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur, Y. Durocher and G. De Crescenzo. 2010. "*Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions*." Biomaterials, 31,(27), 7021-7031.

Boucher, C., G. St-Laurent, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo and Y. Durocher. 2010. "*Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions*." Analytical Biochemistry, 399,(1), 138-140.

Boucher, C., G. St-Laurent, M. Loignon, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo and Y. Durocher. 2008. "*The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags*." Tissue Eng Part A, 14,(12), 2069-2077.

Boucher, C., G. St-Laurent, M. Loignon, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo and Y. Durocher. 2008. "*The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags*." Tissue Engineering Part A, 14,(12), 2069-2077.

Braghirolli, D. I., D. Steffens, K. Quintiliano, G. A. Acasigua, D. Gamba, R. A. Fleck, C. L. Petzhold and P. Pranke. 2014. "*The effect of sterilization methods on electronspun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells*." J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 102,(4), 700-708.

Brash, J. L. 1996. "*Behavior of proteins at interfaces*." Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1,(5), 682-688.

Brown, P. M., D. T. Zelt and B. Sobolev. 2003. "*The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate*." Journal of vascular surgery, 37,(2), 280-284.

Brunkwall, J. 2008. "*How to Design the Optimal Stent Graft — What Have We Learnt?*" Scandinavian Journal of Surgery, 97,(2), 191-194.

Buck, D. B., J. A. van Herwaarden, M. L. Schermerhorn and F. L. Moll. 2014. "*Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms*." Nat Rev Cardiol, 11,(2), 112-123.

Buckley, A., J. M. Davidson, C. D. Kamerath, T. B. Wolt and S. C. Woodward. 1985. "*Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair*." Proceedings of the National Academy of Sciences, 82,(21), 7340-7344.

Buth, J., P. L. Harris, C. van Marrewijk and G. Fransen. 2003. "*The significance and management of different types of endoleaks*." Seminars in Vascular Surgery, 16,(2), 95-102.

Camarero, J. A. 2008. "*Recent developments in the site specific immobilization of proteins onto solid supports*." Peptide Science, 90,(3), 450-458.

Cao, P., F. Verzini, G. Parlani, P. D. Rango, B. Parente, G. Giordano, S. Mosca and A. Maselli. 2003. "*Predictive factors and clinical consequences of proximal aortic neck dilatation in 230 patients undergoing abdominal aorta aneurysm repair with self-expandable stent-grafts1*." Journal of Vascular Surgery, 37,(6), 1200-1205.

Caplan, A. I. 2005. "*Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics*." Tissue engineering, 11,(7-8), 1198-1211.

Caplan, M. R. and M. M. Shah. 2009. "*Translating Biomaterial Properties to Intracellular Signaling*." Cell Biochemistry and Biophysics, 54,(1-3), 1-10.

Ceccaldi, C., S. G. Fullana, C. Alfarano, O. Lairez, D. Calise, D. Cussac, A. Parini and B. Sallerin. 2012. "*Alginate scaffolds for mesenchymal stem cell cardiac therapy: influence of alginate composition*." Cell transplantation, 21,(9), 1969-1984.

Chao, H., D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin and R. S. Hodges. 1998. "*Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification*." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 715,(1), 307-329.

Chao, H., M. E. Houston, S. Grothe, C. M. Kay, M. O'Connor-McCourt, R. T. Irvin and R. S. Hodges. 1996. "*Kinetic Study on the Formation of a de Novo Designed Heterodimeric Coiled-Coil: Use of Surface Plasmon Resonance To Monitor the Association and Dissociation of Polypeptide Chains†*." Biochemistry, 35,(37), 12175-12185.

Charbonneau, C., J. E. Gautrot, M. J. Hebert, X. X. Zhu and S. Lerouge. 2007. "*Chondroitin-4-sulfate: A bioactive macromolecule to foster vascular healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair*." Macromolecular Bioscience, 7,(5), 746-752.

Charbonneau, C., B. Liberelle, M.-J. Hébert, G. De Crescenzo and S. Lerouge. 2011. "*Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating*." Biomaterials, 32,(6), 1591-1600.

Charbonneau, C., J. C. Ruiz, P. Lequoy, M. J. Hebert, G. De Crescenzo, M. R. Wertheimer and S. Lerouge. 2012. "*Chondroitin Sulfate and Epidermal Growth Factor Immobilization after Plasma Polymerization: A Versatile Anti-Apoptotic Coating to Promote Healing Around Stent Grafts*." Macromolecular Bioscience, 12,(6), 812-821.

Chen, F.-M., M. Zhang and Z.-F. Wu. 2010. "*Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering*." Biomaterials, 31,(24), 6279-6308.

Chen, S., L. Li, C. Zhao and J. Zheng. 2010. "*Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials*." Polymer, 51,(23), 5283-5293.

Cheng, T.-Y., M.-H. Chen, W.-H. Chang, M.-Y. Huang and T.-W. Wang. 2013. "*Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering*." Biomaterials, 34,(8), 2005-2016.

Chiu, L. L. Y. and M. Radisic. 2010. "*Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues*." Biomaterials, 31,(2), 226-241.

Choke, E., G. Cockerill, W. R. W. Wilson, S. Sayed, J. Dawson, I. Loftus and M. M. Thompson. 2005. "*A Review of Biological Factors Implicated in Abdominal Aortic Aneurysm Rupture*." European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 30,(3), 227-244.

Chu, P. K., J. Y. Chen, L. P. Wang and N. Huang. 2002. "*Plasma-surface modification of biomaterials*." Materials Science and Engineering: R: Reports, 36,(5–6), 143-206.

Chuang, T. W. and K. S. Masters. 2009. "*Regulation of polyurethane hemocompatibility and endothelialization by tethered hyaluronic acid oligosaccharides*." Biomaterials, 30,(29), 5341-5351.

Ciardiello, F., T. Troiani, R. Bianco, M. Orditura, F. Morgillo, E. Martinelli, M. P. Morelli, T. Cascone and G. Tortora. 2006. "*Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy*." Ann Oncol, 17 Suppl 7,(vii109-114.

Cook. 2015. En ligne. < http://www.cookmedical.com/zenithflex/ >. Consulté le Consulté le 15 mai 2015.

Creech, O., Jr. 1966. "*Endo-aneurysmorrhaphy and treatment of aortic aneurysm*." Ann Surg, 164,(6), 935-946.

Crombez, M., P. Chevallier, E. Petitclerc, D. Mantovani and G. Laroche. 2005. "*Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces*." Biomaterials, 26,(35), 7402-7409.

Cueff, R., G. Baud, J. P. Besse, M. Jacquet and M. Benmalek. 1993. "*Surface Free Energy Modification of PET by Plasma Treatment—Influence on Adhesion*." The Journal of Adhesion, 42,(4), 249-254.

Cutler, S. M. and A. J. García. 2003. "*Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin [alpha]5[beta]1 binding using a recombinant fragment of fibronectin*." Biomaterials, 24,(10), 1759-1770.

Dawson, J. P., M. B. Berger, C.-C. Lin, J. Schlessinger, M. A. Lemmon and K. M. Ferguson. 2005. "*Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface*." Molecular and Cellular Biology, 25,(17), 7734-7742.

De Bruin, J. L., A. F. Baas, J. Buth, M. Prinssen, E. L. G. Verhoeven, P. W. M. Cuypers, M. R. H. M. van Sambeek, R. Balm, D. E. Grobbee and J. D. Blankensteijn. 2010. "*Long-Term Outcome of Open or Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm*." New England Journal of Medicine, 362,(20), 1881-1889.

De Crescenzo, G., J. R. Litowski, R. S. Hodges and M. D. O'Connor-McCourt. 2003. "*Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: Effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding*." Biochemistry, 42,(6), 1754-1763.

De Donato, G., F. Setacci, P. Sirignano, G. Galzerano, M. Borrelli, L. Di Marzo and C. Setacci. 2014. "*Ultra-low profile Ovation device: is it the definitive solution for EVAR?*" The Journal of cardiovascular surgery, 55,(1), 33-40.

Deible, C. R., P. Petrosko, P. C. Johnson, E. J. Beckman, A. J. Russell and W. R. Wagner. 1999. "*Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol*." Biomaterials, 20,(2), 101-109.

Delaittre, G., A. M. Greiner, T. Pauloehrl, M. Bastmeyer and C. Barner-Kowollik. 2012. "*Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs*." Soft Matter, 8,(28), 7323-7347.

Desai, M., J. Eaton-Evans, C. Hillery, R. Bakhshi, Z. You, J. Lu, G. Hamilton and A. M. Seifalian. 2010. "*AAA Stent-Grafts: Past Problems and Future Prospects*." Annals of Biomedical Engineering, 38,(4), 1259-1275.

Desmet, T., R. Morent, N. D. Geyter, C. Leys, E. Schacht and P. Dubruel. 2009. "*Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification: A Review*." Biomacromolecules, 10,(9), 2351-2378.

Dobrin, P. B. 1999. "*Animal Models of Aneurysms*." Annals of Vascular Surgery, 13,(6), 641-648.

Dreux, A. C., D. J. Lamb, H. Modjtahedi and G. A. A. Ferns. 2006. "*The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: Their putative role in atherogenesis*." Atherosclerosis, 186,(1), 38-53.

Durdu, S., G. C. Deniz, D. Balci, C. Zaim, A. Dogan, A. Can, K. C. Akcali and A. R. Akar. 2012. "*Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection*." Cardiovascular Therapeutics, 30,(6), 308-316.

Ernst, H., M. K. Zanin, D. Everman and S. Hoffman. 1995. "*Receptor-mediated adhesive and anti-adhesive functions of chondroitin sulfate proteoglycan preparations from embryonic chicken brain*." Journal of Cell Science, 108,(12), 3807-3816.

Fan, V. H., A. Au, K. Tamama, R. Littrell, L. B. Richardson, J. W. Wright, A. Wells and L. G. Griffith. 2007. "*Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells*." Stem Cells, 25,(5), 1241-1251.

Rapport-Gratuit.com

Fatimi, A., P. Chabrot, S. Berrahmoune, J.-M. Coutu, G. Soulez and S. Lerouge. 2012. "*A new injectable radiopaque chitosan-based sclerosing embolizing hydrogel for endovascular therapies*." Acta Biomaterialia, 8,(7), 2712-2721.

Favia, P. and R. d'Agostino. 1998. "*Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications*." Surface and Coatings Technology, 98,(1–3), 1102-1106.

Formiga, F. R., B. Pelacho, E. Garbayo, G. Abizanda, J. J. Gavira, T. Simon-Yarza, M. Mazo, E. Tamayo, C. Jauquicoa, C. Ortiz-de-Solorzano, F. Prósper and M. J. Blanco-Prieto. 2010. "*Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model*." Journal of Controlled Release, 147,(1), 30-37.

Franck, G., J. Dai, A. Fifre, S. Ngo, C. Justine, S. Michineau, E. Allaire and M. Gervais. 2013. "*Reestablishment of the Endothelial Lining by Endothelial Cell Therapy Stabilizes Experimental Abdominal Aortic Aneurysms*." Circulation, 127,(18), 1877-1887.

Galas, R. J., Jr. and J. C. Liu. 2014. "*Surface density of vascular endothelial growth factor modulates endothelial proliferation and differentiation*." J Cell Biochem, 115,(1), 111-120.

Gama, C. I., S. E. Tully, N. Sotogaku, P. M. Clark, M. Rawat, N. Vaidehi, W. A. Goddard, A. Nishi and L. C. Hsieh-Wilson. 2006. "*Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity*." Nat Chem Biol, 2,(9), 467-473.

Gardener, J. and M. Peel. 1991. "*Introduction to sterilization, disinfection and infection control*." Melbourne: Churchill Livingstone.

Garfinkle, A. M., A. S. Hoffman, B. D. Ratner, L. O. Reynolds and S. R. Hanson. 1984. "*Effects of a tetrafluoroethylene glow discharge on patency of small diameter dacron grafts*." ASAIO Journal, 30,(1), 432-439.

Gigout, A., J. C. Ruiz, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur and S. Lerouge. 2011. "*Nitrogen-Rich Plasma-Polymerized Coatings on PET and PTFE Surfaces Improve Endothelial Cell Attachment and Resistance to Shear Flow*." Macromolecular Bioscience, 11,(8), 1110-1119.

Girardeaux, C., N. Zammatteo, M. Art, B. Gillon, J. J. Pireaux and R. Caudano. 1996. "*Amination of Poly(ethylene-terephthalate) polymer surface for biochemical applications*." Plasmas and Polymers, 1,(4), 327-346.

Goddard, J. M. and J. H. Hotchkiss. 2007. "*Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*." Progress in Polymer Science, 32,(7), 698-725.

Goldman, M. and L. Pruitt. 1998. "*Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE*." Journal of Biomedical Materials Research, 40,(3), 378-384.

Golledge, J. and P. E. Norman. 2010. "*Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm Cause, Response, or Common Risk Factors?*" Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 30,(6), 1075-1077.

Gonçalves, R., M. C. L. Martins, M. J. Oliveira, G. Almeida-Porada and M. A. Barbosa. 2010. "*Bioactivity of immobilized EGF on self-assembled monolayers: Optimization of the immobilization process*." Journal of Biomedical Materials Research Part A, 94A,(2), 576-585.

Grainger, D. W., G. Pavon-Djavid, V. Migonney and M. Josefowicz. 2003. "*Assessment of fibronectin conformation adsorbed to polytetrafluoroethylene surfaces from serum protein mixtures and correlation to support of cell attachment in culture*." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 14,(9), 973-988.

Gray, J. J. 2004. "*The interaction of proteins with solid surfaces*." Current Opinion in Structural Biology, 14,(1), 110-115.

Green, N., D. A. Sidloff, P. W. Stather, M. J. Bown, R. D. Sayers and E. Choke. 2014. "*Endoleak after endovascular aneurysm repair: Current status*." Reviews in Vascular Medicine, 2,(2), 43-47.

Greiner, A., J. Grommes and M. J. Jacobs. 2013. "*The Place of Endovascular Treatment in Abdominal Aortic Aneurysm*." Dtsch Arztebl International, 110,(8), 119-125.

Guidoin, R., D. Marceau, J. Couture, T. J. Rao, Y. Merhi, P.-E. Roy and D. De la Faye. 1989. "*Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses*." Biomaterials, 10,(3), 156-165.

Hao, X., E. A. Silva, A. Mansson-Broberg, K. H. Grinnemo, A. J. Siddiqui, G. Dellgren, E. Wardell, L. A. Brodin, D. J. Mooney and C. Sylven. 2007. "*Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction*." Cardiovasc Res, 75,(1), 178-185.

Heller, J. 1980. "*Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers*." Biomaterials, 1,(1), 51-57.

Henderson, E. L., Y. J. Gang, G. K. Sukhova, A. D. Whittemore, J. Knox and P. Libby. 1999. "*Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms*." Circulation, 99,(1), 96-104.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Henson, E. S. and S. B. Gibson. 2006. "*Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy*." Cellular Signalling, 18,(12), 2089-2097.

Hinek, A., J. Boyle and M. Rabinovitch. 1992. "*Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced "shedding" of the 67-kDa cell surface elastin binding protein*." Experimental Cell Research, 203,(2), 344-353.

Hirata, A., S.-i. Ogawa, T. Kometani, T. Kuwano, S. Naito, M. Kuwano and M. Ono. 2002. "*ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*." Cancer Research, 62,(9), 2554-2560.

Hobo, R., J. Buth and E. coll. 2006. "*Secondary interventions following endovascular abdominal aortic aneurysm repair using current endografts. A EUROSTAR report*." Journal of Vascular Surgery, 43,(5), 896-902.

Holden, A. 2015. "*Endovascular sac sealing concept: will the Endologix Nellix device solve the deficiencies?*" J Cardiovasc Surg (Torino), 56,(3), 339-353.

Holmberg, A., A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg and M. Uhlen. 2005. "*The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures*." Electrophoresis, 26,(3), 501-510.

Hoshi, R. A., R. Van Lith, M. C. Jen, J. B. Allen, K. A. Lapidos and G. Ameer. 2013. "*The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts*." Biomaterials, 34,(1), 30-41.

Huebsch, N., M. Gilbert and K. E. Healy. 2005. "*Analysis of sterilization protocols for peptide-modified hydrogels*." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 74B,(1), 440-447.

Humphries, J. D., A. Byron and M. J. Humphries. 2006. "*Integrin ligands at a glance*." Journal of Cell Science, 119,(19), 3901-3903.

Hung, H. S., C. C. Wu, S. Chien and S. H. Hsu. 2009. "*The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways*." Biomaterials, 30,(8), 1502-1511.

Hynes, R. O. 1987. "*Integrins: A family of cell surface receptors*." Cell, 48,(4), 549-554.

Iida, J., A. M. L. Meijne, T. R. Oegema, T. A. Yednock, N. L. Kovach, L. T. Furcht and J. B. McCarthy. 1998. "*A Role of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Binding Site in α4β1 Integrin-mediated Melanoma Cell Adhesion*." Journal of Biological Chemistry, 273,(10), 5955-5962.

Iovu, M., G. Dumais and P. du Souich. 2008. "*Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate*." Osteoarthritis and Cartilage, 16, Supplement 3,(0), S14-S18.

Ishihara, T., K. Kaneko, T. Ishihara and T. Mizushima. 2014. "*Development of Biodegradable Nanoparticles for Liver-Specific Ribavirin Delivery*." Journal of Pharmaceutical Sciences, 103,(12), 4005-4011.

Ishikawa, T., H. Terai and T. Kitajima. 2001. "*Production of a biologically active epidermal growth factor fusion protein with high collagen affinity*." Journal of biochemistry, 129,(4), 627-633.

Ito, Y. 2008. "*Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering*." Soft Matter, 4,(1), 46-56.

Ito, Y. 2009. *Growth Factors on Biomaterial Scaffolds*. Biological Interactions on Materials Surfaces. D. A. Puleo and R. Bizios, Springer US**:** 173-197.

Ito, Y., L. Shu Qin and Y. Imanishi. 1991. "*Enhancement of cell growth on growth factor-immobilized polymer film*." Biomaterials, 12,(5), 449-453.

Ito, Y. and S. Tada. 2013. "*Bio-orthogonal and combinatorial approaches for the design of binding growth factors*." Biomaterials, 34,(31), 7565-7574.

Jacob, M. P., C. Badier-Commander, V. Fontaine, Y. Benazzoug, L. Feldman and J. B. Michel. 2001. "*Extracellular matrix remodeling in the vascular wall*." Pathologie Biologie, 49,(4), 326-332.

Jańczuk, B., W. Wójcik and A. Zdziennicka. 1993. "*Determination of the Components of the Surface Tension of Some Liquids from Interfacial Liquid-Liquid Tension Measurements*." Journal of Colloid and Interface Science, 157,(2), 384-393.

Jie-Rong, C. and T. Wakida. 1997. "*Studies on the surface free energy and surface structure of PTFE film treated with low temperature plasma*." Journal of Applied Polymer Science, 63,(13), 1733-1739.

Joddar, B. and Y. Ito. 2011. "*Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine*." Journal of Materials Chemistry, 21,(36), 13737.

Jones, S. M., S. R. Vallabhaneni, R. G. McWilliams, J. Naik, T. Nicholas and R. K. Fisher. 2014. "*Type IIIb Endoleak Is an Important Cause of Failure Following Endovascular Aneurysm Repair*." Journal of Endovascular Therapy, 21,(5), 723-727.

Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. J. Garrett, C. W. Ward and A. W. Burgess. 2003. "*Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*." Experimental Cell Research, 284,(1), 31-53.

Kader, K. N. and C. M. Yoder. 2008. "*Endothelial cell death on biomaterials: Theoretical and practical aspects of investigation*." Materials Science and Engineering: C, 28,(3), 387-391.

Kaiura, T. L., H. Itoh, S. M. Kubaska Iii, T. A. McCaffrey, B. Liu and K. Craig Kent. 2000. "*The effect of growth factors, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells*." Journal of Vascular Surgery, 31,(3), 577-584.

Kajimoto, M., T. Shimono, K. Hirano, Y. Miyake, N. Kato, K. Imanaka-Yoshida, H. Shimpo and K. Miyamoto. 2008. "*Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: A canine model experiment*." Journal of Vascular Surgery, 48,(5), 1306-1314.

Kalachandra, S. and D. O. Shah. 1987. "*Polymers as Ophthalmic Lubricating Agents*." MRS Online Proceedings Library, 110,(null-null.

Kang, E. T., K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama and Y. Ikada. 1996. "*Surface Modification and Functionalization of Polytetrafluoroethylene Films*." Macromolecules, 29,(21), 6872-6879.

Kanie, K., Y. Narita, Y. Zhao, F. Kuwabara, M. Satake, S. Honda, H. Kaneko, T. Yoshioka, M. Okochi and H. Honda. 2012. "*Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells*." Biotechnology and bioengineering, 109,(7), 1808-1816.

Kapadia, M. R., D. A. Popowich and M. R. Kibbe. 2008. "*Modified Prosthetic Vascular Conduits*." Circulation, 117,(14), 1873-1882.

Keuren, J. F. W., S. J. H. Wielders, G. M. Willems, M. Morra, L. Cahalan, P. Cahalan and T. Lindhout. 2003. "*Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces*." Biomaterials, 24,(11), 1917-1924.

Kingshott, P., H. Thissen and H. J. Griesser. 2002. "*Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins*." Biomaterials, 23,(9), 2043-2056.

Kitajima, T., M. Sakuragi, H. Hasuda, T. Ozu and Y. Ito. 2009. "*A chimeric epidermal growth factor with fibrin affinity promotes repair of injured keratinocyte sheets*." Acta Biomater, 5,(7), 2623-2632.

Kito, H. and T. Matsuda. 1996. "*Biocompatible coatings for luminal and outer surfaces of small-caliber artificial grafts*." Journal of Biomedical Materials Research, 30,(3), 321-330.

Klenkler, B., M. Griffith, C. Becerril, J. West-Mays and H. Sheardown. 2005. "*EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications*." Biomaterials, 26,(35), 7286-7296.

Klenkler, B. J., H. Chen, Y. Chen, M. A. Brook and H. Sheardown. 2008. "*A high-density PEG interfacial layer alters the response to an EGF tethered polydimethylsiloxane surface*." Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 19,(11), 1411-1424.

Klenkler, B. J., D. Dwivedi, J. A. West-Mays and H. Sheardown. 2010. "*Corneal epithelial cell adhesion and growth on EGF-modified aminated PDMS*." Journal of Biomedical Materials Research Part A, 93A,(3), 1043-1049.

Koch, S., C. Yao, G. Grieb, P. Prevel, E. M. Noah and G. C. Steffens. 2006. "*Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF*." J Mater Sci Mater Med, 17,(8), 735-741.

Kuhl, P. R. and L. G. Griffith-Cima. 1996. "*Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase*." Nature Medicine, 2,(9), 1022-1027.

Kumada, Y., Y. Shiritani, K. Hamasaki, T. Ohse and M. Kishimoto. 2009. "*High biological activity of a recombinant protein immobilized onto polystyrene*." Biotechnology Journal, 4,(8), 1178-1189.

Kurten, R. C., P. Chowdhury, R. C. Sanders, L. M. Pittman, L. W. Sessions, T. C. Chambers, C. S. Lyle, B. J. Schnackenberg and S. M. Jones. 2005. "*Coordinating epidermal growth factor-induced motility promotes efficient wound closure*." American Journal of Physiology-Cell Physiology, 288,(1), C109-C121.

Kusanagi, M., O. Matsui, J. Sanada, T. Ogi, S. Takamatsu, H. Zhong, Y. Kimura and Y. Tabata. 2007. "*Hydrogel-mediated release of basic fibroblast growth factor from a Stent-Graft accelerates biological fixation with the aortic wall in a porcine model*." Journal of Endovascular Therapy, 14,(6), 785-793.

Laplante, P., M. A. Raymond, G. Gagnon, N. Vigneault, A. M. J. Sasseville, Y. Langelier, M. Bernard, Y. Raymond and M. J. Hebert. 2005. "*Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: Implications in the pathophysiology of systemic sclerosis*." Journal of Immunology, 174,(9), 5740-5749.

Laschke, M. W., Y. Harder, M. Amon, I. Martin, J. Farhadi, A. Ring, N. Torio-Padron, R. Schramm, M. Rucker, D. Junker, J. M. Haufel, C. Carvalho, M. Heberer, G. Germann, B. Vollmar and M. D. Menger. 2006. "*Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes*." Tissue Engineering, 12,(8), 2093-2104.

Lasheras, J. C. 2007. "*The Biomechanics of Arterial Aneurysms*." Annual Review of Fluid Mechanics, 39,(1), 293-319.

Le, P. U., A. E. G. Lenferink, M. Pinard, J. Baardsnes, B. Massie and M. D. O'Connor-McCourt. 2009. "*Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications*." Protein Expression and Purification, 64,(2), 108-117.

Lee, J. H., H. W. Jung, I.-K. Kang and H. B. Lee. 1994. "*Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups*." Biomaterials, 15,(9), 705-711.

Lee, K., E. A. Silva and D. J. Mooney. 2011. "*Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments*." Journal of the Royal Society Interface, 8,(55), 153-170.

Lequoy, P., B. Liberelle, G. De Crescenzo and S. Lerouge. 2014. "*Additive benefits of chondroitin sulfate and oriented tethered epidermal growth factor for vascular smooth muscle cell survival*." Macromol Biosci, 14,(5), 720-730.

Lequoy, P., F. Murschel, B. Liberelle, S. Lerouge and G. De Crescenzo. "*Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival*." Acta Biomaterialia.

Lerouge, S., J. Barrette, J.-C. Ruiz, M. Sbai, H. Savoji, B. Saoudi, M. Gauthier and M. R. Wertheimer. 2015. "*Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings for Biomedical Applications: Stability, Mechanical Properties and Adhesion Under Dry and Wet Conditions*." Plasma Processes and Polymers, n/a-n/a.

Lerouge, S., A. Major, P.-L. Girault-Lauriault, M.-A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer and M.-J. Hébert. 2007. "*Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair*." Biomaterials, 28,(6), 1209-1217.

Lerouge, S., M. Tabrizian, M. Wertheimer, R. Marchand and L. Yahia. 2002. "*Safety of plasma-based sterilization: surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes*." Bio-medical materials and engineering, 12,(1), 3-13.

Li, Z., X. Guo and J. Guan. 2012. "*An oxygen release system to augment cardiac progenitor cell survival and differentiation under hypoxic condition*." Biomaterials, 33,(25), 5914-5923.

Liberelle, B., L. Bartholin, C. Boucher, F. Murschel, M. Jolicoeur, Y. Durocher, A. Merzouki and G. De Crescenzo. 2010. "*New ELISA approach based on coiled-coil interactions*." Journal of Immunological Methods, 362,(1-2), 161-167.

Liberelle, B., C. Boucher, J. K. Chen, M. Jolicoeur, Y. Durocher and G. De Crescenzo. 2010. "*Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response*." Bioconjugate Chemistry, 21,(12), 2257-2266.

Liberelle, B., A. Merzouki and G. D. Crescenzo. 2013. "*Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA*." Journal of Immunological Methods, 389,(1–2), 38-44.

Lin, C. W., W. C. Hsu and B. J. Hwang. 2000. "*Investigation of wet chemical-treated poly(tetrafluoroethylene) surface and its metallization with SIMS, XPS and atomic force microscopy*." Journal of Adhesion Science and Technology, 14,(1), 1-14.

Lindner, V. and M. A. Reidy. 1991. "*Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor*." Proceedings of the National Academy of Sciences, 88,(9), 3739-3743.

Litowski, J. R. and R. S. Hodges. 2001. "*Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity*." J Pept Res, 58,(6), 477-492.

Litowski, J. R. and R. S. Hodges. 2002. "*Designing Heterodimeric Two-stranded α-Helical Coiled-coils: effects of hydrophobicity and α-helical propensity on protein folding, stability, and specificity* " Journal of Biological Chemistry, 277,(40), 37272-37279.

Litwinski, R. A., C. E. Donayre, S. L. Chow, T. K. Song, G. Kopchok, I. Walot and R. A. White. "*The role of aortic neck dilation and elongation in the etiology of stent graft migration after endovascular abdominal aortic aneurysm repair with a passive fixation device*." Journal of Vascular Surgery, 44,(6), 1176-1181.

Litwinski, R. A., C. E. Donayre, S. L. Chow, T. K. Song, G. Kopchok, I. Walot and R. A. White. 2006. "*The role of aortic neck dilation and elongation in the etiology of stent graft migration after endovascular abdominal aortic aneurysm repair with a passive fixation device*." J Vasc Surg, 44,(6), 1176-1181.

Lord, M. S., W. Yu, B. Cheng, A. Simmons, L. Poole-Warren and J. M. Whitelock. 2009. "*The modulation of platelet and endothelial cell adhesion to vascular graft materials by perlecan*." Biomaterials, 30,(28), 4898-4906.

Lu, T., X. Chen, Q. Shi, Y. Wang, P. Zhang and X. Jing. 2008. "*The immobilization of proteins on biodegradable fibers via biotin-streptavidin bridges*." Acta Biomaterialia, 4,(6), 1770-1777.

Lutolf, M. P. and J. A. Hubbell. 2005. "*Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*." Nature Biotechnology, 23,(1), 47-55.

Maheshwari, G., G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells and L. G. Griffith. 2000. "*Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering*." Journal of Cell Science, 113,(10), 1677-1686.

Maheshwari, G., A. Wells, L. G. Griffith and D. A. Lauffenburger. 1999. "*Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration*." Biophysical Journal, 76,(5), 2814-2823.

Majack, R. A. and A. W. Clowes. 1984. "*Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by heparin-like glycosaminoglycans*." Journal of cellular physiology, 118,(3), 253-256.

Major, A., R. Guidoin, G. Soulez, L. A. Gaboury, G. Cloutier, M. Sapoval, Y. Douville, G. Dionne, R. H. Geelkerken, P. Petrasek and S. Lerouge. 2006. "*Implant degradation and poor healing after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: An analysis of explanted stent-grafts*." Journal of Endovascular Therapy, 13,(4), 457-467.

Major, T. C. and J. A. Keiser. 1997. "*Inhibition of Cell Growth: Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor CGP 53716*." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 283,(1), 402-410.

Malina, M., B. Lindblad, K. Ivancev, M. Lindh, J. Malina and J. Brunkwall. 1998. "*Endovascular AAA Exclusion: Will Stents With Hooks and Barbs Prevent Stent-Graft Migration?*" Journal of Endovascular Surgery, 5,(4), 310-317.

Marchand-Brynaert, J., M. Deldime, I. Dupont, J.-L. Dewez and Y.-J. Schneider. 1995. "*Surface Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Film and Membrane by Controlled Wet Chemistry: Chemical Characterization of Carboxylated Surfaces*." Journal of Colloid and Interface Science, 173,(1), 236-244.

Marois, Y., M. F. Sigot-Luizart and R. Guidoin. 1999. "*Endothelial Cell Behavior on Vascular Prosthetic Grafts: Effect of Polymer Chemistry, Surface Structure, and Surface Treatment*." ASAIO Journal, 45,(4), 272-280.

Marreco, P. R., P. d. L. Moreira, S. C. Genari and Â. M. Moraes. 2004. "*Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings*." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 71B,(2), 268-277.

Martwiset, S., A. E. Koh and W. Chen. 2006. "*Nonfouling Characteristics of Dextran-Containing Surfaces*." Langmuir, 22,(19), 8192-8196.

Massia, S. P., J. Stark and D. S. Letbetter. 2000. "*Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading*." Biomaterials, 21,(22), 2253-2261.

Masters, K. S. 2011. "*Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration*." Macromol Biosci, 11,(9), 1149-1163.

Matsumura, J. S. and W. S. Moore. 1998. "*Clinical consequences of periprosthetic leak after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm*." Journal of Vascular Surgery, 27,(4), 606-613.

Mayo-Foundation-for-Medical-Education-and-Research. 2015. En ligne. < http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/clinical-updates/general-medical/endovascular-repair-abdominal-aortic-aneurysms >. Consulté le 15 mai 2015.

McArthur, C., V. Teodorescu, L. Eisen, N. Morrissey, P. Faries, L. Hollier and M. L. Marin. 2001. "*Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: Does healing occur?*" Journal of Vascular Surgery, 33,(4), 733-738.

McGee, M. and W. D. Wagner. 2003. "*Chondroitin sulfate anticoagulant activity is linked to water transfer - Relevance to proteoglycan structure in atherosclerosis*." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 23,(10), 1921-1927.

Melas, N., T. Perdikides, A. Saratzis, N. Saratzis, D. Kiskinis and D. H. Deaton. 2012. "*Helical EndoStaples enhance endograft fixation in an experimental model using human cadaveric aortas*." Journal of Vascular Surgery, 55,(6), 1726-1733.

Melas, N., A. Saratzis, N. Saratzis, J. Lazaridis, D. Psaroulis, K. Trygonis and D. Kiskinis. 2010. "*Aortic and Iliac Fixation of Seven Endografts for Abdominal-aortic Aneurysm Repair in an Experimental Model Using Human Cadaveric Aortas*." European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 40,(4), 429-435.

Melas, N., K. Stavridis, A. Saratzis, J. Lazarides, C. Gitas and N. Saratzis. 2015. "*Active proximal sealing in the endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: early results with a new stent-graft*." J Endovasc Ther, 22,(2), 174-178.

Michel, J. B. 2003. "*Anoikis in the cardiovascular system - Known and unknown extracellular mediators*." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 23,(12), 2146-2154.

Mieszawska, A. and D. Kaplan. 2010. "*Smart biomaterials - regulating cell behavior through signaling molecules*." BMC Biology, 8,(1), 59.

Miller, J. S., K. R. Stevens, M. T. Yang, B. M. Baker, D.-H. T. Nguyen, D. M. Cohen, E. Toro, A. A. Chen, P. A. Galie and X. Yu. 2012. "*Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues*." Nature materials, 11,(9), 768-774.

Milnor, W. R. 1990. *Cardiovascular physiology*, Oxford University Press.

Miyamoto, S., H. Teramoto, J. S. Gutkind and K. M. Yamada. 1996. "*Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and*

Rapport-Gratuit.com

*MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors*." The Journal of Cell Biology, 135,(6), 1633-1642.

Moláček, J., V. Třeška, J. Kobr, B. Čertík, T. Skalický, V. Kuntscher and V. Křížková. 2009. "*Optimization of the Model of Abdominal Aortic Aneurysm – Experiment in an Animal Model*." Journal of Vascular Research, 46,(1), 1-5.

Monchaux, E. and P. Vermette. 2007. "*Bioactive Microarrays Immobilized on Low-Fouling Surfaces to Study Specific Endothelial Cell Adhesion*." Biomacromolecules, 8,(11), 3668-3673.

Mougenot, P., M. Koch, I. Dupont, Y.-J. Schneider and J. Marchand-Brynaert. 1996. "*Surface Functionalization of Polyethylene Terephthalate Film and Membranes by Controlled Wet Chemistry: II. Reactivity Assays of Hydroxyl Chain Ends*." Journal of Colloid and Interface Science, 177,(1), 162-170.

Moulakakis, K. G., I. Dalainas, S. Mylonas, T. G. Giannakopoulos, E. D. Avgerinos and C. D. Liapis. 2010. "*Conversion to Open Repair After Endografting for Abdominal Aortic Aneurysm: A Review of Causes, Incidence, Results, and Surgical Techniques of Reconstruction*." Journal of Endovascular Therapy, 17,(6), 694-702.

Mukherjee, B., K. Santra, G. Pattnaik and S. Ghosh. 2008. "*Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers*." International Journal of Nanomedicine, 3,(4), 487-496.

Murschel, F., B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher and G. De Crescenzo. 2013. "*Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor*." Acta Biomater, 9,(6), 6806-6813.

Murschel, F., B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher and G. De Crescenzo. 2013. "*Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor*." Acta Biomaterialia, 9,(6), 6806-6813.

Nandini, C. D., T. Mikami, M. Ohta, N. Itoh, F. Akiyama-Nambu and K. Sugahara. 2004. "*Structural and Functional Characterization of Oversulfated Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Hybrid Chains from the Notochord of Hagfish: neuritogenic and binding activities for growth factors and neurotrophic factors* " Journal of Biological Chemistry, 279,(49), 50799-50809.

NatureEducation. 2010. En ligne. < http://www.nature.com/scitable/topicpage/rtk-14050230 >. Consulté le 23 juin 2015.

Nemeno-Guanzon, J. G., S. Lee, J. R. Berg, Y. H. Jo, J. E. Yeo, B. M. Nam, Y.-G. Koh and J. I. Lee. 2012. "*Trends in tissue engineering for blood vessels*." BioMed Research International, 2012,(

Nicodemus, G. D. and S. J. Bryant. 2008. "*Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*." Tissue Engineering Part B: Reviews, 14,(2), 149-165.

Niimi, Y., F. Ichinose, Y. Ishiguro, K. Terui, S. Uezono, S. Morita and S. Yamane. 1999. "*The Effects of Heparin Coating of Oxygenator Fibers on Platelet Adhesion and Protein Adsorption*." Anesthesia & Analgesia, 89,(3), 573.

Nillesen, S. T. M., P. J. Geutjes, R. Wismans, J. Schalkwijk, W. F. Daamen and T. H. van Kuppevelt. 2007. "*Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen–heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF*." Biomaterials, 28,(6), 1123-1131.

Nishi, N., O. Matsushita, K. Yuube, H. Miyanaka, A. Okabe and F. Wada. 1998. "*Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain*." Proceedings of the National Academy of Sciences, 95,(12), 7018-7023.

Njieha, F. K. and S. W. Shalaby. 1992. "*Stabilization of epidermal growth factor*." Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 7,(3), 288-299.

Noel, S. 2015. " *Développements de revêtements polymèriques bioactifs pour prothèses vasculaires synthétiques "* Thèse de doctorat en génie biomédical, Montréal, École Polytechnique de Montréal, 267 p.

Noel, S., A. Hachem, Y. Merhi and G. De Crescenzo. 2015. "*Development of a polyester coating combining anti-thrombogenic and cell adhesive properties – Influence of sequence and surface density of adhesion peptides*." Biomacromolecules.

Noel, S., A. Hachem, Y. Merhi and G. De Crescenzo. 2015. "*Development of a Polyester Coating Combining Antithrombogenic and Cell Adhesive Properties: Influence of Sequence and Surface Density of Adhesion Peptides*." Biomacromolecules, 16,(6), 1682-1694.

Noel, S., B. Liberelle, L. Robitaille and G. De Crescenzo. 2011. "*Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces*." Bioconjugate Chemistry, 22,(8), 1690-1699.

Noel, S., B. Liberelle, A. Yogi, M. J. Moreno, M. N. Bureau, L. Robitaille and G. De Crescenzo. 2013. "*A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts*." Journal of Materials Chemistry B, 1,(2), 230-238.

Nordon, I. M., R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus and M. M. Thompson. 2011. "*Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms*." Nat Rev Cardiol, 8,(2), 92-102.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Nutley, M., R. Guidoin, T. Yin, Y. Douville, Z. Zhang, G. R. Marinov, D. Wei, J. Lin, B. Weber, L. Wang, B. Li, G. Samisb, Y. Merhi, R. McGregor, G. Dionne and N. Gilbert. 2011. "*Detailed analysis of a series of explanted Talent AAA stent-grafts: biofunctionality assessment*." J Long Term Eff Med Implants, 21,(4), 299-319.

O'Shea, E. K., K. J. Lumb and P. S. Kim. 1993. "*Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil*." Curr Biol, 3,(10), 658-667.

Oh, S. H., C. L. Ward, A. Atala, J. J. Yoo and B. S. Harrison. 2009. "*Oxygen generating scaffolds for enhancing engineered tissue survival*." Biomaterials, 30,(5), 757-762.

Parodi, J. C., J. C. Palmaz and H. D. Barone. 1991. "*Transfemoral Intraluminal Graft Implantation for Abdominal Aortic Aneurysms*." Annals of Vascular Surgery, 5,(6), 491-499.

Pegueroles, M., C. Aparicio, M. Bosio, E. Engel, F. J. Gil, J. A. Planell and G. Altankov. 2010. "*Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy*." Acta Biomaterialia, 6,(1), 291-301.

Pompe, T., K. Salchert, K. Alberti, P. Zandstra and C. Werner. 2010. "*Immobilization of growth factors on solid supports for the modulation of stem cell fate*." Nat. Protocols, 5,(6), 1042-1050.

Premnath, V., W. Harris, M. Jasty and E. Merrill. 1996. "*Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem*." Biomaterials, 17,(18), 1741-1753.

Pu, F. R., R. L. Williams, T. K. Markkula and J. A. Hunt. 2002. "*Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro*." Biomaterials, 23,(11), 2411-2428.

Rahmany, M. B. and M. Van Dyke. 2013. "*Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review*." Acta biomaterialia, 9,(3), 5431-5437.

Ratner, B. D. 1993. "*Plasma deposition for biomedical applications: A brief review*." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 4,(1), 3-11.

Ratner, B. D., A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons. 2004. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Academic press.

Rawat, M., C. I. Gama, J. B. Matson and L. C. Hsieh-Wilson. 2008. "*Neuroactive Chondroitin Sulfate Glycomimetics*." Journal of the American Chemical Society, 130,(10), 2959-2961.

Raymond, M. A., A. Desormeaux, P. Laplante, N. Vigneault, J. G. Filep, K. Landry, A. V. Pshezhetsky and M. J. Hebert. 2004. "*Apoptosis of endothelial cells triggers a*

*caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells*." Faseb Journal, 18,(2), U166-U184.

Reilly, C. F., M. S. Kindy, K. E. Brown, R. D. Rosenberg and G. E. Sonenshein. 1989. "*Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle*." Journal of Biological Chemistry, 264,(12), 6990-6995.

Ren, X., Y. Feng, J. Guo, H. Wang, Q. Li, J. Yang, X. Hao, J. Lv, N. Ma and W. Li. 2015. "*Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications*." Chemical Society Reviews.

Resch, T., K. Ivancev, J. Brunkwall, U. Nyman, M. Malina and B. Lindblad. 1999. "*Distal Migration of Stent-Grafts after Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms*." Journal of Vascular and Interventional Radiology, 10,(3), 257-264.

Rice, J. J., M. M. Martino, L. De Laporte, F. Tortelli, P. S. Briquez and J. A. Hubbell. 2013. "*Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials*." Advanced Healthcare Materials, 2,(1), 57-71.

Richardson, T. P., M. C. Peters, A. B. Ennett and D. J. Mooney. 2001. "*Polymeric system for dual growth factor delivery*." Nature biotechnology, 19,(11), 1029-1034.

Rifkin, D. B. and D. Moscatelli. 1989. "*Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor*." The Journal of Cell Biology, 109,(1), 1-6.

Risau, W. 1997. "*Mechanisms of angiogenesis*." Nature, 386,(6626), 671-674.

Roghani, M., A. Mansukhani, P. Dell'Era, P. Bellosta, C. Basilico, D. B. Rifkin and D. Moscatelli. 1994. "*Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding*." Journal of Biological Chemistry, 269,(6), 3976-3984.

Rowe, V. L., S. L. Stevens, T. T. Reddick, M. B. Freeman, R. Donnell, R. C. Carroll and M. H. Goldman. 2000. "*Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas*." Journal of Vascular Surgery, 31,(3), 567-576.

Ruiz, J.-C., A. St-Georges-Robillard, C. Thérésy, S. Lerouge and M. R. Wertheimer. 2010. "*Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability*." Plasma Processes and Polymers, 7,(9-10), 737-753.

Rupp, F., L. Scheideler, N. Olshanska, M. de Wild, M. Wieland and J. Geis-Gerstorfer. 2006. "*Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces*." Journal of Biomedical Materials Research Part A, 76A,(2), 323-334.

Rusmini, F., Z. Zhong and J. Feijen. 2007. "*Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips*." Biomacromolecules, 8,(6), 1775-1789.

Saito, G., J. A. Swanson and K.-D. Lee. 2003. "*Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities*." Advanced drug delivery reviews, 55,(2), 199-215.

Sakalihasan, N., R. Limet and O. D. Defawe. 2005. "*Abdominal aortic aneurysm*." The Lancet, 365,(9470), 1577-1589.

Sakiyama-Elbert, S. E. "*Incorporation of Heparin into Biomaterials*." Acta Biomaterialia, 0).

Sakiyama-Elbert, S. E. and J. A. Hubbell. 2000. "*Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors*." Journal of Controlled Release, 65,(3), 389-402.

Sakuragi, M., T. Kitajima, T. Nagamune and Y. Ito. 2011. "*Recombinant hBMP4 incorporated with non-canonical amino acid for binding to hydroxyapatite*." Biotechnol Lett, 33,(9), 1885-1890.

Santos, I. C., A. Rodrigues, L. Figueiredo, L. A. Rocha and J. M. R. Tavares. 2012. "*Mechanical properties of stent–graft materials*." Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials Design and Applications, 226,(4), 330-341.

Sarra-Bournet, C., S. Turgeon, D. Mantovani and G. Laroche. 2006. "*Comparison of Atmospheric-Pressure Plasma versus Low-Pressure RF Plasma for Surface Functionalization of PTFE for Biomedical Applications*." Plasma Processes and Polymers, 3,(6-7), 506-515.

Sartore, S., A. Chiavegato, E. Faggin, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni and P. Pauletto. 2001. "*Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling: From Innocent Bystander to Active Participant*." Circulation Research, 89,(12), 1111-1121.

Schermerhorn, M. 2009. "*A 66-Year-Old Man With an Abdominal Aortic Aneurysm Review of Screening and Treatment*." Jama-Journal of the American Medical Association, 302,(18), 2015-2022.

Schermerhorn, M. L., R. P. Bensley, K. A. Giles, R. Hurks, A. J. O'Malley, P. Cotterill, E. Chaikof and B. E. Landon. 2012. "*Changes in Abdominal Aortic Aneurysm Rupture and Short Term Mortality 1995–2008*." Annals of surgery, 256,(4), 651-658.

Schlessinger, J. 2000. "*Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*." Cell, 103,(2), 211-225.

Schlessinger, J. and A. Ullrich. 1992. "*Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases*." Neuron, 9,(3), 383-391.

Schmidt, D., H. Waldeck and W. Kao. 2009. *Protein Adsorption to Biomaterials*. Biological Interactions on Materials Surfaces. D. A. Puleo and R. Bizios, Springer US**:** 1-18.

Schultz, G. S. and A. Wysocki. 2009. "*Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*." Wound Repair and Regeneration, 17,(2), 153-162.

Semino, C. E., R. D. Kamm and D. A. Lauffenburger. 2006. "*Autocrine EGF receptor activation mediates endothelial cell migration and vascular morphogenesis induced by VEGF under interstitial flow*." Experimental cell research, 312,(3), 289-298.

Servier-Medical-Art. 2015. En ligne. < http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint >. Consulté le 10 février 2015.

Seyednejad, H., W. Ji, F. Yang, C. F. van Nostrum, T. Vermonden, J. J. van den Beucken, W. J. Dhert, W. E. Hennink and J. A. Jansen. 2012. "*Coaxially electrospun scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly(ε-caprolactone) and loaded with VEGF for tissue engineering applications*." Biomacromolecules, 13,(11), 3650-3660.

Sharon, J. L. and D. A. Puleo. 2008. "*Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates*." Acta Biomater, 4,(4), 1016-1023.

Shen, H., X. Hu, J. Bei and S. Wang. 2008. "*The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide)*." Biomaterials, 29,(15), 2388-2399.

Shen, Y., A. P. Tenney, S. A. Busch, K. P. Horn, F. X. Cuascut, K. Liu, Z. He, J. Silver and J. G. Flanagan. 2009. "*PTPσ Is a Receptor for Chondroitin Sulfate Proteoglycan, an Inhibitor of Neural Regeneration*." Science, 326,(5952), 592-596.

Shen, Y. H., M. S. Shoichet and M. Radisic. 2008. "*Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells*." Acta Biomaterialia, 4,(3), 477-489.

Shibuya, M. 2011. "*Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*." Genes & Cancer, 2,(12), 1097-1105.

Shin, Y. M., Y. B. Lee, S. J. Kim, J. K. Kang, J.-C. Park, W. Jang and H. Shin. 2012. "*Mussel-Inspired Immobilization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) for Enhanced Endothelialization of Vascular Grafts*." Biomacromolecules, 13,(7), 2020-2028.

Sidloff, D. A., P. W. Stather, E. Choke, M. J. Bown and R. D. Sayers. 2013. "*Type II endoleak after endovascular aneurysm repair*." Br J Surg, 100,(10), 1262-1270.

Sigma-Aldrich. 2015. En ligne. < http://www.sigmaaldrich.com/canada-francais.html >. Consulté le 20 mai 2015.

Silver, J. H., J.-C. Lin, F. Lim, V. A. Tegoulia, M. K. Chaudhury and S. L. Cooper. 1999. "*Surface properties and hemocompatibility of alkyl-siloxane monolayers supported*

*on silicone rubber: effect of alkyl chain length and ionic functionality*." Biomaterials, 20,(17), 1533-1543.

Sino-Biological-Inc. 2012. En ligne. < http://www.sinobiological.com/styles/default/images/index_files/EGFR-Signaling-Pathway.gif >. Consulté le 17 mai 2015.

Sino-Biological-Inc. 2012. En ligne. < http://www.sinobiological.com/VEGF-Signaling_image_pvegf-signaling.html >. Consulté le 17 mai 2015.

Siow, K. S., L. Britcher, S. Kumar and H. J. Griesser. 2006. "*Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review*." Plasma Processes and Polymers, 3,(6-7), 392-418.

Slee, J. B., A. J. Christian, R. J. Levy and S. J. Stachelek. 2014. "*Addressing the Inflammatory Response to Clinically Relevant Polymers by Manipulating the Host Response Using ITIM Domain-Containing Receptors*." Polymers, 6,(10), 2526-2551.

Soulez, G., S. Lerouge, I. Salazkin, T. Darsaut, V. L. Oliva and J. Raymond. 2007. "*Type I and Collateral Flow in Experimental Aneurysm Models Treated with Stent-Grafts*." Journal of Vascular and Interventional Radiology, 18,(2), 265-272.

Soulez, M., I. Sirois, N. Brassard, M. A. Raymond, F. Nicodeme, N. Noiseux, Y. Durocher, A. V. Pshezhetsky and M. J. Hebert. 2010. "*Epidermal Growth Factor and Perlecan Fragments Produced by Apoptotic Endothelial Cells Co-Ordinately Activate ERK1/2-Dependent Antiapoptotic Pathways in Mesenchymal Stem Cells*." Stem Cells, 28,(4), 810-820.

Steele, J. G., B. A. Dalton, G. Johnson and P. A. Underwood. 1995. "*Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria™ and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts*." Biomaterials, 16,(14), 1057-1067.

Stefonek-Puccinelli, T. and K. Masters. 2008. "*Co-Immobilization of Gradient-Patterned Growth Factors for Directed Cell Migration*." Annals of Biomedical Engineering, 36,(12), 2121-2133.

Stringa, E., V. Knauper, G. Murphy and J. Gavrilovic. 2000. "*Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells*." Journal of Cell Science, 113,(11), 2055-2064.

Sun, G., Y.-I. Shen, S. Kusuma, K. Fox-Talbot, C. J. Steenbergen and S. Gerecht. 2011. "*Functional neovascularization of biodegradable dextran hydrogels with multiple angiogenic growth factors*." Biomaterials, 32,(1), 95-106.

Szilagyi, D. E. 2001. "*The problem of healing of endovascular stent grafts in the repair of abdominal aortic aneurysms*." Journal of Vascular Surgery, 33,(6), 1283-1285.

Tabata, Y., A. Nagano and Y. Ikada. 1999. "*Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor*." Tissue Eng, 5,(2), 127-138.

Taite, L. J., P. Yang, H. W. Jun and J. L. West. 2008. "*Nitric oxide releasing polyurethane–PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion*." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 84,(1), 108-116.

Tan, H. and K. G. Marra. 2010. "*Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*." Materials, 3,(3), 1746-1767.

Tayalia, P. and D. J. Mooney. 2009. "*Controlled growth factor delivery for tissue engineering*." Adv Mater, 21,(32-33), 3269-3285.

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin. 2008. "*Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*." Nat Rev Mol Cell Biol, 9,(3), 231-241.

Thalla, P. K., H. Fadlallah, B. Liberelle, P. Lequoy, G. De Crescenzo, Y. Merhi and S. Lerouge. 2014. "*Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants*." Biomacromolecules.

Thalla, P. K., H. Fadlallah, B. Liberelle, P. Lequoy, G. De Crescenzo, Y. Merhi and S. Lerouge. 2014. "*Chondroitin sulfate coatings display low platelet but high endothelial cell adhesive properties favorable for vascular implants*." Biomacromolecules, 15,(7), 2512-2520.

Theocharis, A. D., D. A. Theocharis, G. De Luca, A. Hjerpe and N. K. Karamanos. 2002. "*Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta*." Biochimie, 84,(7), 667-674.

Theocharis, A. D., I. Tsolakis, T. Tsegenidis and N. K. Karamanos. 1999. "*Human abdominal aortic aneurysm is closely associated with compositional and specific structural modifications at the glycosaminoglycan level*." Atherosclerosis, 145,(2), 359-368.

Trivascular. 2015. En ligne. < http://www.trivascular.com >. Consulté le 15 juin 2015.

Trollope, A., J. V. Moxon, C. S. Moran and J. Golledge. 2011. "*Animal models of abdominal aortic aneurysm and their role in furthering management of human disease*." Cardiovascular Pathology, 20,(2), 114-123.

Truica-Marasescu, F. and M. R. Wertheimer. 2008. "*Nitrogen-rich plasma-polymer films for biomedical applications*." Plasma Processes and Polymers, 5,(1), 44-57.

Tsuboi, R., Y. Sato and D. B. Rifkin. 1990. "*Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells*." Journal of Cell Biology, 110,(2), 511-517.

Uebersax, L., H. P. Merkle and L. Meinel. 2008. "*Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*." Journal of controlled release, 127,(1), 12-21.

Upchurch, G. R. 2005. "*Gene Therapy to Treat Aortic Aneurysms: Right Goal, Wrong Strategy*." Circulation, 112,(7), 939-940.

Vallières, K., É. Petitclerc and G. Laroche. 2007. "*Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity*." Macromolecular Bioscience, 7,(5), 738-745.

van Beek, S. C., D. A. Legemate, A. Vahl, W. Wisselink, M. Barnes, R. A. Fitridge and R. Balm. "*External validation of the Endovascular aneurysm repair Risk Assessment model in predicting survival, reinterventions, and endoleaks after endovascular aneurysm repair*." Journal of Vascular Surgery, 59,(6), 1555-1561.e1553.

van Beek, S. C., J. J. Reimerink, A. C. Vahl, W. Wisselink, R. J. Peters, D. A. Legemate and R. Balm. 2014. "*External Validation of Models Predicting Survival After Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm Repair*." Eur J Vasc Endovasc Surg.

van der Bas, J. M. A., P. H. A. Quax, A. C. van den Berg, V. W. M. van Hinsbergh and J. H. van Bockel. 2002. "*Ingrowth of aorta vascular cells into basic fibroblast growth factor-impregnated vascular prosthesis material: A porcine and human in vitro study on blood vessel prosthesis healing*." Journal of Vascular Surgery, 36,(6), 1237-1247.

van der Bas, J. M. A., P. H. A. Quax, A. C. van den Berg, M. J. T. Visser, E. van der Linden and J. H. van Bockel. 2004. "*Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: A porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing*." Journal of Vascular Surgery, 39,(4), 850-858.

van Laake, L. W., T. Vainas, R. Dammers, P. Kitslaar, A. P. G. Hoeks and G. W. H. Schurink. 2005. "*Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: A role for matrix metalloproteinase-9?*" European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 29,(4), 371-377.

Vardulaki, K. A., N. M. Walker, N. E. Day, S. W. Duffy, H. A. Ashton and R. A. P. Scott. 2000. "*Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm*." British Journal of Surgery, 87,(2), 195-200.

Vermeer, A. W. P., C. E. Giacomelli and W. Norde. 2001. "*Adsorption of IgG onto hydrophobic teflon. Differences between the Fab and Fc domains*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1526,(1), 61-69.

Volodos, N. L. 2013. "*Historical perspective: The first steps in endovascular aortic repair: how it all began*." J Endovasc Ther, 20 Suppl 1,(I3-23.

Volpi, N. 2006. *Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity*, Academic Press.

Volpi, N. 2007. "*Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates*." Journal of Pharmaceutical Sciences, 96,(12), 3168-3180.

Vorp, D. A. 2007. "*Biomechanics of abdominal aortic aneurysm*." Journal of biomechanics, 40,(9), 1887-1902.

Vroman, L. and A. L. Adams. 1969. "*Identification of rapid changes at plasma–solid interfaces*." Journal of Biomedical Materials Research, 3,(1), 43-67.

Vroman, L., A. L. Adams, M. Klings, G. C. Fischer, P. C. Munoz and R. P. Solensky. 1977. "*Reactions of formed elements of blodd with plasma proteins at interfaces.*" Annals of the New York Academy of Sciences, 283,(1), 65-76.

Vulic, K. and M. S. Shoichet. 2014. "*Affinity-Based Drug Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration*." Biomacromolecules, 15,(11), 3867-3880.

Wei, Y., Y. Ji, L. Xiao, Q. Lin and J. Ji. 2011. "*Different complex surfaces of polyethyleneglycol (PEG) and REDV ligand to enhance the endothelial cells selectivity over smooth muscle cells*." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84,(2), 369-378.

Wells, A., K. Gupta, P. Chang, S. Swindle, A. Glading and H. Shiraha. 1998. "*Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts*." Microscopy Research and Technique, 43,(5), 395-411.

Werner, S. and R. Grose. 2003. "*Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines*." Physiological Reviews, 83,(3), 835-870.

Wills, A., M. M. Thompson, M. Crowther, R. D. Sayers and P. R. F. Bell. 1996. "*Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms - Cellular and biochemical mechanisms*." European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 12,(4), 391-400.

Wissink, M., R. Beernink, A. Poot, G. Engbers, T. Beugeling, W. Van Aken and J. Feijen. 2000. "*Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices*." Journal of Controlled Release, 64,(1), 103-114.

World-Health-Organization. 2015. En ligne. < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/ >. Consulté le 21 mai 2015.

Rapport-Gratuit.com

Wylie, R. G., S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead and M. S. Shoichet. 2011. "*Spatially controlled simultaneous patterning of multiple growth factors in three-dimensional hydrogels*." Nat Mater, 10,(10), 799-806.

Wyss, T. R., L. C. Brown, J. T. Powell and R. M. Greenhalgh. 2010. "*Rate and Predictability of Graft Rupture After Endovascular and Open Abdominal Aortic Aneurysm Repair Data From the EVAR Trials*." Annals of Surgery, 252,(5), 805-811.

Xie, H., M. A. Pallero, K. Gupta, P. Chang, M. F. Ware, W. Witke, D. J. Kwiatkowski, D. A. Lauffenburger, J. E. Murphy-Ullrich and A. Wells. 1998. "*EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLC gamma signaling pathway*." Journal of Cell Science, 111,(615-624.

Xue, L. and H. P. Greisler. 2003. "*Biomaterials in the development and future of vascular grafts*." Journal of Vascular Surgery, 37,(2), 472-480.

Yamada, K. M. and S. Miyamoto. 1995. "*Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control*." Current opinion in cell biology, 7,(5), 681-689.

Yang, B., L. Zhou, B. Peng, Z. Sun, Y. Dai and J. Zheng. 2014. "*In vitro comparative evaluation of recombinant growth factors for tissue engineering of bladder in patients with neurogenic bladder*." J Surg Res, 186,(1), 63-72.

Ying, W. Z., H. G. Zhang and P. W. Sanders. 2007. "*EGF receptor activity modulates apoptosis induced by inhibition of the proteasome of vascular smooth muscle cells*." Journal of the American Society of Nephrology, 18,(1), 131-142.

Zaragoza, C., C. Gomez-Guerrero, J. L. Martin-Ventura, L. Blanco-Colio, B. Lavin, B. Mallavia, C. Tarin, S. Mas, A. Ortiz and J. Egido. 2011. "*Animal models of cardiovascular diseases*." J Biomed Biotechnol, 2011,(497841.

Zhang, H., X. Jia, F. Han, J. Zhao, Y. Zhao, Y. Fan and X. Yuan. 2013. "*Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration*." Biomaterials, 34,(9), 2202-2212.

Zhao, W., S. A. McCallum, Z. Xiao, F. Zhang and R. J. Linhardt. 2012. "*Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides*." Biosci Rep, 32,(1), 71-81.

Zhong, H. S., O. Matsui, K. Xu, T. Ogi, M. Okuda, Y. Liu, J. I. Sanada and C. H. Sun. 2009. "*Partially Covered Stent-Graft Implantation in Rabbit Aorta: A New Model to Investigate Bioactive Stent-Grafts in Small Animals*." Journal of Endovascular Therapy, 16,(2), 154-160.

Zhou, M., Z. Liu, Z. Wei, C. Liu, T. Qiao, F. Ran, Y. Bai, X. Jiang and Y. Ding. 2009. "*Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized*

*scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor*." Artif Organs, 33,(3), 230-239.

Zhou, W., E. Blay, Jr., V. Varu, S. Ali, M. Q. Jin, L. Sun and J. H. Joh. 2014. "*Outcome and clinical significance of delayed endoleaks after endovascular aneurysm repair*." J Vasc Surg, 59,(4), 915-920.

Zhu, A., Z. Ming and S. Jian. 2005. "*Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft*." Applied Surface Science, 241,(3), 485-492.

Zieris, A., S. Prokoph, K. R. Levental, P. B. Welzel, M. Grimmer, U. Freudenberg and C. Werner. 2010. "*FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis*." Biomaterials, 31,(31), 7985-7994.

Zisch, A. H., M. P. Lutolf, M. Ehrbar, G. P. Raeber, S. C. Rizzi, N. Davies, H. Schmökel, D. Bezuidenhout, V. Djonov, P. Zilla and J. A. Hubbell. 2003. "*Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth*." The FASEB Journal.

Zisch, A. H., U. Schenk, J. C. Schense, S. E. Sakiyama-Elbert and J. A. Hubbell. 2001. "*Covalently conjugated VEGF–fibrin matrices for endothelialization*." Journal of Controlled Release, 72,(1–3), 101-113.

Zou, X. H., Y. Z. Jiang, G. R. Zhang, H. M. Jin, N. T. M. Hieu and H. W. Ouyang. 2009. "*Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing*." Acta Biomaterialia, 5,(5), 1588-1595.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES